

明 細 書

発明の名称： F C R L 1 に結合する抗体又は該抗体断片

技術分野

[0001] 本発明は、F c r e c e p t o r - l i k e p r o t e i n 1の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞、該ハイブリドーマまたは該形質転換細胞を用いる該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体、該抗体または該抗体断片を含む治療薬および診断薬、並びに該抗体もしくは該抗体断片または該抗体もしくは該抗体断片を含む抗体薬物複合体を用いたF c r e c e p t o r - l i k e p r o t e i n 1関連疾患の治療方法および診断方法に関する。

背景技術

[0002] F c r e c e p t o r - l i k e p r o t e i n 1（以下、F C R L 1と記載する場合もある）はCD307a、FCRH1、IFGP1、IRTA5等の別名でも知られる免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質である。ヒトF C R L 1のアミノ酸配列は2001年に同定されている（非特許文献1）。

[0003] F C R L 1はB細胞に発現するI型膜貫通タンパク質である。3つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン、2つの細胞内免疫受容体チロシン活性化モチーフおよび膜貫通領域を有するタンパク質である（非特許文献1）。F C R L 1の内在性リガンドは現在までのところ、同定されていない。

[0004] F C R L 1は正常B細胞に加えて、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、有毛細胞白血病、マントル細胞リンパ腫などのがん細胞で発現していることが報告されている（非特許文献2、3）。さらに近年、F C R L 1ががんの増殖に寄与していることが報告されている（非特許文献4）。

[0005] FCRL 1 に対するモノクローナル抗体として E 3、E 9（非特許文献 2）、2 G 5、7 G 8、5 A 2（特許文献 1）、1 F 9、2 A 1 0（特許文献 2）、5 A 3（特許文献 3）が知られている。また、抗 FCRL 1 抗体にイムノトキシンを結合させるとがん細胞株に対して細胞傷害活性を発揮することが知られている（非特許文献 4）

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献 1：国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 7 1 8 5 号

特許文献 2：米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 1 6 2 3 2 号明細書

特許文献 3：国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 7 0 4 8 号

非特許文献

[0007] 非特許文献 1：Davis RS., et al. “Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98. 17 (2001): 9772-9777.

非特許文献 2：Du X., et al. “FCRL1 on chronic lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, and B-cell non-Hodgkin lymphoma as a target of immunotoxins” Blood 111. 1 (2008): 338-343.

非特許文献 3：Auat M., et al. “Evaluation of CD307a expression patterns during normal B-cell maturation and in B-cell malignancies by flow cytometry” Cytometry Part B: Clinical Cytometry 94. 4 (2018): 588-595.

非特許文献 4：Yousefi Z., et al. “Fc Receptor-Like 1 as a Promising Target for Immunotherapeutic Interventions of B-Cell-Related Disorders” Biomarker Insights 14 (2018): 1-9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、F C R L 1 の細胞外領域に結合する新規のモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞、該ハイブリドーマまたは該形質転換細胞を用いる該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体、該抗体または該抗体断片を含む治療薬および診断薬、並びに該抗体もしくは該抗体断片または該抗体もしくは該抗体断片を含む抗体薬物複合体を用いた F C R L 1 関連疾患の治療方法および診断方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の 1 ～ 26 に関する。

1. F c r e c e p t o r - l i k e p r o t e i n 1 (以下、F C R L 1 と略記する) に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片であって、該抗体が下記 (a) ～ (g) から選ばれるいずれか一つの抗体である、抗体または該抗体断片。

(a) 重鎖可変領域 (h e a v y c h a i n v a r i a b l e r e g i o n ; 以下 V H と略記する) の相補性決定領域 (c o m p l e m e n t a r i t y d e t e r m i n i n g r e g i o n ; 以下 C D R と略記する) 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 20 ～ 22 に記載されるアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域 (l i g h t c h a i n v a r i a b l e r e g i o n ; 以下 V L と略記する) の C D R 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 24 ～ 26 に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(b) V H の C D R 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 28 ～ 30 に記載されるアミノ酸配列を含み、かつ V L の C D R 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 32 ～ 34 に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(c) V H の C D R 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 36 ～ 38 に記載されるアミノ酸配列を含み、かつ V L の C D R 1 ～ 3 が、それぞれ配列番号 40 ～ 42 に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(d) V HのC D R 1～3が、それぞれ配列番号44～46に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1～3が、それぞれ配列番号48～50に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(e) V HのC D R 1～3が、それぞれ配列番号52～54に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1～3が、それぞれ配列番号56～58に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、および

(f) V HのC D R 1～3が、それぞれ配列番号60～62に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1～3が、それぞれ配列番号64～66に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(g) V HのC D R 1～3が、それぞれ配列番号36～38に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1～3が、それぞれ配列番号40、71及び42に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

2. F C R L 1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片であって、該抗体が下記(2b-1)～(2b-4)、(2c-1)、(2c-2)及び(2g-1)から選ばれるいずれか一つの抗体である、抗体または該抗体断片。

(2b-1) V Hが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-2) V Hが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-3) V Hが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-4) V Hが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-1) V Hが配列番号75に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-2) V Hが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2g-1) V_Hが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV_Lが配列番号78に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

3. 前記抗体の重鎖定常領域がIgGの重鎖定常領域である前記1または2に記載の抗体または該抗体断片。

4. 前記抗体の重鎖定常領域が配列番号79または80に記載されるアミノ酸配列を含む前記3に記載の抗体または該抗体断片。

5. 抗体が遺伝子組換え抗体である、前記1～4のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

6. 遺伝子組換え抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群より選ばれる1である、前記5に記載の抗体または該抗体断片。

7. 前記抗体断片がFab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる1である、前記1～6のいずれか1に記載の抗体断片。

8. 前記1～6のいずれか1に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

9. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

10. 前記9に記載の核酸を含むベクター。

11. 前記10に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞。

12. 前記8に記載のハイブリドーマまたは前記11に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または抗体断片を採取することを含む、前記1～7のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

13. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体。

14. 前記抗体薬物複合体が、リンカーを介して薬剤と連結した前記抗体または該抗体断片を含む前記13に記載の抗体薬物複合体。

15. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記

13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を含む、組成物。

16. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を含む、FCRL1の検出または測定用試薬。

17. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を含む、FCRL1関連疾患の診断薬。

18. FCRL1関連疾患が、がん、自己免疫疾患または炎症性疾患である、前記17に記載の診断薬。

19. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を含む、FCRL1関連疾患の治療薬。

20. FCRL1関連疾患が、がん、自己免疫疾患または炎症性疾患である、前記19に記載の治療薬。

21. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を用いた、FCRL1関連疾患の診断方法。

22. 前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体を投与することを含む、FCRL1関連疾患の治療方法。

23. FCRL1関連疾患の診断薬を製造するための、前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体の使用。

24. FCRL1関連疾患の治療薬を製造するための、前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体の使用。

25. FCRL1関連疾患の診断薬としての使用のための、前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記

載の抗体薬物複合体。

26. FCRL1 関連疾患の治療薬としての使用のための、前記1～7のいずれか1に記載の抗体もしくは該抗体断片または前記13もしくは14に記載の抗体薬物複合体。

発明の効果

[0010] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトFCRL1の細胞外領域に選択的に結合する。特に本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、既存のFCRL1抗体に比べ、抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate; 以下ADCとも記載する) に使用したときに優れた効果を発揮する。それゆえ、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトFCRL1 関連疾患の治療薬および診断薬として利用できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] 図1は、公知抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させた抗体薬物複合体について、SU-DHL-6細胞皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を測定した結果である。図1の縦軸は、腫瘍サイズ (mm³) を示す。図1の横軸は、SU-DHL-6細胞皮下移植マウスモデルにADCを投与した後の日数を示す。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、E9、1F9および7G8を使用した。陰性抗体としては、抗2,4-dinitrophenol (DNP) IgG1抗体を使用した。

[図2A] 図2Aは、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、SU-DHL-6細胞の生存に与える影響を測定した結果である。図2Aの縦軸は、細胞生存率 (%) を示し、ADCを処置しない条件での細胞数を100%とした。図2Aの横軸は、SU-DHL-6細胞に添加したADCの濃度を示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK1142、DK1164、DK681、DK1166およびDK1141を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図2B]図2Bは、前記図2Aと同様の測定において、新規抗ヒトFCRL1抗体としてDK610を使用した結果を示す。

[図3A]図3Aは、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、Ramos細胞の生存に与える影響を測定した結果である。図3Aの縦軸は、細胞生存率(%)を示し、ADCを処置していない条件での細胞数を100%とした。図3Aの横軸は、Ramos細胞に添加したADCの濃度を示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK1142、DK1164、DK681、DK1166およびDK1141を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図3B]図3Bは、前記図3Aと同様の測定において、新規抗ヒトFCRL1抗体としてDK610を使用した結果を示す。

[図4]図4は、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、SU-DHL-6細胞皮下移植マウスモデルおよびRamos細胞皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を測定した結果である。薬剤投与後10日目の結果を示す。図4の縦軸は、7G8を投与したマウスの腫瘍サイズを1とした時の相対的な腫瘍サイズを示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK1142、DK1164、DK681、DK1166、DK1141およびDK610を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図5]図5は、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、Ramos細胞皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を測定した結果である。薬剤投与後42日目の結果を示す。図5の縦軸は、腫瘍サイズ(mm³)を示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK1142、DK1164、DK681、DK1166、DK1141およびDK610を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図6]図6は、新規抗ヒトFCRL1抗体について、Ramos細胞における

抗体の内在化を測定した結果である。図6の縦軸は、蛍光強度を示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK1142、DK1164、DK681、DK1166、DK1141およびDK610を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図7A]図7Aは、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、SU-DHL-6細胞の生存に与える影響を測定した結果である。図7Aの縦軸は、細胞生存率(%)を示し、ADCを処置しない条件での細胞数を100%とした。図7Aの横軸は、SU-DHL-6細胞に添加したADCの濃度を示す。新規抗FCRL1キメラ抗体としては、DK681、新規抗FCRL1ヒト化抗体としては、DK681 F11、DK681 F12、DK681 F13およびDK681 F14を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図7B]図7Bは、前記図7Aと同様の測定において、新規抗FCRL1キメラ抗体として、DK1142、新規抗FCRL1ヒト化抗体として、DK1142 F21、DK1142 F22およびDK1142 F24を使用した結果を示す。

[図8A]図8Aは、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、Ramoss細胞の生存に与える影響を測定した結果である。図8Aの縦軸は、細胞生存率(%)を示し、ADCを処置しない条件での細胞数を100%とした。図8Aの横軸は、Ramoss細胞に添加したADCの濃度を示す。新規抗FCRL1キメラ抗体としては、DK681、新規抗FCRL1ヒト化抗体としては、DK681 F11、DK681 F12、DK681 F13およびDK681 F14を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

[図8B]図8Bは、前記図8Aと同様の測定において、新規抗FCRL1キメラ抗体として、DK1142、新規抗FCRL1ヒト化抗体として、DK1142 F21、DK1142 F22およびDK1142 F24を使用した

した結果を示す。

[図9]図9は、新規抗ヒトFCRL1抗体にペイロードリンカーであるSG3249を結合させたADCについて、SU-DHL-6細胞皮下移植マウスモデルおよびRamoss細胞皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を測定した結果である。薬剤投与後7日目の結果を示す。図9の縦軸は、7G8を投与したマウスの腫瘍サイズを1とした時の相対的な腫瘍サイズを示す。新規抗ヒトFCRL1抗体としては、DK681 F11、DK681 F12、DK681 F13、DK681 F14、DK1142 F21、DK1142 F22およびDK1142 F24を使用した。公知抗ヒトFCRL1抗体としては、7G8を使用した。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片に関する。
- [0013] FCRL1は、CD307a、FCRH1、IFGP1およびIRTA5ともいう。FCRL1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、413アミノ酸からなる1型膜タンパク質である。
- [0014] FCRL1は細胞内に2つの免疫受容体チロシン活性モチーフ（ITAM）を有している。そのため、リガンドの結合により細胞内に活性化シグナルが伝達されることが予想されるが、現時点でFCRL1の内在性リガンドは同定されておらず、FCRL1の機能は明らかとなっていない。近年のがん細胞株を用いた実験では、FCRL1がアポトーシス関連分子の発現を制御することにより、がん細胞の増殖に関与することが報告されている。
- [0015] 本発明においてヒトFCRL1としては、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはNCBIアクセッション番号NP_443170のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号3に記載のアミノ酸配列若しくはNCBIアクセッション番号NP_443170のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒトFCRL1の機能を有するポリペプチド、あるいは配列番号3に記載のアミノ酸

配列若しくはNCBIアクセッション番号NP_443170のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の類似性を有するアミノ酸配列から成り、かつヒトFCRL1の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0016] 配列番号3に記載のアミノ酸配列またはNCBIアクセッション番号NP_443170で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] などを用いて、例えば配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするDNAに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0017] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数個、例えば、1～5個のアミノ酸である。

[0018] ヒトFCRL1をコードする遺伝子としては、配列番号1に記載の塩基配列、およびNCBIアクセッション番号NM_052938の塩基配列が挙げられる。配列番号1に記載の塩基配列若しくはNM_052938の塩基配列において、1以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列から成り、かつヒトFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号1に記載の塩基配列若しくはNM_052938の塩基配列と少なくとも60%以上の類似性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の類似性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の類似性を有する塩基配列から成り、かつヒトFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子または配列番号1に記載の塩基配列、若し

くはNM__052938の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAから成り、かつヒトFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のヒトFCRL1をコードする遺伝子に含有される。

[0019] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号1に記載の塩基配列またはNM__052938の塩基配列を含むDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法またはDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAのことをいう。

[0020] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニーあるいはプラーク由来のDNA、または該配列を有するPCR産物若しくはオリゴDNAを固定化したフィルター若しくはスライドガラスを用いて、0.7～1.0mmol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)] を行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

[0021] ハイブリダイズ可能なDNAとしては配列番号1に記載の塩基配列、またはNM__052938の塩基配列と少なくとも60%以上の類似性を有するDNA、好ましくは80%以上の類似性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の類似性を有するDNAを挙げることができる。

[0022] 真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多

型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も本発明のヒトFCRL1をコードする遺伝子に含有される。

本発明の抗体としては、ヒトFCRL1とサルFCRL1のいずれにも結合する抗体が挙げられる。

[0023] 本発明においてサルFCRL1としては、配列番号4に記載のアミノ酸配列若しくはNCBIアクセッション番号XP_015310712のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号4に記載のアミノ酸配列若しくはNCBIアクセッション番号XP_015310712のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつサルFCRL1の機能を有するポリペプチド、あるいは配列番号4に記載のアミノ酸配列若しくはNCBIアクセッション番号XP_015310712のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の類似性を有するアミノ酸配列から成り、かつサルFCRL1の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0024] 配列番号4に記載のアミノ酸配列またはNCBIアクセッション番号XP_015310712で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法などを用いて、例えば配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするDNAに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0025] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数個、例えば、1～5個のアミノ酸である。

[0026] サルFCRL1をコードする遺伝子としては、配列番号2に記載の塩基配列、およびNCBIアクセッション番号XM_005541349の塩基配列が挙げられる。配列番号2に記載の塩基配列若しくはXM_005541349の塩基配列において、1以上の塩基が欠失、置換または付加された塩

基配列から成り、かつサルFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号2に記載の塩基配列若しくはXM__005541349の塩基配列と少なくとも60%以上の類似性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の類似性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の類似性を有する塩基配列から成り、かつサルFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子または配列番号2に記載の塩基配列、若しくはXM__005541349の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAから成り、かつサルFCRL1の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のサルFCRL1をコードする遺伝子に含有される。

[0027] 本発明におけるアミノ酸配列または塩基配列の類似性とは、2つのアミノ酸配列または塩基配列を比較し、特定の条件で算出した数値をいう。具体的には、類似性は2つの配列のアラインメントを取得し、該アラインメント内で一致または類似する残基ペアが占める割合を算出することで得られる。アラインメント取得には例えばNeedleman-Wunsch法、Smith-Waterman法、FASTA法およびBLAST法などのアルゴリズムが用いられる。各アルゴリズムで用いられるパラメータとしては、残基ペア単位での類似性評価指標（アミノ酸配列の場合、例えばBLOSUM62、BLOSUM50およびPAM30などの置換行列が用いられ、塩基配列の場合、例えばmatch reward, mismatch penaltyなどが用いられる。）、ギャップ部分の定量的評価指標（例えばアフィン型ギャップコスト関数）などが挙げられる。本発明におけるアミノ酸配列または塩基配列の類似性の一例としては、BLAST法の代表的実装であるNCBI BLASTによりデフォルトのパラメータを用いて取得されたアラインメントに付帯して出力されるidentitiesまたはpositivesの値が挙げられる。

[0028] 本発明の抗体がヒトFCRL1の細胞外領域に結合することは、ヒトFCRL1発現細胞に対する本発明の抗体の結合性を、ELISA、フローサイ

トメトリーおよび表面プラズモン共鳴法などを用いて測定することにより確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

[0029] 抗体分子はイムノグロブリン (以下、Igと表記する) と称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の類似性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGともいう。

[0030] 抗体分子は重鎖 (Heavy chain、以下H鎖と記す) および軽鎖 (Light chain、以下L鎖と記す) と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、H鎖はN末端側よりH鎖可変領域 (VHとも表記される) およびH鎖定常領域 (CHとも表記される)、L鎖はN末端側よりL鎖可変領域 (VLとも表記される) およびL鎖定常領域 (CLとも表記される) の各領域により、それぞれ構成される。CHは各Igアイソタイプごとに、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ 鎖がそれぞれ知られている。CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインの各ドメインにより構成される。ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、CH2ドメインとCH3ドメインを併せてFc領域または単にFcという。CLは、C λ 鎖およびC κ 鎖が知られている。

[0031] 本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックス (EUNumberingともいう) [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] により、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。具体的には、CH1はEUインデックス

118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはE Uインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はE Uインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はE Uインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0032] 本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより產生される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換細胞により產生される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

[0033] ハイブリドーマとは、非ヒト動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を產生する細胞をいう。したがって、ハイブリドーマが產生する抗体を構成する可変領域は、非ヒト動物抗体のアミノ酸配列からなる。

[0034] 本発明の抗体としては、特に遺伝子工学的に作製された組換えマウス抗体、組換えラット抗体、組換えラビット抗体、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体とも略記する）、ヒト化抗体（ヒト型相補性決定領域CDR移植抗体ともいう）およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体も含まれる。

[0035] キメラ抗体とは、ヒト以外の動物（非ヒト動物）の抗体のVHおよびVLと、ヒト抗体のCHおよびCLからなる抗体を意味する。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

[0036] ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、該モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0037] ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの対応するCDRに移植した抗体をいう。V

HおよびV LのC D R以外の領域はフレームワーク領域（以下、F Rと表記する）と称される。

[0038] ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のV HのC D Rのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のV HのF Rのアミノ酸配列からなるV Hのアミノ酸配列をコードするc D N Aと、非ヒト動物抗体のV LのC D Rのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のV LのF Rのアミノ酸配列からなるV Lのアミノ酸配列をコードするc D N Aを構築し、ヒト抗体のC HおよびC LをコードするD N Aを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0039] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

[0040] ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス (Tomizuka K. et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000) に所望の抗原を免疫することにより、取得することが出来る。また、ヒト由来のB細胞から抗体遺伝子を増幅したp h a g e d i s p l a yライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる (Winter G. et. al., Annu Rev Immunol, 12:433-55, 1994)。さらに、E Bウイルスを用いてヒトB細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる (Rosen A. et. al., Nature 267, 52-54, 1977)。

[0041] ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、E Bウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を得ることができ、該リンパ球を培養した培養物中より該抗体を精製することができる。

[0042] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子を

ファージ遺伝子に挿入することにより F a b、s c F v 等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0043] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスE S細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該E S細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

[0044] 本発明の抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のC D Rを、任意のヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列のいずれでもよい。

[0045] 本発明の抗体におけるC Lのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のアミノ酸配列のC_κまたはC_λが好ましい。

[0046] 本発明の抗体のC Hとしては、イムノグロブリンに属するいかなる分子種のC Hでもよいが、好ましくはI g Gクラスに属するサブクラス、γ 1 (I g G 1 ; 例えばアクセッション番号 A A A 0 2 9 1 4 . 1)、γ 2 (I g G 2 ; 例えばアクセッション番号 A A G 0 0 9 1 0 . 2)、γ 3 (I g G 3 ; 例えばアクセッション番号 P 0 1 8 6 0 . 2) およびγ 4 (I g G 4 ; 例えばアクセッション番号 P 0 1 8 6 1 . 1) のいずれも用いることができる。また、C Hを構成する1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加

されたCHでもよい。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数個、例えば、1～5個のアミノ酸である。CHを構成する1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたCHとして、ヒトIgG1のCHの、EUナンバリングによる239番目のセリンをシステインに置換したIgG1 CH改変体が挙げられる。より具体的には、例えば配列番号79に記載されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1のCHのEUナンバリングによる239番目のセリンをシステインに置換したアミノ酸配列（配列番号80）を含むIgG1 CH改変体が挙げられる。

[0047] 本発明の抗体としては、Fcと抗体断片とが結合したFc融合タンパク質、Fcと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したFc融合タンパク質（イムノアドヘシンともいう）、複数のFc領域を融合させたFc融合タンパク質等も本発明に包含される。また、抗体を安定化させるためおよび血中半減期を制御するために、アミノ酸残基を改変したFc領域なども本発明の抗体に用いることができる。

[0048] 本発明の抗体又は該抗体断片は、翻訳後修飾されたいかなるアミノ酸残基を含む抗体をも包含する。翻訳後修飾としては、例えば、H鎖のC末端におけるリジン残基の欠失〔リジン・クリッピング（*lysine clipping*）〕またはポリペプチドのN末端におけるグルタミン残基のピログルタミン（*pyroGlu*）への変換などが挙げられる〔Beck et al, *Analytical Chemistry*, 85, 715-736 (2013)〕。

[0049] 本発明において、抗体断片とは、ヒトFCRL1の細胞外領域に結合する、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明において抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFvまたはCDRを含むペプチドなどが挙げられる。Fabは、IgG抗体をタンパク質分解酵素パインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合（S-S結合）で結合した、分子量約5万の抗原結合活性を有

する抗体断片である。本発明の抗体断片としては、FCRL1の細胞外領域に結合し、FCRL1の内在化を誘導する抗体断片が好ましい。

[0050] $F(ab')_2$ は、IgGをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。Fab'は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0051] scFvは、1本のVHと1本のVLとを4個のGlyおよび1個のSer残基からなるリンカー（G4S）を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリンカー（P）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0052] Dimerは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0053] dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。

[0054] CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、CDR同士を直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明の改変抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法またはtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0055] 本発明の抗体の一態様としては、下記（a）～（g）から選ばれるいずれ

か一つが挙げられる。

(a) 重鎖可変領域 (heavy chain variable region; 以下VHと略記する) の相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下CDRと略記する) 1～3が、それぞれ配列番号20～22に記載されるアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域 (light chain variable region; 以下VLと略記する) のCDR1～3が、それぞれ配列番号24～26に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(b) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号28～30に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号32～34に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(c) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号36～38に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号40～42に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(d) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号44～46に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号48～50に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(e) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号52～54に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号56～58に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、および

(f) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号60～62に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号64～66に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(g) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号36～38に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号40、71及び42に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

[0056] 本発明の抗体の一態様としては、下記(1a)～(1f)から選ばれるいずれか一つが挙げられる。

(1 a) V Hが、配列番号19に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号23に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(1 b) V Hが配列番号27に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号31に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(1 c) V Hが配列番号35に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号39に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(1 d) V Hが配列番号43に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号47に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(1 e) V Hが配列番号51に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号55に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、および

(1 f) V Hが配列番号59に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号63に記載されるアミノ酸配列を含む抗体

[0057] 本発明の抗体の一態様としては、実施例において後述する、抗ヒトFCRL1マウスモノクローナル抗体DK610、DK681、DK1142、DK1141、DK1166およびDK1164が挙げられる。また、本発明の抗体の一態様として、DK610、DK681、DK1142、DK1141、DK1166およびDK1164のうちいずれか一つの抗体の可変領域を含む抗体が挙げられる。また、本発明の抗体の一態様として、DK610、DK681、DK1142、DK1141、DK1166およびDK1164のうちいずれか一つの抗体のV HのCDR1～3およびV LのCDR1～3のアミノ酸配列を有する抗体などが挙げられる。

[0058] 本発明の抗体の一態様としては、下記(2b-1)～(2b-4)、(2c-1)、(2c-2)及び(2g-1)から選ばれるいずれか一つが挙げられる。

(2b-1) V Hが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-2) V Hが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-3) VHが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-4) VHが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-1) VHが配列番号75に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-2) VHが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2g-1) VHが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号78に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

[0059] 本発明の抗体の一態様として、DK681抗体又はDK1142抗体のVHのCDR1～3およびVLのCDR1～3のアミノ酸配列をヒト抗体のFRに移植したヒト化抗体が挙げられる。そのような抗体としては、例えば、実施例において後述する、DK681 F11、DK681 F12、DK681 F13、DK681 F14、DK1142 F21およびDK1142 F22が挙げられる。また、DK1142抗体のVHのCDR1～3並びにVLのCDR1および3のアミノ酸配列と、DK1142抗体のVLのCDR2を改変したアミノ酸配列とを、ヒト抗体のFRに移植したヒト化抗体として、実施例において後述する、DK1142 F24が挙げられる。

[0060] 本発明の抗体としては、細胞表面に発現するFCRL1に選択的に結合し、FCRL1の内在化 (internalization) を惹起する抗体が挙げられる。また本発明の抗体としては、抗体に薬物を結合してADCにしたときに、強い薬効を示す抗体が挙げられる。

[0061] 本発明の抗体がFCRL1の内在化を惹起していることは、例えば細胞内のリソソームのような低pH環境で蛍光を発する試薬を抗体に結合させて細胞に添加し、蛍光強度を測定することにより確認することができる。

[0062] 本発明の抗体は、薬物またはリンカーと反応し結合を形成することができ

る化学構造を導入した抗体も含む。例えば、 α 、 β 不飽和カルボニル基、 α 、 β 不飽和スルフィニル基、 α 、 β 不飽和スルホニル基、チオール基、水酸基、アミノ基、アミド基、ホルミル基、カルボキシル基、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、ハロアルキル基、カルボニル基などの官能基を有する天然または非天然アミノ酸残基を抗体の重鎖または軽鎖のN末端、C末端またはアミノ酸配列の途中に付加、挿入または置換した抗体、抗体が有する糖鎖に α 、 β 不飽和カルボニル基、 α 、 β 不飽和スルフィニル基、 α 、 β 不飽和スルホニル基、チオール基、水酸基、アミノ基、アミド基、ホルミル基、カルボキシル基、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、ハロアルキル基、カルボニル基などの官能基を有する糖鎖を導入した抗体などが挙げられる。

[0063] 例えば、抗体の特定の位置のアミノ酸残基をシステインに置換した抗体が挙げられる。IgG抗体においてシステインとの置換に適した重鎖のアミノ酸残基としては、例えばE Uナンバリングによる239番目のセリン (Dimasi, N. et. al., Molecular Pharmaceutics. 14, 1501-1516, 2017)、442番目のセリン (Stimmel, JB. et. al., The Journal of Biological Chemistry. 275, 30445-50, 2000)、290番目のリシン (Graziani, EI. et. al., Molecular Cancer Therapeutics. 19, 2068-2078, 2020)、114番目のスレオニン、140番目のアラニン、174番目のロイシン、179番目のロイシン、187番目のスレオニン、209番目のスレオニン、262番目のバリン、371番目のグリシン、373番目のチロシン、382番目のグルタミン酸、424番目のセリン、434番目のアスパラギンおよび438番目のグルタミン (国際公開第2016/040856号) の少なくともいずれか1つが挙げられる。また、システインとの置換に適した κ 軽鎖のアミノ酸残基としては、例えばE Uナンバリングによる183番目のリシン (Graziani, EI. et. al., Molecular Cancer Therapeutics. 19, 2068-2078, 2020)、124番目のグルタミン (Shinmi, D. et. al., Bioconjugate Chemistry. 27, 1324-31, 2016)、106番目のロイシンまたはイソロイシン、10

8番目のアルギニン、142番目のアルギニン及び149番目のリシン（国際公開第2016/040856号）の少なくともいずれか1つが挙げられる。

[0064] また例えばパラアセチルフェニルアラニンが導入された抗体（Skidmore, L. et. al., *Molecular Cancer Therapeutics* 19(9), 1833-1843, 2020）、システイン残基のチオール基を酵素的にホルミル基に変換した抗体（米国特許出願公開第2012/0183566号明細書）、EUナンバリングによる重鎖定常領域の239番目のセリンと240番目のバリンの間にシステインを挿入した抗体（米国特許第10744204号明細書）などが挙げられる。

[0065] 本発明の抗体を含むADCは、抗体と薬物を、直接またはリンカーを介して、化学的に又は遺伝子工学的に結合した分子が含まれる。このようなADC分子中の抗体部分も本発明の抗体に含まれる。

[0066] 本発明のADCに含まれる薬物（本明細書においてペイロードとも記載する）としては、生理活性を有する分子であればいかなるものでもよく、例えば、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、タンパク質、抗体医薬または核酸医薬などが挙げられる。

[0067] ADCは、本発明のヒトFCRL1に結合する抗体または該抗体断片のH鎖若しくはL鎖のN末端、C末端、抗体分子中の適当な官能基または側鎖あるいは糖鎖などと、薬物またはリンカーを化学的手法〔抗体工学入門、地人書館（1994）〕により結合させることにより製造することができる。

[0068] 本発明の抗体また該抗体断片は、公知の方法（例えば、S. J. Walsh et al. *Chem. Soc. Rev.* 2021, 50, 1305-1353; Tumey, L. Nathan (2020). *Antibody-Drug Conjugates -Methods and Protocols: New York, Springer*; および Laurent Ducry (2013). *Antibody-Drug Conjugate: New York, Springer* などに記載の方法）によりリンカーまたは薬剤と結合させることができる。例えば抗体分子（抗体に結合する糖鎖も含む）に導入した α 、 β 不飽和カルボニル基、 α 、 β 不飽和スルフィニル基、 α 、 β 不飽和スルホニル基、チオ

ール基、水酸基、アミノ基、アミド基、ホルミル基、カルボキシル基、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、ハロアルキル基、カルボニル基などの官能基を、薬剤またはリンカーに含まれる官能基と適切な条件で反応させる方法が挙げられる。抗体に含まれる官能基と薬剤またはリンカーに含まれる官能基の組み合わせは公知情報により適切に選択することができる。例えば抗体分子中のチオール基などの求核性官能基と、薬物またはリンカーに含まれる α 、 β 不飽和カルボン酸などのマイケルアクセプターとを求核反応させることにより結合を形成することもできる。また例えば抗体分子中のアジド基と薬物またはリンカーに含まれるアルキニル基を、触媒の存在下または非存在下で環化反応させることにより結合を形成することもできる。

[0069] また、本発明のヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片をコードするDNAと、結合させたいタンパク質または抗体医薬をコードするDNAを、連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

[0070] 放射性同位元素としては、例えば、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu または ^{211}At などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)などが挙げられる。

[0071] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマトラーゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤若しくはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤[臨床腫瘍学、癌と化学療法社(1996)]、ヒドロコチゾン若しくはプレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン若しくはインドメタシンなどの非ステロイド

剤、金チオマレート若しくはペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド若しくはアザチオプリンなどの免疫抑制剤またはマレイン酸クロルフェニラミン若しくはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（192）〕などが挙げられる。

[0072] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタピン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、10-ヒドロキシー-7-エチル-カンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（CPT-11）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、タモキシフェン、ゴセレリン、リユープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、オキサロプラチン、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）誘導体、オーリスタチン類（モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンFなど）、アマニチン、カ

ンプトテシン誘導体（デルクステカン、エキサテカン、SN-38等）、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エルロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3（Flt3）阻害剤、vascular endothelial growth factor receptor（VEGFR）阻害剤、fibroblast growth factor receptor（FGFR）阻害剤、イレッサ若しくはタルセバなどのepidermal growth factor receptor（EGFR）阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オールートランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロロフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、バルテゾミブ、アロプリノール、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミンまたはメイタンシノイド、ドラスタチン10、アクチノマイシン、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、デュオカルマイシンの2量体（CPI-dimer等）、エリ布林あるいはその誘導体などが挙げられる。

[0073] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を抗体または該抗体断片に結合させることにより、（1）化学的、物理

的若しくは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、(2) 血中半減期の顕著な延長、または(3) 免疫原性の消失若しくは抗体産生の抑制、などの効果が期待される〔バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)〕。

[0074] 例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる〔バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)〕。PEG化修飾試薬としては、リジンの ϵ -アミノ基への修飾剤(日本国特開昭61-178926号公報)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤(日本国特開昭56-23587号公報)、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤(日本国特開平2-117920号公報)などが挙げられる。

[0075] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、 β (1 $\rightarrow$ 3)グルカン(例えば、レンチナンまたはシゾフィラン)または α ガラクトシルセラミド(KRN7000)などが挙げられる。

[0076] タンパク質としては、例えば、NK細胞、マクロファージまたは好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子または毒素タンパク質などが挙げられる。

[0077] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン(以下、IFNと記す)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、インターロイキン(以下、ILと記す)-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)などが挙げられる。毒素タンパク質としては、例えば、リシンまたはジフテリアトキシンなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0078] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原、免疫機能を調節する抗原または病変部

位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0079] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、cluster of differentiation (以下、CDと記載する) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7. 1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7. 2)、human leukocyte antigen (HLA) -Class IIまたはEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR) などが挙げられる。

[0080] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子 (例えば、CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3またはB7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド (例えば、CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子 (例えば、DR4、DR5、TNFR1またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL) ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー (例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体、サイトカイン [例えば、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor (TGF) β またはTNF α など] 若しくはこれらのサイトカインの受容体、またはケモカイン (例えば、SLC、ELC、I-309、TARC、MDCまたはCTACKなど) 若

しくはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0081] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、vascular endothelial growth factor (VEGF)、angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、EGF、hepatocyte growth factor (HGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF β 、IL-8、eprhrinまたはSDF-1若しくはこれらの受容体などが挙げられる。

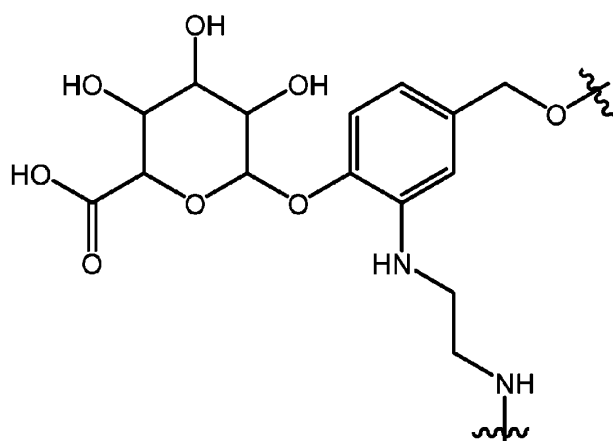
[0082] タンパク質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするcDNAにタンパク質または抗体医薬に含まれる抗体をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

[0083] 核酸医薬としては、例えば、遺伝子の機能を制御することによって生体に作用するsmall interference ribonucleic acid (siRNA) またはmicroRNAなどの核酸を含む医薬品が挙げられる。例えば、Th17細胞のマスター転写因子ROR γ tを抑制する核酸医薬とのコンジュゲートが考えられる。

[0084] 本発明のADCに含まれるリンカーとしては、抗体と薬剤を結合する機能を有するものであればどのような構造でもよい。例えば標的の細胞や組織の近傍または内部で切断されるなどの特別な機能を有する構造や、複数の薬物を結合できるように分岐した構造などを有していてもよい。本発明のADCには例えば、公知のリンカー（例えば、S. J. Walsh et al. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 1305-1353; Tumey, L. Nathan (2020). Antibody-Drug Conjugates -Methods and Protocols: New York, Springer; および Laurent Ducry

(2013). Antibody-Drug Conjugate: New York, Springerなどに記載のリンカー)を使うことができる。具体的には、例えば、ペプチド、オリゴ糖、 $-(CH_2)-$ 、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-(CH_2CH_2O)-$ 、 $-CO-$ 、 $-PO-$ 、アミノ酸、パラアミノベンジル(PAB)、炭素数が3~10の環状アルキル、および下記式で示される構造からなる群から選択されるいずれか1からなるリンカー、または上記群から選ばれる二以上の単位を連結してなる構造を含むリンカーが挙げられる。

[0085] [化1]

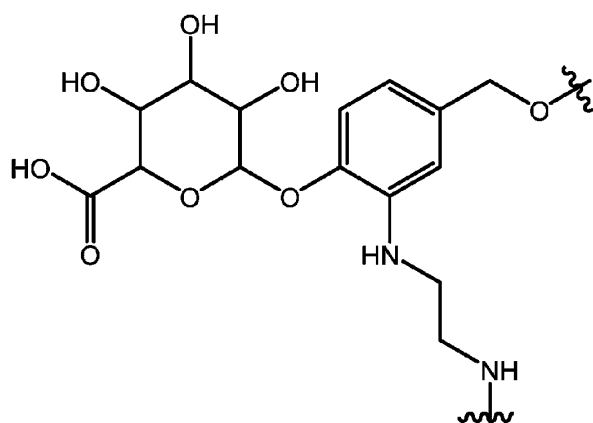


[0086] リンカーを構成するアミノ酸としては、例えば、バリン(Val)、シトルリン(Cit)、フェニルアラニン(Phe)、リシン(Lys)、D-バリン(D-Val)、ロイシン(Leu)、グリシン(Gly)、アラニン(Ala)、アスパラギン(Asn)などが挙げられる。

[0087] リンカーの一態様として、例えば、ペプチド、オリゴ糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、 $-CO-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、Gly-Gly-Phe-Gly-PAB、 $-Gly-Gly-Phe-Gly-CH_2-O-CH_2-CO-$ 、および下記式で示される構造から

なる群から選ばれるいずれか1つを含むリンカー、および上記群から選ばれる2以上の単位を連結した構造を含むリンカーがあげられる。

[0088] [化2]



[0089] ここで、 n は1～1000の整数、好ましくは1～100の整数、より好ましくは1～50の整数、さらに好ましくは1～20の整数、最も好ましくは1～15の整数を表す。またAcはアセチル基を表す。Lys (Ac) はリシンの側鎖のアミノ基がアセチル化されていることを表す。

[0090] リンカーの一態様として、例えば、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Cit-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Ala-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Lys(Ac)-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Phe-Lys-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Phe-Lys(Ac)-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Ala-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-D-Val-Leu-Lys$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Gly-Gly-Arg$ 、 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Ala-Ala-Asn-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-NH-CO-cBu-CO-Cit-PAB$ 、 $-(CH_2)_m-Gly-Gly-Phe-Gly-CH_2-O-CH_2-CO-$ のいずれか1つを含むリン

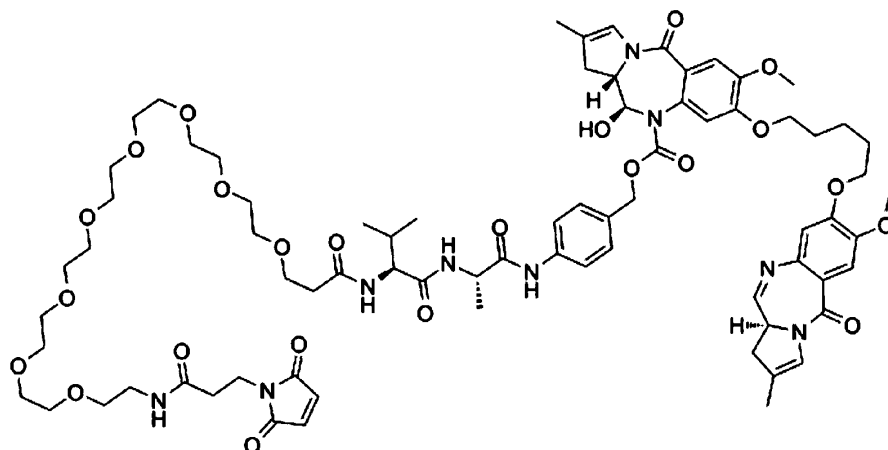
カーが挙げられる。ここで、 m は1～10の整数を表し、好ましくは1である。 n は、それぞれ1～1000の整数、好ましくは1～100の整数、より好ましくは1～50の整数、さらに好ましくは1～20の整数、最も好ましくは1～15の整数を表す。またAcはアセチル基を表す。Lys (Ac) はリシンの側鎖のアミノ基がアセチル化されていることを表す。

[0091] 抗体と結合する前のリンカーは抗体および薬物と結合できる官能基を有していることが好ましい。このような官能基の例として α , β 不飽和カルボニル基、 α , β 不飽和スルフィニル基、 α , β 不飽和スルホニル基、チオール基、アミノ基、ヒドロキシアミノ基、ヒドラジド基、ヒドラジル基、アミド基、ホルミル基、カルボキシル基、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、ハロアルキル基などが挙げられる。 α , β 不飽和カルボニル基、アミド基、カルボキシル基のカルボニル炭素原子に隣接する原子ならびに α , β 不飽和カルボニル基および α , β 不飽和スルフィニル基の硫黄原子に隣接する分子としては炭素、酸素、窒素、硫黄原子などが挙げられる。上記の α , β 不飽和カルボニル基としては、例えば、マレイミド基が挙げられる。上記のアルケニル基としては、例えば、ビニルピリジル基が挙げられる。上記のアルキニル基としては、例えばBCN基 (Bicyclo「6. 1. 0」non-4-yne) およびDBCO基 (Dibenzocyclooctyne) があげられる。

本発明のADCにおける、抗体を除いたリンカー薬物部分をリンカーペイロードとも呼ぶ。本発明のリンカーペイロードとしては、例えば下記式で表されるSG3249 (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987) などの、PBDダイマーペイロードリンカーが挙げられる。

[0092]

[化3]



[0093] 本発明の抗体の誘導体をヒトFCRL1の検出および測定ならびにヒトFCRL1関連疾患の診断に使用する場合に、当該抗体に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ若しくはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル若しくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）などの蛍光物質などが挙げられる。

[0094] また、本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する組成物を含む。

[0095] また、本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、ヒトFCRL1関連疾患の治療薬に関する。また、本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を投与することを含む、ヒトFCRL1関連疾患の治療方法に関する。

[0096] ヒトFCRL1関連疾患としては、ヒトFCRL1又はヒトFCRL1のリガンドが関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば、がん、自己免疫疾患および炎症性疾患が挙げられる。がん疾患としては、例えば、び

まん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、マントル細胞リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、などが挙げられる。自己免疫疾患または炎症性疾患としては、例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、慢性閉塞肺疾患、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、喘息、アトピー性皮膚炎症性大腸炎、クローン病またはベーチェット病などが挙げられる。

- [0097] 本発明の抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。
- [0098] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与を挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。
- [0099] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ である。
- [0100] 本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する、FCRL1の検出または測定用試薬に関する。また、本発明は、ヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたFCRL1の検出または測定方法に関する。本発明においてヒトFCRL1を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。
- [0101] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素

免疫測定法（E I AまたはE L I S A）、蛍光免疫測定法（F I A）、発光免疫測定法（l u m i n e s c e n t i m m u n o a s s a y）、ウエスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0102] 本発明はヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を含む、FCRL1関連疾患の診断薬、またはヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いてFCRL1の検出または測定を含む、FCRL1関連疾患の診断方法に関する。本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、上記の方法に従いヒトFCRL1が発現した細胞を検出または測定することにより、ヒトFCRL1が関連する疾患を診断することができる。

[0103] 本発明においてヒトFCRL1を検出または測定する対象となる生体試料としては、例えば、組織、細胞、血液、血漿、血清、腓液、尿、糞便、組織液または培養液など、ヒトFCRL1又はヒトFCRL1が発現している細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0104] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などが挙げられる。検出用試薬としては、該モノクローナル抗体若しくは該抗体断片を認識する標識された2次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0105] また、本発明はFCRL1関連疾患の治療薬若しくは診断薬の製造のための、抗ヒトFCRL1モノクローナル抗体または該抗体断片の使用に関する。

[0106] 以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0107] 1. 抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるヒトFCRL1またはヒトFCRL1発現細胞は、ヒトFCR

L 1 全長またはその部分長をコードする cDNA を含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞または動物細胞などに導入することで得ることができる。また、ヒト FCRL 1 は、ヒト FCRL 1 を多量に発現している各種ヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などからヒト FCRL 1 を精製することによっても得ることができる。また、これらヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などをそのまま抗原として使用することもできる。さらに、Fmoc 法または tBoc 法などの化学合成法によりヒト FCRL 1 の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。ヒト FCRL 1 またはヒト FCRL 1 の部分配列を有する合成ペプチドには、C 末端または N 末端に FLAG または His などの公知のタグが付加されていてもよい。

[0108] 本発明で用いられるヒト FCRL 1 は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) や Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該ヒト FCRL 1 をコードする DNA を宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

[0109] まず、ヒト FCRL 1 をコードする部分を含む完全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長 cDNA の代わりに、完全長 cDNA をもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

[0110] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードする DNA を転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるも

のであればいずれも用いることができる。

- [0111] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ヒトFCRL1をコードする部分を含むDNA、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。
- [0112] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（SD配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。
- [0113] また、該ヒトFCRL1をコードするDNAの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするヒトFCRL1の生産率を向上させることができる。
- [0114] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pBT rp2、pBT ac1、pBT ac2（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pKYP10（日本国特開昭58-110600号公報）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript IISK（-）（ストラタジー社製）、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌IGHA2 (FERM BP-400) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pGKA2 [大腸菌IGKA2 (FERM BP-6798) よ

り調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pTerm2 (米国特許第4,686,191号明細書、米国特許第4,939,094号明細書、米国特許第160,735号明細書)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (ファルマシア社製)、pETシステム (ノバジェン社製) またはpME18SFL3などが挙げられる。

[0115] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターまたはT7プロモーターなどの、大腸菌またはファージなどに由来するプロモーターが挙げられる。また、例えば、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーターまたはletIプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなどが挙げられる。

[0116] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌XL1-Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No. 49、大腸菌W3110、大腸菌NY49または大腸菌DH5 α などが挙げられる。

[0117] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] が挙げられる。

[0118] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pcDNA1、pCDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 [日本国特開平3-22979号公報; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (日本国特開平2-227075号公報)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社製)、pcDNA3.1 (

インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE 103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93 (国際公開第97/10354号)、N5KG1val (米国特許第6,001,358号明細書)、INPEP4 (Biogen-IDEC社製) およびトランスポゾンベクター (国際公開第2010/143698号) などが挙げられる。

[0119] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の immediate early (IE) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーターまたはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0120] 宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞Namalwa細胞、サル細胞COS細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO細胞 [Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883-900)] ; ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞 (CHO/DG44細胞) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUkXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies, Cat #11619)、Pro-3、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (またはYB2/0ともいう)

、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/O-Ag14、シリアンハムスター細胞BHKまたはHBT5637（日本国特開昭63-000299号公報）などが挙げられる。

[0121] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（日本国特開平2-227075号公報）またはリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、などが挙げられる。

[0122] 以上のようにして得られるヒトFCRL1をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物または動物細胞などの由来の形質転換体を培地中で培養し、培養液中に該ヒトFCRL1を生成蓄積させ、該培養液から採取することにより、ヒトFCRL1を製造することができる。該形質転換体を培地中で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0123] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたヒトFCRL1を得ることができる。

[0124] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドなどを、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

[0125] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 若しくはIscove's Modified Dulbecco's Medium (I

MDM) 培地またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常 pH 6~8、30~40℃、5%CO₂ 存在下などの条件下で 1~7 日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシンまたはペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0126] ヒトFCRL1 をコードする遺伝子の発現方法としては、例えば、直接発現以外に、分泌生産または融合タンパク質発現などの方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] が挙げられる。

[0127] ヒトFCRL1 の生産方法としては、例えば、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法が挙げられ、使用する宿主細胞または生産させるヒトFCRL1 の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

[0128] ヒトFCRL1 が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本国特開平05-336963号公報または国際公開第94/23021号などに記載の方法を用いることにより、ヒトFCRL1 を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系 (日本国特開平2-227075号公報) を利用してヒトFCRL1 の生産量を上昇させることもできる。

[0129] 得られたヒトFCRL1 は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。ヒトFCRL1 が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザーまたはダイノミルなどを用いて細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75

(三菱化学社製)などのレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製)などのレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせを用い、精製標品を得ることができる。

[0130] ヒトFCRL1が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ヒトFCRL1の不溶体を回収する。回収した該ヒトFCRL1の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ヒトFCRL1を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0131] ヒトFCRL1またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ヒトFCRL1またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0132] 本発明において用いられるヒトFCRL1のアミノ酸配列の部分配列を含むポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができる。具体的には、ヒトFCRL1のアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記の方法に準じて、ヒトFCRL1のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

[0133] また、本発明において用いられるヒトFCRL1は、Fmoc法またはtBoc法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロ

テインテクノロジーインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0134] (2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3～20週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、マウスFCRL1ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0135] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロイン드의完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）またはKLH（Keyhole Limpet hemocyanin）などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0136] 抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0137] 抗原の最終投与後3～7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0138] (3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1（P3-U1） [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41（NS-1） [European

J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)] または P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)] などが用いられる。

[0139] 該骨髓腫細胞は、正常培地〔グルタミン、2-メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、FBS、および8-アザグアニンを加えたRPMI1640培地〕で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

[0140] (4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2) で得られる融合用抗体産生細胞と(3) で得られる骨髓腫細胞をMinimum Essential Medium (MEM) 培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髓腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール1000 (PEG-1000)、MEM培地およびジメチルスルホキシドの混液を37℃で、攪拌しながら加える。さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にHAT培地〔ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地〕中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を5%CO₂インキュベーター中、37℃にて7～14日間培養する。

[0141] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、ヒトFCRL1を含む抗原に反応し、ヒトFCRL1を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを行い、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0142] (5) 精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan)] 0.5 mL を腹腔内投与し、2週間飼育する] した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10~21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40~50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGまたはIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0143] また、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10% FBS を添加した RPMI 1640 培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma SFM 培地に懸濁し、3~7日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインA-カラムまたはプロテインG-カラムによる精製を行ない、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma SFM 培地には5% ダイゴ GF21 を添加することもできる。

[0144] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。タンパク質量の定量は、ローリー法または280 nm での吸光度より算出する。

[0145] (6) モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示すように、フローサイトメトリーを用いて、ヒトFCRL1発現細胞への抗体の結合性を測定することなどにより行う。ヒトFCRL1発現細胞は、細胞表面上にヒトFCRL1が発現していればいずれの細胞でもよく、例えば、ヒト細胞、ヒト細胞株および(1) で得られるヒトFCRL1強制発現細胞株などが挙げられる。

[0146] ヒトFCRL1発現細胞を96ウェルプレートなどのプレートに分注した後、第1抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清又は精製モノクローナ

ル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。反応後の細胞を1～10% bovine serum albumin (BSA) を含むPBS（以下、BSA-PBSと記す）などで、よく洗浄した後、第2抗体として蛍光試薬などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。BSA-PBSなどでよく洗浄した後、フローサイトメーターを用いて標識化抗体の蛍光量を測定することにより、ヒトFCRL1発現細胞に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0147] また、本発明の抗体と競合してヒトFCRL1に結合する抗体は、上述のフローサイトメトリーを用いた測定系に、被験抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被験抗体を加えた時に本発明の抗体とヒトFCRL1との結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、ヒトFCRL1のアミノ酸配列、又はその立体構造への結合について、本発明の抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

[0148] また、本発明のヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体が結合するエピトープを含むエピトープに結合する抗体は、上述のスクリーニング方法で取得された抗体のエピトープを公知の方法で同定し、同定したエピトープを含む合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで取得することができる。

[0149] 更に、本発明のヒトFCRL1に結合するモノクローナル抗体が結合するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のスクリーニング方法で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

[0150] 2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。遺伝子組換えのマウス抗体、ラット抗体およびラビット抗体なども同様の方法で作製することができる。

[0151] (1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のC HおよびC LをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のC HおよびC LをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0152] ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のC HおよびC Lを用いることができる。例えば、ヒト抗体の $\gamma 1$ サブクラスのC Hおよび κ クラスのC Lなどを用いる。ヒト抗体のC HおよびC LをコードするDNAには、c DNAを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることもできる。ヒト抗体のC HまたはC LをコードするDNAに、アミノ酸残基をコードするコドンが付加、挿入または置換することにより、該当する位置にアミノ酸残基を付加、挿入または置換することができる。動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、p A G E 1 O 7 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)]、p A G E 1 O 3 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p H S G 2 7 4 [Gene, 27, 223 (1984)]、p K C R [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、p S G 1 b d 2 - 4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)] または p S E 1 U K 1 S e d 1 - 3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)] などを用いる。動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、S V 4 Oの初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスL T R [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)] または免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] などが挙げられる。

[0153] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体H鎖およびL鎖が同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を用いるが、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。

。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、p K A N T E X 9 3 (国際公開第 9 7 / 1 0 3 5 4 号公報)、p E E 1 8 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などを用いる。

[0154] (2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

[0155] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分またはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VH若しくはVLをコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

[0156] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスターまたはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0157] ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、またはRNA easy kit (キアゲン社製)などのキットなどを用いる。

[0158] 全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、またはOligo-dT 30<Super>mRNA Purification (登録商標) Kit (タ

カラバイオ社製)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation (登録商標) Kit (インビトロジェン社製)、またはQuickPrep mRNA Purification (登録商標) Kit (ファルマシア社製)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。

[0159] cDNAの合成およびcDNAライブラリーの作製には、公知の方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]、またはSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (インビトロジェン社製)若しくはZAP-cDNA Synthesis (登録商標) Kit (ストラタジーン社製)などのキットなどを用いる。

[0160] cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAP II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、λExCell、pT7T3-18U (ファルマシア社製)、pCD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] またはpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] などを用いる。

[0161] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌には、該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]

、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] またはJM105 [Gene, 38, 275 (1985)] などを用いる。

[0162] cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択には、アイソトープ若しくは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などを用いる。

[0163] また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction法 [以下、PCR法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)] を行うことよりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

[0164] 選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK (-) (ストラタジーン社製) などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該cDNAの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] などの反応を行った後、ABI PRISM 3700 (PEバイオシステムズ社製) またはA. L. F. DNAシーケンサー (ファルマシア社製) などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

[0165] 決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に

関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することによって見出すことができる。

[0166] また、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、SWISS-PROTまたはPIR-Proteinなどの任意のデータベースに対してBLAST法 [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] などの類似性検索を行い、VHおよびVLの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

[0167] (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の upstream に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0168] 非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したVHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の upstream にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0169] また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増

幅し、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0170] (4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。

[0171] 非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い類似性（少なくとも60%以上）のFRのアミノ酸配列を選択する。

[0172] 次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。

[0173] 設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR反応を行う。この場合、PCR反応での反応効率及び合成可能なDNAの長さから、好ましくはVH、VL各々について各6本の合成DNAを設計する。さらに、両端に位置する合成DNAの5'または3'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAを、(1)で得られる遺伝

子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0174] PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(−) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2)に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

[0175] または、設計したDNA配列に基づき、VH全長およびVL全長を各々1本の長鎖DNAとして合成したものを、上記PCR増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成長鎖DNAの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAを、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0176] (5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。ヒト化抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0177] 抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)]またはコンピューターモデリング[Protein Engineering, 7, 1501 (1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有するヒト化抗体を

取得できる。

[0178] ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、改変させることができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0179] (6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

[0180] 例えば、(4)および(5)で得られるヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'または3'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0181] (7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3)および(6)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0182] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞[American Type Culture Collection(ATCC)番号:CRL1651]を用いる[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991)]。

[0183] COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press (1991)]、またはリポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などを用いる。

- [0184] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを用いて測定する。
- [0185] (8) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製
- (3) および (6) で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法 [日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)] などを用いる。
- [0186] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies、Cat # 11619)、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC番号:CRL1662、またはYB2/Oともいう)、マウスミエローマ細胞NS0、マウスミエローマ細胞SP2/O-Ag14 (ATCC番号:CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC番号:CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (Dihydroforate Reductase、以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞 (CHO/DG44細胞) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)] などを用いる。
- [0187] また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素などのタンパク質、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグ

ルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素などのタンパク質若しくは細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えば $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第2005/035586号公報、国際公開第02/31140号公報）、レクチン耐性を獲得したLecl3 [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)] などを用いることもできる。

[0188] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G418硫酸塩（以下、G418と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平2-257891号公報）。

[0189] 動物細胞培養用培地には、RPMI 1640培地（インビトロジェン社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL 301培地（ジェイアールエイチ社製）、IMDM培地（インビトロジェン社製）若しくはHybridoma SFM培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にFBSなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はELISA法などにより測定できる。また、dhfr遺伝子増幅系（日本国特開平2-257891号公報）などを利用して、形質転換株の産生する遺伝子組換え抗体の発現量を向上させることができる。

[0190] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインA-カラムを用いて精製する [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などのタンパク質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

[0191] 精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [Nature, 227, 680 (1970)]、またはウェスタンブロットティング法 [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] など用いて測定することができる。

[0192] 3. 精製モノクローナル抗体または該抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

[0193] 本発明の抗体または該抗体断片のヒトFCRL1に対する結合活性は、前述の1-(6)記載のフローサイトメトリーを用いて測定する。また、蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] などを用いて測定できる。

[0194] ヒトFCRL1発現細胞に対するCDC活性、又はADCC活性は公知の測定方法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993); Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)] により測定することができる。

[0195] 4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明のモノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体のFc領域の297番目のアスパラギン (Asn) に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に $\alpha 1, 6$ 結合するフコース (コアフコースともいう) の量を制御する方法 (国際公開第2005/035586号公報、国際公開第2002/31140号公報、国際公開第00/61739号公報)、又は抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明のモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

[0196] エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存

性の活性をいい、ADCC活性、CDC活性、又はマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス (Antibody-dependent phagocytosis、ADP活性) などが知られている。

[0197] エフェクター活性の測定法として、例えば、標的として炎症性細胞、エフェクターとしてヒト末梢血単核球 (PBMC)、そして炎症性細胞特異的な抗体を混合し、4時間程度インキュベーションした後、細胞傷害の指標として遊離してきた乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定することができる。若しくは、ヒト全血に、例えばCD20の様な血液細胞特異的な抗原を認識する抗体を添加し、インキュベーションした後、標的となる血液細胞数の減少をエフェクター活性として測定することができる。または、例えば、ヒト全血に別の標的細胞を混合し、さらに標的細胞に特異的な抗体を添加しインキュベーションした後、標的細胞数の減少をエフェクター活性として測定することができる。いずれの場合においてもエフェクター活性は、遊離LDH法、遊離 ^{51}Cr 法またはフローサイトメトリー法などによって測定することができる。

[0198] 抗体のFcのN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加又は低下させることができる。抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、 $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。

[0199] 一方、抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、 $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。

[0200] また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性又は

CDC活性を増加又は低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第2007/0148165号明細書に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。

[0201] また、米国特許第6,737,056号明細書、米国特許第7,297,775号明細書又は米国特許第7,317,091号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ADCC活性又はCDC活性を、増加させることも低下させることもできる。また本発明の抗体には、上述の抗体定常領域におけるアミノ酸改変または糖鎖改変に合わせて、例えば、日本国特開第2013-165716号公報または日本国特開第2012-021004号公報などに記載のアミノ酸改変を行うことにより、Fc受容体への反応性を制御することで血中半減期を制御した抗体も含まれる。

[0202] さらに、上述の方法を組み合わせ、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性や血中半減期が制御された抗体を取得することができる。

[0203] 5. 本発明の抗FCRL1モノクローナル抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体の作製方法

本発明の抗FCRL1モノクローナル抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体は、モノクローナル抗体と薬物を化学的、酵素的、または遺伝子工学的手法で結合することにより作製することができる。

[0204] (1) 化学的な手法でモノクローナル抗体と薬物を結合する方法

2. (1)に記載の方法で任意の位置に適切な置換基を有するアミノ酸残基を付加、挿入または置換することにより、抗体に反応性置換基を導入する。また、抗体に対し還元、加水分解または酵素分解などにより任意の位置の結合を開裂し、反応性置換基とすることもできる。さらに抗体分子に含まれる糖鎖に対し、グリコシダーゼや糖転移酵素などの酵素を使って反応性置換基を有する糖を導入することもできる。このような反応性置換基としては、例えば、 α , β 不飽和カルボニル基、 α , β 不飽和スルフィニル基、 α , β 不飽和スルホニル基、チオール基、アミノ基、アミド基、ホルミル基、カル

ボキシル基、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、ハロアルキル基、カルボニル基などが挙げられる。

[0205] 抗体に導入された反応性官能基と反応可能な化学構造を薬物またはリンカーに導入し、適切な反応条件で反応させることにより抗体と薬物またはリンカーを結合する。リンカーは、抗体と反応する前に薬物と結合させても、抗体と反応後に薬物と結合させてもよい。リンカーと薬物は公知の方法（例えば、S. J. Walsh et al. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 1305-1353; Tumey, L. Nathan (2020). Antibody-Drug Conjugates -Methods and Protocols: New York, Springer; および Laurent Ducry (2013). Antibody-Drug Conjugate: New York, Springerなどに記載の方法）により結合させることができる。

（２）酵素的な手法でモノクローナル抗体と薬物を結合する方法

２．（１）に記載の方法で例えば抗体のＣ末端に、特定の酵素により認識されるアミノ酸配列を付加、または置換する。このようなアミノ酸配列として、例えばファルネシルトランスフェラーゼやゲラニルトランスフェラーゼなどにより認識されるＣ a a X タグ（Ｃはシステイン、a は任意の脂肪族アミノ酸、X はＣ末端アミノ酸を示す）が挙げられる。

抗体に導入されたアミノ酸配列を認識する酵素により転移される官能基を、薬物またはリンカーに導入し、適切な条件で、上記アミノ酸配列と酵素反応することにより抗体と薬物またはリンカーを結合する。例えば、上記Ｃ a a X タグに対応する官能基としては、ゲラニル基やファルネシル基などのプレニル基が挙げられる。リンカーは、抗体と反応する前に薬物と結合させても、抗体と反応後に薬物と結合させてもよい。リンカーと薬物は公知の方法により結合させることができる。

[0206] （３）遺伝子工学的な手法でモノクローナル抗体と薬物を結合する方法

薬物がタンパク質またはペプチドの場合、該タンパク質またはペプチドをコードするＤＮＡを設計し、抗体遺伝子の任意の位置に付加、挿入、または置換して２と同様の方法により発現させることによりモノクローナル抗体と薬物を結合させることができる。

[0207] 6. 本発明の抗ヒトFCRL1モノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、FCRL1が発現する疾患であれば、いずれのヒトFCRL1関連疾患の治療に用いることができる。

[0208] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0209] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0210] 経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などが挙げられる。

[0211] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0212] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0213] 非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤または噴霧剤などである

。注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0214] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適切な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0215] 7. 本発明の抗ヒトFCRL1モノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体もしくは該抗体断片または抗体薬物複合体を用いて、ヒトFCRL1またはヒトFCRL1が発現した細胞を検出または測定することにより、ヒトFCRL1関連疾患を診断することができる。

[0216] ヒトFCRL1関連疾患であるがん疾患、自己免疫疾患および炎症性疾患の診断は、例えば患者体内に存在するヒトFCRL1を免疫学的手法により検出または測定して行うことができる。また、患者体内の細胞に発現しているヒトFCRL1をフローサイトメトリーなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

[0217] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

[0218] 放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または該抗体断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0219] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発

明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに酵素などで標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、基質を添加して反応液の吸光度を吸光度計で測定する。例えばサンドイッチELISA法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知〔酵素免疫測定法、医学書院（1987）〕の酵素標識を用いることができる。

[0220] 例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識またはビオチン標識などを用いる。サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、第1の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、次に第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素またはビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破碎液、組織またはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作成した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab' またはF(ab')₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0221] 蛍光免疫測定法は、文献〔Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）〕などに記載された方法で測定する。

蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知〔蛍光抗体法、ソフトサイエンス社（１９８３）〕の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITCまたはRITCなどを用いる。

[0222] 発光免疫測定法は文献〔生物発光と化学発光 臨床検査４２、廣川書店（１９９８）〕などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステルまたはロフィンなどを用いる。

[0223] ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）-PAGE（ポリアクリルアミドゲル）〔Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。

[0224] 一例を以下に示す。配列番号３または４のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1～30μgをSDS-PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1～10%BSAを含むPBS（以下、BSA-PBSと表記する）に室温で30分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05～0.1%のTween-20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。Tween-PBSで洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号３または４のアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天

然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0225] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるヒトFCRL1と本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法〔臨床検査法提要、金原出版（1998）〕などを用いることもできる。ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径0.1～1 μ m程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0226] ヒトFCRL1が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、中でも、免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いることが好ましい。

[0227] 免疫沈降法は、ヒトFCRL1を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片と反応させた後、プロテインGーセファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行うことができる。ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を固相化した後、BSA-PBSによりブロッキングする。抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテインAまたはプロテインGなどをあらかじめELISA用96ウェルプレートに固相化し、BSA-PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、BSA-PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、ヒトFCRL1を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプル

バッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0228] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらに FITC などの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] により検出を行うことができる。特に、ヒト FCRL1 に結合する、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、蛍光抗体染色法により天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出ができる。

[0229] また、蛍光抗体染色法のうち、FMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

[0230] 8. 本発明の抗ヒト FCRL1 モノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体もしくは該抗体断片または抗体薬物複合体は、ヒト FCRL1 が関連する疾患であれば、いずれのヒト FCRL1 関連疾患の治療に用いることができる。

[0231] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される 1 以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0232] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態とし

ては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0233] 経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などが挙げられる。

[0234] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、 p -ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0235] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0236] 非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤または噴霧剤などである。注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0237] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0238] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0239] [実施例 1] 公知抗 F C R L 1 キメラ抗体の作製

公知の E 3 及び E 9 (Blood, 2008, 111, 338-43)、1 F 9 及び 2 A 1 0 (国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 3 2 9 9 号)、ならびに 7 G 8、2 G 5 および 5 A 2 (国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 7 1 8 5 号) の可変領域のアミノ酸配列情報をもとにキメラ抗体を作製した。それぞれの抗体の重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) のアミノ酸配列を表 1 に示す。

[0240] [表1]

クローン名	VH	VL
E 3	配列番号 5	配列番号 6
E 9	配列番号 7	配列番号 8
1 F 9	配列番号 9	配列番号 1 0
2 A 1 0	配列番号 1 1	配列番号 1 2
7 G 8	配列番号 1 3	配列番号 1 4
2 G 5	配列番号 1 5	配列番号 1 6
5 A 2	配列番号 1 7	配列番号 1 8

[0241] キメラ抗体の発現ベクターは、V H 領域を p F U S E - C H I g - h G 1 プラスミドベクター、V L 領域を p F U S E 2 - C L I g - h k プラスミドベクターにそれぞれ挿入し構築した。重鎖の定常領域の 2 3 9 番 (E U ナンバリング) のセリンをシステインに変換したベクターを使用した。これらのベクターと E x p i 2 9 3 E x p r e s s i o n S y s t e m (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を使用して、ヒト型キメラ抗体を産生した。手順は付属マニュアルに従い以下のように行った。

[0242] 1 反応あたり 7.5×10^8 個の E x p i 2 9 3 F 細胞 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) を 2 5 5 m L の E x p i 2 9 3 E x p r e s s i o n M e d i u m (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) に加えた。O p t i - M E M (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社) に $200 \mu g$ の p F U S E - C H I g - h

G1プラスミドベクター、100 μ gのpFUSE2-CLlg-hkプラスミドベクターおよびExpiFectamin 293 Reagent (Thermo Fisher Scientific社)を添加し、20分間静置した後に、該プラスミド溶液を上記の細胞含有液に添加した。さらに一晩の培養後に、該細胞含有液にExpiFectamin 293 Transfection Enhancerを添加した(培養ボリュームはトータルで300mL)。該細胞含有液をさらに2日間培養した後に、培養上清を回収した。

[0243] 抗体の精製には、MabSelect SuRe (GE Healthcare社)を使用した。回収した培養上清を遠心分離し、得られた培養上清をフィルターでろ過した。カラムに1mLの担体を充填し、DPBSでバッファーを置換した。該カラムに培養上清を添加し、担体に抗体を吸着させた後に、該カラムを10mLのDPBSで2回洗浄した。該カラムに2.5mLのArg-Antibody Elution Buffer (ナカライテスク社)を添加して抗体を溶出させた。NAPカラム (GE Healthcare社)を用いて該抗体溶液を脱塩し、以降の解析に使用した。

[0244] 得られた抗体は重鎖の239番目(EUナンバリング)のセリンがシステインに置換されたIgG1抗体(以下S239C変異ともいう)である。S239C変異を含む重鎖定常領域は配列番号80に記載されるアミノ酸配列を含む。なお、E3、2G5および5A2は作製したところ凝集体が検出されたため、ADC化に供しなかった。

[0245] [実施例2] 公知抗FCRL1キメラ抗体のADCの作製

ADCはBioconjug Chem 2013, 24(7), 1256-1263に記載の方法などにより作製することができる。実施例1により作製した、S239C変異を有するFCRL1キメラ抗体にPBDダイマーペイロードリンカーであるSG3249 (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987)を反応させることでADCを作製した。

[0246] 薬物抗体比(Drug-to-antibody ratio; DAR)の

分析は、還元剤による前処理により、ADCを軽鎖フラグメントと重鎖フラグメントへと変換した上で、高速液体クロマトグラフィー装置及び逆相カラム（逆相HPLC）を用いて行うことができる。未反応の軽鎖、薬物が結合した軽鎖、未反応の重鎖、薬物が結合した重鎖のピーク面積比からDARを算出する。作製した全てのADCの薬物抗体比は1.8～1.9であった。また、2A10はDARをコントロールしたADCを作製することが困難であったため、評価から除外した。

[0247] また、Clin Cancer Res 2005, 11(8), 3126-3135に記載の抗2,4-dinitrophenol (DNP) IgG1抗体 (S239C変異) をコードするベクターを用い、実施例1に記載の方法に準じて作製したDNP抗体について、同様の手法によりADC (抗DNP抗体-AADC) を作製し、以下の試験ではネガティブコントロールとして使用した。

[0248] [実施例3] 公知抗FCRL1キメラ抗体のADCのin vivo薬効評価

5週齢の雄性SCIDマウスの腹側皮下に50 vol% Matrigel (Corning) を含むPhosphate Buffered Saline (PBS) に懸濁したSU-DHL-6細胞を 1×10^7 個/0.1 mL/headで移植した。移植後21日目に腫瘍体積が 120 mm^3 以上の個体を選択し、群分けした。

[0249] 群分け日をday 0として、day 0に $0.3 \text{ mg/kg body weight}$ の希釈した公知FCRL1キメラ抗体-AADCまたは $0.4 \text{ mg/kg body weight}$ の抗DNP抗体-AADCを尾静脈内に投与した。Vehicleの組成は 10 mmol/L L-グルタミン酸ナトリウム、 262 mmol/L D-ソルビトール、 0.05 mg/mL ポリソルベート80、pH 5.5である。マウスの腫瘍体積及び体重は週2回測定した。結果を図1に示す。なお、公知抗ヒトFCRL1キメラ抗体のADCは、実施例2で作製したADCを用いた。

[0250] 図1に示すように公知抗ヒトFCRL1抗体のADCとして7G8-AD

Cが最も強い抗腫瘍活性を示した。R a m o s細胞皮下移植マウスモデルでも同様に7 G 8－A D Cが最も強い抗腫瘍活性を示した（詳細は省略）。

[0251] [実施例4] 新規抗ヒトFCRL1マウス抗体の取得

免疫ホストとしてA/J、BALB/cまたはC57BL6マウス（いずれも日本SLC）を用い、免疫原としては、ヒトFCRL1（NP__443170.1）の全長、カニクイザルFCRL1（XP__015310712.1）の全長、もしくはその変異体を発現するプラスミドベクター（15－50 μ g）、ヒトFCRL1細胞外ドメインとC末His TagまたはR a b b i t I g G 1－F cの融合タンパク質（10－25 μ g）、またはヒトFCRL1、カニクイザルFCRL1もしくはその変異体を一過性に発現させた293T細胞（0.5－2.0 $\times 10^7$ 個）を用いた。

[0252] これらのいずれか1つ、または複数の免疫原を種々のレジメンに基づき10－50日間隔で3－8回、筋注、皮内投与、腹腔内投与、または静注した。アジュバントを用いた場合には、Sigma adjuvant system（Sigma-Aldrich）を用いた。抗血清の各種抗原発現細胞に対する反応性評価に基づき、マウスを選択し、最終免疫から3日後に脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3U1との細胞融合を行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。

[0253] 取得した新規抗FCRL1マウス抗体のうち、セカンドイムノトキシンを用いたi n v i t r o抗細胞活性、およびカニクイザルFCRL1への交差反応性に基づくスクリーニングを行い、さらにADC化のための抗体工学的改変に適したアミノ酸配列かどうかの観点から、ADC化する抗体を選抜した。選抜された6抗体（DK610、DK681、DK1142、DK1141、DK1166およびDK1164）のVHおよびVL、ならびに重鎖CDR1～3（HCDR1～3）および軽鎖CDR1～3（LCDR1～3）のアミノ酸配列を表2に示す。

[0254]

[表2]

クローン名	VH	HCD R1	HCD R2	HCD R3	VL	LCD R1	LCD R2	LCD R3
DK610	配列番号19	配列番号20	配列番号21	配列番号22	配列番号23	配列番号24	配列番号25	配列番号26
DK681	配列番号27	配列番号28	配列番号29	配列番号30	配列番号31	配列番号32	配列番号33	配列番号34
DK1142	配列番号35	配列番号36	配列番号37	配列番号38	配列番号39	配列番号40	配列番号41	配列番号42
DK1141	配列番号43	配列番号44	配列番号45	配列番号46	配列番号47	配列番号48	配列番号49	配列番号50
DK1166	配列番号51	配列番号52	配列番号53	配列番号54	配列番号55	配列番号56	配列番号57	配列番号58
DK1164	配列番号59	配列番号60	配列番号61	配列番号62	配列番号63	配列番号64	配列番号65	配列番号66

[0255] [実施例5] 新規抗ヒトFCRL1マウス抗体のFCRL1結合性

実施例4で得られた新規抗ヒトFCRL1マウス抗体の抗原特異的反応性を、Flow Cytometry (FCM) で評価した。FCRL1抗原発現細胞は、293T細胞上に組み換えFCRL1抗原を一過性に発現させて調製した。ヒトFCRL1 (NCBI accession number: NP_443170.1) またはカニクイザルFCRL1 (XP_015310712) のアミノ酸配列を元にコドン最適化したcDNAを合成し、その下流にencephalomyocarditis virus (EMCV) 由来のinternal ribosome entry site (IRES) 配列と、TagBFPの配列をタンデムに配置したフラグメントをpcDNA3.1hygroにクローニングしてヒトFCRL1またはカニクイザルFCRL1の発現プラスミドベクターを構築した。精製した発現ベクターを293T細胞にトランスフェクションし、トランスフェクション後2日目の細胞を回収し、各抗体との結合をFCMで確認した。

[0256] FCMは以下の条件で行った。回収した細胞を、5% FBS、25% DMEMおよび0.1% sodium azideを含むDulbecco's PBS (FCM buffer) で 2×10^6 個/mLになるように懸濁した。この細胞懸濁液25 μ Lと、各抗体を1 μ g/mLにPBSで希釈した抗体溶液25 μ Lを、96-well V plateの各well中で混合し (5×10^4 cells/well、500 ng/mL of each

h MAb)、4℃で30分間反応させた。

[0257] プレートを遠心し、上清を除いた後、200 μ L/wellのFCM bufferを加えて懸濁し、再遠心する方法で一回洗浄した。洗浄した細胞は、2次抗体のFCM buffer希釈液を25 μ L/well加えて再懸濁し、4℃で30分間反応させた。

[0258] 2次抗体としては、サンプルがマウス抗体の場合は、R-Phycoerythrin (PE) F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)を用い、サンプルがヒト抗体またはヒト型キメラ抗体の場合は、R-Phycoerythrin (PE) F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch)を用いた。各2次抗体の溶液は、原液をFCM bufferで200倍に希釈し調製した。1回の洗浄後、各wellの細胞を100 μ LのFCM bufferで懸濁し、各抗体との結合をフローサイトメトリー (FCM) で確認した。

[0259] 抗体の結合親和性はFCMにおけるFCRL1発現細胞に対する見かけの親和性 (Apparent affinity) として解離定数 (K_D) を算出した。

[0260] ヒトFCRL1またはカニクイザルFCRL1を一過性発現した細胞に、各抗体の、100 nM (15 μ g/ml) からの3倍希釈系列を12点反応させた。FCMにより取得されたデータを解析し、細胞に結合した各抗体の結合量を、PEーラベル2次抗体由来の蛍光量MFIとして算出した。抗体濃度と測定されたMFIを抗体濃度の対数に対してプロットし、それぞれの抗体の飽和結合曲線を得て、4-パラメーターロジスティックモデルで回帰した。フィッティングにはPrism 5 software (GraphPad Software Inc.)を用い、得られた50%効果濃度 (EC₅₀) より解離定数 (K_D) を算出した。ヒトまたはカニクイザルFCR

L 1 に対する結合活性を表 3 に示す。

[0261] [表3]

クローン名	DK610	DK681	DK1142	DK1141	DK1166	DK1164
ヒトFCRL1 (nM)	0.4	1.0	1.4	1.6	1.5	2.3
ヒトカニキザルFCRL1 (nM)	結合なし	0.8	1.1	0.8	1.0	1.4

[0262] [実施例 6] 新規抗ヒトFCRL1 キメラ抗体のADC 作製

実施例 4 で得られた新規抗ヒトFCRL1 マウス抗体の可変領域のアミノ酸配列情報をもとに、実施例 1 および 2 の方法に準じて、S 2 3 9 C 変異を有する新規抗FCRL1 抗体および、これらの抗体の変異部位に特異的にS G 3 2 4 9 を付加したADC を作製した。全てのADC の薬物抗体比は 1 . 8 ~ 1 . 9 であった。

[0263] [実施例 7] 新規抗ヒトFCRL1 キメラ抗体のADC の抗細胞試験

S U - D H L - 6 細胞は 3 8 4 w e l l プレート (G r e i n e r - B i o) に 5 0 0 0 個 / w e l l になるように 4 0 μ L / w e l l で播種した。R a m o s 細胞は 9 6 w e l l プレート (T h e r m o f i s h e r s c i e n t i f i c) に 4 0 0 0 個 / w e l l になるように 8 0 μ L / w e l l で播種した。ADC の希釈倍率は $\sqrt{10}$ 倍とし、1 0 0 0 0 n g / m L を最高濃度として 9 又は 1 0 点で調製した (最終濃度 : 1 0 ~ 1 0 0 0 0 n g / m L) 。目的の最終濃度になるように希釈したADC を 3 8 4 w e l l プレートには 1 0 μ L / w e l l 、 9 6 w e l l プレートには 2 0 μ L / w e l l で添加した。

[0264] ADC 添加後、3 7 ° C 設定の炭酸ガスインキュベーター内で約 4 日間培養した。培養終了後、C e l l T i t e r - G l o L u m i n e s c e n t C e l l V i a b i l i t y A s s a y (P r o m e g a) を、3 8 4 w e l l プレートには 2 0 μ L / w e l l 、 9 6 w e l l プレートには 1 0 0 μ L / w e l l で添加し、約 1 5 分反応させた後、発光値を測定することで生細胞を測定した。なお、新規抗ヒトFCRL1 キメラ抗体のADC は

、実施例6で作製したADCを用い、7G8-ADCは実施例2で作製したADCを用いた。

[0265] SU-DHL-6細胞に対する抗細胞試験の結果を図2Aおよび図2B、Ramos細胞に対する抗細胞試験の結果を図3Aおよび図3Bに示す。図2A、図2B、図3A及び図3Bに示すように、SU-DHL-6細胞およびRamos細胞に対して、いずれの新規抗FCRL1抗体のADCも公知抗FCRL1抗体と比較して強い抗細胞効果が認められた。

[0266] [実施例8] 新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体のADCの抗腫瘍試験

Ramos細胞皮下移植マウスモデルを以下の方法により作製した。Ramos細胞はPBSに懸濁し、 5×10^6 個/0.05 mL/headでSCIDマウスの腹側皮下に移植した。移植後7日目に腫瘍体積が 85 mm^3 以上の個体を選択し、群分けした。

[0267] このようにして作製したRamos細胞皮下移植マウスモデル、および実施例3の方法で作製したSU-DHL-6細胞皮下移植マウスモデルを以下の抗腫瘍試験で用いた。

[0268] 群分け日(day 0)に0.3 mg/kg body weightの希釈した新規抗FCRL1キメラ抗体のADCまたは7G8-ADCを尾静脈内に投与した。Vehicleの組成は10 mmol/L L-グルタミン酸ナトリウム、262 mmol/L D-ソルビトール、0.05 mg/mL ポリソルベート80、pH 5.5である。Day 10における7G8-ADC投与群の平均腫瘍体積を1とし、それぞれの新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体-ADC投与群の平均腫瘍体積の相対値を図4に示す。なお、新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体のADCは、実施例6で作製したADCを用い、7G8-ADCは実施例2で作製したADCを用いた。

[0269] 図4に示される通り、いずれの新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体のADCも、7G8-ADCよりも強い抗腫瘍活性を有していた。また、図5にはRamos細胞皮下移植マウスモデルのday 42における腫瘍サイズを示す。図5に示される通り7G8-ADCは腫瘍の増殖が認められているのに対

して、新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体のADCはいずれも持続的に強力な薬効を示すことが明らかとなった。これらの結果より、新規抗FCRL1抗体のADCは公知抗FCRL1抗体のADCよりも優れた抗腫瘍効果があることが示された。

[0270] [実施例9] 新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体の内在化

実施例6で作製した新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体にIncucyte Human FabFluor-pH Red Antibody Labeling Reagent (Sartorius) を、添付の説明書に従ってラベルした。Ramos細胞に最終濃度が200ng/mLとなるように希釈したラベル化抗体を処置した。37℃設定の炭酸ガスインキュベーター内で約4時間又は24時間培養後、FCMによりMean Fluorescence Intensity (MFI) を測定した。なお、抗体が内在化しているほどMFIが高くなる。

[0271] 内在化の結果を図6に示す。図6に示すように、いずれの新規抗ヒトFCRL1キメラ抗体も公知抗ヒトFCRL1キメラ抗体と比較して高い内在化能を有していた。

[0272] [実施例10] 新規抗ヒトFCRL1ヒト化抗体の作製

(1) DK681ヒト化抗体およびDK1142ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

以下に記載する方法で、DK681ヒト化抗体およびDK1142ヒト化抗体の各種VHおよびVLのアミノ酸配列を設計した。以降の記述では様々なVHおよびVLのアミノ酸配列を有するDK681ヒト化抗体およびDK1142ヒト化抗体の総称として、hzDK681抗体およびhzDK1142抗体と記載する。実施例4で得られたDK681マウス抗体およびDK1142マウス抗体の可変領域のCDRのアミノ酸配列の移植に適した既知のヒト抗体のフレームワーク（以下、FRと記載する）のアミノ酸配列として、Kabatら [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. H

health and Human Services (1991)] で報告されているヒトFRコンセンサス配列、ヒト抗体ジャームライン配列、およびBLAST法[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]などの類似性検索により得られたヒト抗体可変領域由来のFR配列の検索の中からそれぞれ次のように選択した。DK681についてはGenbank Accession Number: AKU38660.1 およびGenbank Accession Number: AAW69164.1を、DK1142についてはKabatら[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]で報告されているhuman subgroup H chain I (以下、hSGHIとも称する。)およびGenbank Accession Number: ABG38363.1をそれぞれ選択し、これらのFRにCDRを移植した。

[0273] DK681についてはAKU38660.1のFRのアミノ酸配列の適切な位置に、それぞれ配列番号28、29及び30で示されるDK681 VHのCDR1～3のアミノ酸配列を移植し、hzDK681 HVO (配列番号67)を設計した。また、AAW69164.1のFR (FR4としてはDK681キメラ抗体のFRをそのまま使用)のアミノ酸配列の適切な位置に、それぞれ配列番号32、33及び34で示されるDK681 VLのCDR1～3のアミノ酸配列を移植し、hzDK681 LVO (配列番号68)を設計した。

[0274] 上記のとおり設計したhzDK681 HVOおよびhzDK681 LVOのコンピューターモデリングにより、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定した。その結果、hzDK681 HVOおよびhzDK681 LVOの可変領域のFRのアミノ酸残基の中で、抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、VHでは、配列番号67で表わされるアミノ酸配列の11番目のVal、12番目のLys、38番目のArg、48

番目のMet、67番目のArg、68番目のVal、70番目のIle、72番目のAla、74番目のThr、及び97番目のAlaを選択し、VLでは、配列番号68で表わされるアミノ酸配列の21番目のIle、49番目のPro、及び91番目のValを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸残基を、DK681抗体の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ置換し、様々な改変を有するヒト化抗体のVH（配列番号72および配列番号73）およびVL（配列番号74）を設計した。

[0275] DK1142についてはhSGHIのFRのアミノ酸配列の適切な位置に、それぞれ配列番号36、37及び38で表わされるDK1142 VHのCDR1～3のアミノ酸配列を移植し、hzDK1142 HVO（配列番号69）を設計した。また、ABG38363、1のFR（FR4としてはDK1142キメラ抗体のFRをそのまま使用）のアミノ酸配列の適切な位置に、それぞれ配列番号40、41及び42で表わされるDK1142 VLのCDR1～3のアミノ酸配列を移植し、hzDK1142 LVO（配列番号70）を設計した。

[0276] 上記のとおり設計したhzDK1142 HVOおよびhzDK1142 LVOのコンピューターモデリングにより、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定した。その結果、hzDK1142 HVOおよびhzDK1142 LVOの可変領域のFRのアミノ酸残基の中で、抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、VHでは、配列番号69に記載されるアミノ酸配列の11番目のVal、12番目のLys、38番目のArg、48番目のMet、67番目のArg、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、及び95番目のThyを選択し、VLでは、配列番号70に記載されるアミノ酸配列の2番目のIle、15番目のPro、及び50番目のGlnを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸残基を、DK1142抗体の同じ部位に存

在するアミノ酸残基へ置換し、様々な改変を有するヒト化抗体のVH（配列番号75および配列番号77）およびVL（配列番号76）を設計した。

[0277] 上記のような標準的なCDR移植の設計に加えて、一部のh z D K 1 1 4 2抗体のVLには、VL CDRの改変を併せて行った。具体的には、配列番号41に記載されるVLのCDR2のアミノ酸配列中の2番目のV a lをI l eに置換した、配列番号71に記載されるVLのCDR2を導入した。また、配列番号71に記載されるVLのCDR2を含む、ヒト化抗体のVL（配列番号78）を設計した。

[0278] (2) ヒト化抗体の可変領域遺伝子の設計

このようにして設計したD K 6 8 1ヒト化抗体はそれぞれD K 6 8 1 F 1 1、D K 6 8 1 F 1 2、D K 6 8 1 F 1 3及びD K 6 8 1 F 1 4と命名し、D K 1 1 4 2ヒト化抗体はそれぞれD K 1 1 4 2 F 2 1、D K 1 1 4 2 F 2 2及びD K 1 1 4 2 F 2 4と命名した。これらのヒト化抗体の可変領域およびCDRを表4に示す。これらのヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、動物細胞で高頻度に使用されるコドンを用いて設計した。

[0279] [表4]

クローン名	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
DK681 F11	配列番号 7 2	配列番号 2 8	配列番号 2 9	配列番号 3 0	配列番号 6 8	配列番号 3 2	配列番号 3 3	配列番号 3 4
DK681 F12	配列番号 7 3	配列番号 2 8	配列番号 2 9	配列番号 3 0	配列番号 7 4	配列番号 3 2	配列番号 3 3	配列番号 3 4
DK681 F13	配列番号 7 2	配列番号 2 8	配列番号 2 9	配列番号 3 0	配列番号 7 4	配列番号 3 2	配列番号 3 3	配列番号 3 4
DK681 F14	配列番号 7 3	配列番号 2 8	配列番号 2 9	配列番号 3 0	配列番号 6 8	配列番号 3 2	配列番号 3 3	配列番号 3 4
DK1142 F21	配列番号 7 5	配列番号 3 6	配列番号 3 7	配列番号 3 8	配列番号 7 6	配列番号 4 0	配列番号 4 1	配列番号 4 2
DK1142 F22	配列番号 7 7	配列番号 3 6	配列番号 3 7	配列番号 3 8	配列番号 7 6	配列番号 4 0	配列番号 4 1	配列番号 4 2
DK1142 F24	配列番号 7 7	配列番号 3 6	配列番号 3 7	配列番号 3 8	配列番号 7 8	配列番号 4 0	配列番号 7 1	配列番号 4 2

[0280] (3) ヒト化抗体の作製

(2) で設計した塩基配列に対応する遺伝子断片を、シームレスクローニング法を用いて発現ベクターに導入して必要なプラスミドを作製した。VL発現ベクターとしてはシグナル配列およびヒト κ 鎖定常領域配列を有したpC I - O t C M V _ h Kベクターを、VH発現ベクターとしてはシグナル配列およびヒト γ 鎖定常領域配列を有したpC I - O t C A G _ h G 1 (S 2 3 9 C)ベクターを用いた。pC I - O t C A G _ h G 1 (S 2 3 9 C)ベクターが有する定常領域配列は、ヒトI g G 1にS 2 3 9 Cの変異を導入した重鎖定常領域である。なお、これらのベクターは、P r o m e g a社 pC I ベクターを共通主骨格としてヒト抗体遺伝子を発現させるために必要な制限酵素サイトを導入し、全合成によって作製されたベクターである。完成したプラスミドは、Q I A G E N P l a s m i d P l u s M a x i k i t (Q I A G E N)を用いて大量調製した。次に、目的のヒト化抗体を、E x p i 2 9 3 E x p r e s s i o n S y s t e m K i t (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)を使用して一過性に発現させた。プラスミドの導入の方法は添付書類に従った。

[0281] 軽鎖の発現ベクターと重鎖の発現ベクターは、2 : 1の比率で混合して導入した。プラスミド導入後の細胞を、37℃、8% C O ₂、125 rpmの条件下で、2～4日間培養した。その後、細胞培養懸濁液の遠心分離を行い、0.2 μ mフィルターを通して培養上清を回収した。培養上清からM a b S e l e c t S u R e (C y t i v a社)を用いたアフィニティー精製により、精製抗体を取得した。

[0282] 具体的には、カラムに充填したレジンをP B Sで平衡化した後、当該カラムに培養上清を添加し、P B Sで洗浄し、溶出バッファー(20 mM クエン酸、50 mM N a C l, p H 3.4)を用いて抗体を溶出した。得られた抗体溶液に中和バッファー(1 M リン酸-N a O H, p H 7.0)を1 / 10量加えて中和し、N A P 2 5 (C y t i v a社製)を用いて抗体溶液の溶媒をP B Sに置換した。バッファー置換後の抗体溶液について、A m i c o n U l t r a - 4 C e n t r i f u g a l F i l t e r

Units (ミリポア) を用いて限外濾過による濃縮を行い、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 社) を使用して吸光度 A280 を測定し、抗体溶液の濃度の測定と調製を行った。吸光係数は、C. N. Pace らの方法に従って (1995, Prot. Sci. 4: 2411-2423) それぞれのヒト化抗体のアミノ酸配列から算出した。精製した抗体は、分析用ゲル濾過クロマトグラフィー (東ソー株式会社製カラム TSK gel Super SW3000 を使用) および SDS-PAGE による品質確認を行った。

[0283] [実施例 11] 新規抗ヒト FCRL1 ヒト化抗体の FCRL1 結合性

実施例 4 で得られた DK681 および DK1142 マウス抗体の定常領域をヒト IgG1 (S239C) 定常領域に接続した DK681 キメラ抗体 (chDK681) および DK1142 キメラ抗体 (chDK1142) と、実施例 10 で得られた抗 FCRL1 ヒト化抗体のヒト FCRL1 に対する結合活性を比較することを目的とし、hFCRL1/FcRH1-His (R&D Systems 社製) に対する結合活性を Biacore 8K+ (Cytiva 社製) を用いて表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により測定した。

[0284] 抗 FCRL1 抗体の結合活性は以下のように測定した。Anti-human IgG antibody を、Human Antibody Capture Kit (Cytiva 社製) を用いて、添付のプロトコルに従い、CM5 センサーチップ (Cytiva 社製) に固定化した。Anti-human IgG antibody を固定化したフローセルに、5 μ g/mL に調製した抗 FCRL1 抗体を 10 μ L/分の流速で 30 秒間添加した。

[0285] 次に、10000 ng/mL より 3 倍希釈で段階的に 5 濃度に調製した hFCRL1/FcRH1-His を 30 μ L/分の流速で、結合反応を 180 秒間、解離反応を 400 秒間モニターした。取得したセンサーグラムは、Bia Evaluation Software (Cytiva 社製) を

用いて、Steady state affinity modelまたは1:1 Binding modelによりfittingにより各抗体の速度論定数を算出した。算出された各抗体の結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) および解離定数 [KD] を表5に示す。なお、chDK681をDK681 F01、chDK1142をDK 1142 F02と記載する。

[0286] [表5]

Drug Name	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	fitting model
DK681 F01	4.47×10^5	1.05×10^{-3}	6.65×10^{-9}	Steady state affinity model
DK681 F11	4.41×10^5	6.06×10^{-3}	1.76×10^{-8}	Steady state affinity model
DK681 F12	3.85×10^5	2.59×10^{-3}	9.15×10^{-9}	Steady state affinity model
DK681 F13	3.87×10^5	2.97×10^{-3}	9.84×10^{-9}	Steady state affinity model
DK681 F14	4.01×10^5	5.08×10^{-3}	1.61×10^{-8}	Steady state affinity model
DK1142 F02	4.55×10^6	5.18×10^{-2}	1.14×10^{-8}	1:1 Binding model
DK1142 F21	5.36×10^6	6.86×10^{-2}	1.28×10^{-8}	1:1 Binding model
DK1142 F22	3.85×10^6	4.28×10^{-2}	1.11×10^{-8}	1:1 Binding model
DK1142 F24	2.24×10^6	2.74×10^{-2}	1.22×10^{-8}	1:1 Binding model

[0287] 以上の結果より、実施例10で作製した抗ヒトFCRL1ヒト化抗体は、chDK681抗体およびchDK1142抗体と同等の結合活性を持つことが明らかとなった。

[0288] [実施例12] 新規抗ヒトFCRL1ヒト化抗体のADC作製

実施例1および2の方法に準じて、S239C変異を有する新規抗FCRL1抗体および、これらの抗体の変異部位に特異的にSG3249を付加したADCを作製した。なお、新規抗ヒトFCRL1ヒト化抗体の可変領域の配列は表4に示したものを使用した。全てのADCの薬物抗体比は1.7～1.8であった。

[0289] [実施例13] 新規抗ヒトFCRL1ヒト化抗体のADCの抗細胞試験

実施例7の方法に準じて、実施例12で作製した新規抗FCRL1ヒト化抗体のADCのSU-DHL-6細胞およびRamos細胞に対する抗細胞効果を確認した。

[0290] S U - D H L - 6 細胞に対する抗細胞試験の結果を図 7 A および図 7 B、R a m o s 細胞に対する抗細胞試験の結果を図 8 A および図 8 B に示す。図 7 A、図 7 B、図 8 A 及び図 8 B に示すように、S U - D H L - 6 細胞および R a m o s 細胞に対して、いずれの新規抗 F C R L 1 抗体の A D C も公知抗 F C R L 1 抗体の A D C と比較して強い抗細胞効果が認められた。

[0291] [実施例 1 4] 新規抗ヒト F C R L 1 ヒト化抗体の A D C の抗腫瘍試験

実施例 3 および 8 の方法に準じて、作製した S U - D H L - 6 細胞皮下移植マウスモデルおよび R a m o s 細胞皮下移植マウスモデルを用いて以下の抗腫瘍試験で用いた。

[0292] 群分け日 (d a y 0) に 0. 3 m g / k g b o d y w e i g h t の希釈した新規抗ヒト F C R L 1 ヒト化抗体の A D C または 7 G 8 - A D C を尾静脈内に投与した。V e h i c l e の組成は 1 0 m m o l / L L - グルタミン酸ナトリウム、2 6 2 m m o l / L D - ソルビトール、0. 0 5 m g / m L ポリソルベート 8 0、p H 5. 5 である。D a y 7 における 7 G 8 - A D C 投与群の平均腫瘍体積を 1 とし、それぞれの新規抗ヒト F C R L 1 ヒト化抗体の A D C 投与群の平均腫瘍体積の相対値を図 9 に示す。なお、新規抗ヒト F C R L 1 ヒト化抗体の A D C は実施例 1 2 で作製した A D C を用い、7 G 8 - A D C は実施例 2 で作製した A D C を用いた。

[0293] 図 9 に示される通り、いずれの新規抗 F C R L 1 ヒト化抗体の A D C は、7 G 8 - A D C よりも強い抗腫瘍活性を有していた。この結果から、新規抗 F C R L 1 ヒト化抗体の A D C は公知抗 F C R L 1 抗体の A D C よりも優れた抗腫瘍効果があることが示された。

産業上の利用可能性

[0294] 本発明により、F C R L 1 の細胞外領域に結合する新規モノクローナル抗体または該抗体断片などが提供される。

[0295] 本発明を特定の態様を参照して詳細に説明したが、本発明の精神と範囲を離れることなく様々な変更および修正が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2 0 2 2 年 2 月 9 日付けで出願された日本

特許出願（特願２０２２－０１９０５１）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

配列表フリーテキスト

- [0296] 配列番号１：ヒトFCRL１の遺伝子配列
配列番号２：サルFCRL１の遺伝子配列
配列番号３：ヒトFCRL１のアミノ酸配列
配列番号４：サルFCRL１のアミノ酸配列
配列番号５：Ｅ３のＶＨのアミノ酸配列
配列番号６：Ｅ３のＶＬのアミノ酸配列
配列番号７：Ｅ９のＶＨのアミノ酸配列
配列番号８：Ｅ９のＶＬのアミノ酸配列
配列番号９：１Ｆ９のＶＨのアミノ酸配列
配列番号１０：１Ｆ９のＶＬのアミノ酸配列
配列番号１１：２Ａ１０のＶＨのアミノ酸配列
配列番号１２：２Ａ１０のＶＬのアミノ酸配列
配列番号１３：７Ｇ８のＶＨのアミノ酸配列
配列番号１４：７Ｇ８のＶＬのアミノ酸配列
配列番号１５：２Ｇ５のＶＨのアミノ酸配列
配列番号１６：２Ｇ５のＶＬのアミノ酸配列
配列番号１７：５Ａ２のＶＨのアミノ酸配列
配列番号１８：５Ａ２のＶＬのアミノ酸配列
配列番号１９：ＤＫ６１０のＶＨのアミノ酸配列
配列番号２０：ＤＫ６１０のＨＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号２１：ＤＫ６１０のＨＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号２２：ＤＫ６１０のＨＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号２３：ＤＫ６１０のＶＬのアミノ酸配列
配列番号２４：ＤＫ６１０のＬＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号25 : DK610のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号26 : DK610のLCDR3のアミノ酸配列

配列番号27 : DK681のVHのアミノ酸配列

配列番号28 : DK681のHCDR1のアミノ酸配列

配列番号29 : DK681のHCDR2のアミノ酸配列

配列番号30 : DK681のHCDR3のアミノ酸配列

配列番号31 : DK681のVLのアミノ酸配列

配列番号32 : DK681のLCDR1のアミノ酸配列

配列番号33 : DK681のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号34 : DK681のLCDR3のアミノ酸配列

配列番号35 : DK1142のVHのアミノ酸配列

配列番号36 : DK1142のHCDR1のアミノ酸配列

配列番号37 : DK1142のHCDR2のアミノ酸配列

配列番号38 : DK1142のHCDR3のアミノ酸配列

配列番号39 : DK1142のVLのアミノ酸配列

配列番号40 : DK1142のLCDR1のアミノ酸配列

配列番号41 : DK1142のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号42 : DK1142のLCDR3のアミノ酸配列

配列番号43 : DK1141のVHのアミノ酸配列

配列番号44 : DK1141のHCDR1のアミノ酸配列

配列番号45 : DK1141のHCDR2のアミノ酸配列

配列番号46 : DK1141のHCDR3のアミノ酸配列

配列番号47 : DK1141のVLのアミノ酸配列

配列番号48 : DK1141のLCDR1のアミノ酸配列

配列番号49 : DK1141のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号50 : DK1141のLCDR3のアミノ酸配列

配列番号51 : DK1166のVHのアミノ酸配列

配列番号52 : DK1166のHCDR1のアミノ酸配列

配列番号53 : DK1166のHCDR2のアミノ酸配列
配列番号54 : DK1166のHCDR3のアミノ酸配列
配列番号55 : DK1166のVLのアミノ酸配列
配列番号56 : DK1166のLCDR1のアミノ酸配列
配列番号57 : DK1166のLCDR2のアミノ酸配列
配列番号58 : DK1166のLCDR3のアミノ酸配列
配列番号59 : DK1164のVHのアミノ酸配列
配列番号60 : DK1164のHCDR1のアミノ酸配列
配列番号61 : DK1164のHCDR2のアミノ酸配列
配列番号62 : DK1164のHCDR3のアミノ酸配列
配列番号63 : DK1164のVLのアミノ酸配列
配列番号64 : DK1164のLCDR1のアミノ酸配列
配列番号65 : DK1164のLCDR2のアミノ酸配列
配列番号66 : DK1164のLCDR3のアミノ酸配列
配列番号67 : hzDK681 HVOのアミノ酸配列
配列番号68 : hzDK681 LVOのアミノ酸配列、DK681 F1
1およびDK681 F14のVLのアミノ酸配列
配列番号69 : hzDK1142 HVOのアミノ酸配列
配列番号70 : hzDK1142 LVOのアミノ酸配列
配列番号71 : DK1142 F24のLCDR2のアミノ酸配列
配列番号72 : DK681 F11およびDK681 F13のVHのアミ
ノ酸配列
配列番号73 : DK681 F12およびDK681 F14のVHのアミ
ノ酸配列
配列番号74 : DK681 F12およびDK681 F13のVLのアミ
ノ酸配列
配列番号75 : DK1142 F21のVHのアミノ酸配列
配列番号76 : DK1142 F21およびDK1142 F22のVLの

アミノ酸配列

配列番号 77 : DK 1 1 4 2 F 2 2 および DK 1 1 4 2 F 2 4 の VH の

アミノ酸配列

配列番号 78 : DK 1 1 4 2 F 2 4 の VL の アミノ酸配列

配列番号 79 : ヒト Ig G 1 の CH の アミノ酸配列

配列番号 80 : Ig G 1 (S 2 3 9 C) の CH の アミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] Fc receptor-like protein 1 (以下、FCRL1と略記する) に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片であって、該抗体が下記 (a) ～ (g) から選ばれるいずれか一つの抗体である、抗体または該抗体断片。

(a) 重鎖可変領域 (heavy chain variable region; 以下VHと略記する) の相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下CDRと略記する) 1～3が、それぞれ配列番号20～22に記載されるアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域 (light chain variable region; 以下VLと略記する) のCDR1～3が、それぞれ配列番号24～26に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(b) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号28～30に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号32～34に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(c) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号36～38に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号40～42に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(d) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号44～46に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号48～50に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、

(e) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号52～54に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号56～58に記載されるアミノ酸配列を含む抗体、および

(f) VHのCDR1～3が、それぞれ配列番号60～62に記載されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1～3が、それぞれ配列番号64～66に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(g) V HのC D R 1～3が、それぞれ配列番号36～38に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV LのC D R 1～3が、それぞれ配列番号40、71及び42に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

[請求項2]

F C R L 1に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片であって、該抗体が下記(2b-1)～(2b-4)、(2c-1)、(2c-2)及び(2g-1)から選ばれるいずれか一つの抗体である、抗体または該抗体断片。

(2b-1) V Hが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-2) V Hが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-3) V Hが配列番号72に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号74に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2b-4) V Hが配列番号73に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号68に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-1) V Hが配列番号75に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2c-2) V Hが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号76に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

(2g-1) V Hが配列番号77に記載されるアミノ酸配列を含み、かつV Lが配列番号78に記載されるアミノ酸配列を含む抗体。

[請求項3]

前記抗体の重鎖定常領域がI g Gの重鎖定常領域である請求項1または2に記載の抗体または該抗体断片。

[請求項4]

前記抗体の重鎖定常領域が配列番号79または80に記載されるアミノ酸配列を含む請求項3に記載の抗体または該抗体断片。

[請求項5]

抗体が遺伝子組換え抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

[請求項6]

遺伝子組換え抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から

なる群より選ばれる 1 である、請求項 5 に記載の抗体または該抗体断片。

- [請求項7] 前記抗体断片が F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体 (s c F v)、二量体化 V 領域 (D i a b o d y)、ジスルフィド安定化 V 領域 (d s F v) および C D R を含むペプチドから選ばれる 1 である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。
- [請求項8] 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。
- [請求項9] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。
- [請求項10] 請求項 9 に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項11] 請求項 1 0 に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞。
- [請求項12] 請求項 8 に記載のハイブリドーマまたは請求項 1 1 に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または抗体断片を採取することを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。
- [請求項13] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を含む抗体薬物複合体。
- [請求項14] 前記抗体薬物複合体が、リンカーを介して薬剤と連結した前記抗体または該抗体断片を含む請求項 1 3 に記載の抗体薬物複合体。
- [請求項15] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を含む、組成物。
- [請求項16] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を含む、F C R L 1 の検出または測定用試薬。
- [請求項17] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を含む、F C R L

1 関連疾患の診断薬。

- [請求項18] F C R L 1 関連疾患が、がん、自己免疫疾患または炎症性疾患である、請求項 1 7 に記載の診断薬。
- [請求項19] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を含む、F C R L 1 関連疾患の治療薬。
- [請求項20] F C R L 1 関連疾患が、がん、自己免疫疾患または炎症性疾患である、請求項 1 9 に記載の治療薬。
- [請求項21] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を用いた、F C R L 1 関連疾患の診断方法。
- [請求項22] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体を投与することを含む、F C R L 1 関連疾患の治療方法。
- [請求項23] F C R L 1 関連疾患の診断薬を製造するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体の使用。
- [請求項24] F C R L 1 関連疾患の治療薬を製造するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体の使用。
- [請求項25] F C R L 1 関連疾患の診断薬としての使用のための、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体。
- [請求項26] F C R L 1 関連疾患の治療薬としての使用のための、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは該抗体断片または請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の抗体薬物複合体。