

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-537673

(P2008-537673A)

(43) 公表日 平成20年9月25日 (2008.9.25)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 B O 6 4 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | 4 C O 8 5 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 A | 4 H O 4 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2007-553371 (P2007-553371)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月31日 (2006.1.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月1日 (2007.10.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/003502
 (87) 国際公開番号 W02006/083936
 (87) 国際公開日 平成18年8月10日 (2006.8.10)
 (31) 優先権主張番号 60/648,541
 (32) 優先日 平成17年1月31日 (2005.1.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/756,844
 (32) 優先日 平成18年1月5日 (2006.1.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

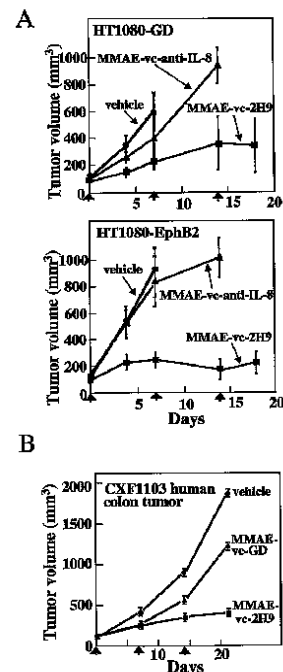
(71) 出願人 507202770
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, ディー
 エヌエー ウェイ 1, エムエス 49
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 マオ, ウェイグアン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 03, サン マテオ, デ アンザ ブ
 ールバード 1613

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗E P H B 2抗体とその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、抗E p h B 2抗体、イムノコンジュゲート、及び含有してなる組成物とこれら抗体及びイムノコンジュゲートの使用方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)を含むH V R - L 1 ;
- (b) 配列GASTRES (配列番号2)を含むH V R - L 2 ;
- (c) 配列QNDHSDYPFT (配列番号3)を含むH V R - L 3 ;
- (d) 配列SYWMH (配列番号4)を含むH V R - H 1 ;
- (e) 配列FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)を含むH V R - H 2 ; 及び
- (f) 配列RLKLLRYAMDY (配列番号6)を含むH V R - H 3、

からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4、5及び/又は6の高頻度可変領域(H V R)配列を含有し、ヒトE p h B 2に特異的に結合する抗E p h B 2抗体。

10

【請求項 2】

KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)、GASTRES (配列番号2)、及びQNDHSDYPFT (配列番号3)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む軽鎖を含有してなる、請求項1に記載の抗E p h B 2抗体。

【請求項 3】

SYWMH (配列番号4)、FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)、及びRLKLLRYAMDY (配列番号6)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む重鎖を含有してなる、請求項1又は2に記載の抗E p h B 2抗体。

【請求項 4】

(a) SYWMH (配列番号4)、FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)、及びRLKLLRYAMDY (配列番号6)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む重鎖；と

20

(b) KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)、GASTRES (配列番号2)、及びQNDHSDYPFT (配列番号3)からなる群から選択されるC D R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む軽鎖を含有してなる、請求項1に記載の抗E p h B 2抗体。

【請求項 5】

配列：DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCSSQSLLNSGNQENYLAWYQQKPGQPPLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVQAEDLAVYYCQNDHSDYPFTFGAGTKVEIKR (配列番号7)を有する軽鎖可変ドメインを含有してなる、請求項1に記載の抗E p h B 2抗体。

30

【請求項 6】

配列：QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKDKATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLLKLLRYAMDYWGQGTTLTVSA (配列番号8)を有する重鎖可変ドメインを含有してなる、請求項1又は5に記載の抗E p h B 2抗体。

【請求項 7】

米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株により産生される抗体のHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3からなる群から選択される配列を含む少なくとも1の高頻度可変配列を含有し、ヒトE p h B 2に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 8】

40

米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株により産生される抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを含有し、ヒトE p h B 2に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 9】

米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と同じヒトE p h B 2上のエピトープに結合する単離された抗体。

【請求項 10】

ヒトE p h B 2への結合について、米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と競合する単離された抗体。

【請求項 11】

50

米国のTissue Type Culture(ATCC) 番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株の抗体コード化配列によってコードされる単離された抗体。

【請求項 1 2】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ないし 1 1 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 3】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、親和性成熟抗体、ヒト抗体、及び二重特異性抗体からなる群から選択されるものである、請求項 1 ないし 1 2 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記抗体が抗体断片である、請求項 1 ないし 1 2 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体が成長阻害剤とコンジュゲートしている、請求項 1 ないし 1 4 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記抗体が細胞障害性剤とコンジュゲートしている、請求項 1 ないし 1 4 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位体及び核溶解性酵素からなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン及びカリケアマイシンからなる群から選択される薬剤とコンジュゲートしている、請求項 1 ないし 1 4 の何れかーに記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記薬剤が、DM 1、DM 3、DM 4、MMA E 及びMMA F からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

請求項 1 ないし 1 4 の何れかーに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 2 2】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項 2 1 に記載のベクター。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 又は 2 2 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 2 4】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 6】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 2 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 7】

(a) 好適な宿主細胞内で請求項 2 2 に記載のベクターを発現する、そして(b) 抗E p h B 2 抗体を回収することを含む、抗E p h B 2 抗体の作製方法。

【請求項 2 8】

(a) 好適な宿主細胞内で請求項 2 2 に記載のベクターを発現する、そして(b) 抗E p h B 2 抗体を回収することを含む、抗E p h B 2 イムノコンジュゲートの作製方法。

【請求項 2 9】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 2 7 又は 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 2 7 又は 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

請求項 1 ないし 19 の何れかーに記載の抗 E p h B 2 抗体の有効量を、治療が必要な被検体に投与することを含む、E p h B 2 の発現の増加又は活性の増加に関連する腫瘍、癌又は細胞増殖性疾患を治療又は予防するための方法。

【請求項 3 2】

前記癌が、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌及び肝細胞癌からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記癌が結腸直腸癌である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 5 ないし 19 の何れかーに記載の抗 E p h B 2 抗体の有効量を、治療が必要な被検体に投与することを含む、癌又は腫瘍細胞を死滅させる方法。

10

【請求項 3 5】

前記の癌又は腫瘍細胞が大腸癌細胞又は胃癌細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

生体試料において E p h B 2 -抗 E p h B 2 抗体複合体を検出することを含む、E p h B 2 の検出方法。

【請求項 3 7】

E p h B 2 発現の増加と関連する疾患を有する又は有すると思われる患者の生体試料において E p h B 2 -抗 E p h B 2 抗体複合体を検出することを含む、E p h B 2 発現の増加と関連する疾患を診断するための方法。

20

【請求項 3 8】

前記疾患が、腫瘍、癌及び / 又は細胞増殖性疾患である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗 E p h B 2 抗体が検出可能に標識される、請求項 3 6 ないし 3 8 の何れかーに記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 1 ないし 19 の何れかーに記載の抗 E p h B 2 抗体を含有する組成物。

【請求項 4 1】

請求項 2 0 ないし 2 2 の何れかーに記載のポリヌクレオチドを含有してなる組成物。

【請求項 4 2】

さらに担体を含有してなる、請求項 4 0 又は 4 1 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

(関連出願)

この出願は、米国特許法 1 1 9 条に基づき、2005年1月31日に出願の米国仮出願第60/648,541号と2006年1月5日に出願の米国仮出願第60/756,844号の優先権を主張するものであり、これらは出典により本明細書中にその内容全体が組み込まれるものである。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

40

本発明は、概して分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は抗 E p h B 2 抗体とその使用に関する。

【0 0 0 3】

(発明の背景)

E p h B 2 レセプター(「E p h B 2」又は「E p h B 2 R」)は e p h レセプターファミリーのメンバーであり、ヒトゲノムのチロシンキナーゼレセプターで最も大きなファミリーを構成する(Dodelet, Oncogene, 19: 5614-5619, 2000に概説される)。ヒトの e p h レセプターチロシンキナーゼは、エフリンと称される対応する A タイプ及び B タイプのリガンドとの A クラス及び B クラス内の配列同一性により分類される。シグナル伝達はその様式で起こり、このシグナル伝達では、レセプターチロシンキナーゼはリガンドによって

50

、活性化され、後者の様式では、このシグナル伝達では、膜貫通エフリンBリガンドはレセプターとの相互作用によって、活性化される。E p hレセプターリガンド相互作用は、軸索誘導、組織境界形成、脈管形成、及び細胞運動性を含む多くの生物学的機能に関係している(Kullander 等 Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3: 475-486, 2002、Cheng 等 Cytokine Growth Factor Rev., 13: 75-85, 2002、Coulthard 等 Int. J. Dev. Biol., 46: 375-384, 2002)。

【 0 0 0 4 】

E p h B 2レセプターは、そのアミノ末端の半分にわたって伸展しているシステインリッチモチーフの後に2のフィブロネクチンタイプIIモチーフを有する細胞外領域を有する。保存されたキナーゼ領域と膜貫通領域を特徴とする細胞内ドメインがある。E p h B 2は、リガンド、例えばエフリン-B 1、エフリン-B 2及びエフリン-B 3を結合する。活性化されたE p h B 2レセプターの細胞質領域は無数のファミリーシグナル伝達分子、例えばS r c、G r b 2及びA b 1と相互作用することが報告されている(Holland 等, EMB O J., 16: 3877-3888, 1997、Zisch 等, Oncogene, 16: 2657-2670, 1998、Yu 等, Oncogene, 20: 3995-4006, 2001)。E p h B 2レセプターチロシンキナーゼは、r a s /マイトジェン活性化タンパク質(M A P)キナーゼシグナル伝達経路を下方制御し、また、内皮細胞及び神経系細胞のa b 1チロシンキナーゼを阻害する(Yu 等, Oncogene, 20: 3995-4006, 2001、Kim 等, FASEB J., 16: 1126-1128, 2002、Elowe 等 Mol. Cell. Biol., 21: 7429-7441, 2001)。

【 0 0 0 5 】

エフリンリガンド及びE p hレセプターファミリーメンバーの上方制御は、ヒト腫瘍及び細胞株の範囲において、記述されている。例えば、E p h B 2は、小細胞肺癌(Tang 等, Clin Cancer Res 1999、5:455-60)、神経芽細胞腫、(Tang 等, Med Pediatr Oncol 2001、36:80-2)、メラノーマ(Vogt 等 Clin Cancer Res 1998、4:791-7)、乳癌(Wu 等, Pathol Oncol Res 2004、10:26-33)、結腸直腸癌(C R C)(Jubb 等、共同、同時継続出願の2005年1月6日出願の米国特許出願第60/642,164号及びCairns 等、国際公開公報2003/000113)及び肝細胞癌(Hafner 等, Clin Chem 2004、50:490-9)において、過剰発現することが報告される。

抗体ベースの治療法は、様々な疾患の治療に非常に有効であると判明している。例えば、ハーセプチンTM及びリツキサンTM(ともにGenentech, S. San Francisco)は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫の治療のために成功裏に用いられている。ハーセプチンTMは、ヒト上皮性成長因子レセプター-2(H E R 2)プロトオンコジンの細胞外ドメインに選択的に結合する組換えD N A由来のヒト化モノクローナル抗体である。H E R 2タンパク質過剰発現は、原発性乳癌の25～30%に観察される。リツキサンTMは、正常及び悪性のBリンパ球の表面上に見られるC D 20抗原に対する、遺伝子操作したキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。両抗体はC H O細胞で産生される。

【 0 0 0 6 】

抗体-薬剤コンジュゲート(A D C)、すなわち免疫コンジュゲートを、癌治療における腫瘍細胞を死滅する又は阻害する細胞障害性剤又は細胞増殖抑制性剤などの薬剤の局所運搬のために用いることにより(Syrgos 及び Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614、Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151-172、US4975278)、腫瘍への薬剤分子が目的のように運搬され、そこで細胞内蓄積される。このとき、非コンジュゲート薬剤の全身投与であれば、除去しようとする腫瘍細胞だけでなく正常細胞に受容可能なレベル以上の毒性が生じる(Baldwin 等 (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603-05、Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera 等 (eds), pp. 475-506)。

治療薬として開発されるために適する臨床特質を有する薬剤が必要とされ続けることは明らかである。本明細書に記述される本発明は、この必要性を満たして、他の利点を提供するものである。

特許出願及び刊行物を含め、本明細書に挙げるすべての引例は、出典明記によって、その全体が組み込まれる。

【0007】

(発明の概要)

本発明は、様々な E p h B 2 結合剤(例えば免疫コンジュゲート、抗体及びその断片)の同定にある程度基づく。E p h B 2 は重要で有益な治療的標的として表し、本発明は E p h B 2 の結合に基づく組成物及び方法を提供する。本明細書に記載のように、本発明の E p h B 2 結合剤は、E p h B 2 - E p h B 2 リガンド経路の発現及び/又は活性化と関係する病的状態を標的とする(ターゲティングする)際に使用するための、重要な治療薬剤及び診断用薬剤を提供する。したがって、本発明は、E p h B 2 結合に関連する方法、組成物、キット及び製造品を提供する。

10

本発明は、E p h B 2 と結合する抗体を提供する。

ある態様では、本発明は、2005年2月24日に寄託された米国のTissue Type Culture(ATC C)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株2H9.11.14により産生される抗体を提供する。

ある態様では、本発明は、米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株2H9.11.14により産生される抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを含有し、ヒト E p h B 2 に特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0008】

ある態様では、本発明は、米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株2H9.11.14により産生される抗体のH V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2、及び/又はH V R - H 3からなる群から選択される配列を含む少なくとも1(少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、及び/又は6)の高頻度可変配列を含有し、ヒト E p h B 2 に特異的に結合する単離された抗体を提供する。

20

ある態様では、本発明は、米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株2H9.11.14により産生される抗体と同じヒト E p h B 2 上のエピトープに結合する単離された抗体を提供する。

ある態様では、本発明は、ヒト E p h B 2 への結合について、米国のTissue Type Culture(ATCC)番号PTA-6606を有するハイブリドーマ細胞株2H9.11.14により産生される抗体と競合する単離された抗体を提供する。

30

【0009】

ある態様では、本発明は、抗 E p h B 2 抗体の完全長 I g G 型が70 p M以上良好な結合親和性でヒト E p h B 2 を特異的に結合する、単離された抗 E p h B 2 抗体を提供する。当分野で十分に確立されているように、そのレセプターに対するリガンドの結合親和性は、様々なアッセイを用いて決定し、様々な定量値で表すことができる。したがって、一実施態様では、結合親和性はK d 値として発現され、本質的な結合親和性を(例えば、最小の結合活性効果によって、)表す。一般に、そして好ましくは、無細胞環境又は細胞関連の環境のいずれであっても、結合親和性はインビトロで測定される。例えば、Biacore、ラジオイムノアッセイ(R I A)及びE L I S A など、本明細書に記載のものを含め、当分野で公知の多くのアッセイの何れかを用いて、結合親和性測定値を得ることができる。

40

ある態様では、本発明は、E p h B 2 のリガンド結合領域を結合する単離された抗体を提供する。いくつかの実施態様では、単離された抗体は、ヒト E p h B 2 のアミノ酸のおよそ19からおよそ208を含有する、これらからなる又は基本的にこれらからなるポリペプチドを結合する(図12)。

ある態様では、本発明は、E p h B 2 の結合についてE p h B 2 リガンドと競合する単離された抗 E p h B 2 抗体を提供する。

ある態様では、本発明は、E p h B 2 活性を阻害する、減弱する、及び/又はブロックする、単離された抗 E p h B 2 抗体を提供する。いくつかの実施態様では、E p h B 2 自己リン酸化は、阻害、減弱、及び/又はブロックされる。

50

【 0 0 1 0 】

一態様では、本発明は、(a) 配列KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)を含むH V R - L 1、(b) 配列GASTRES (配列番号2)を含むH V R - L 2、(c) 配列QNDHSDYPFT (配列番号3)を含むH V R - L 3、(d) 配列SYWMH (配列番号4)を含むH V R - H 1、(e) 配列FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)を含むH V R - H 2、及び(f) 配列RLKLLRYAMDY (配列番号6)を含むH V R - H 3、からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4、5及び/又は6の高頻度可変領域(H V R)配列を含有してなる抗E p h B 2抗体を提供する。

一実施態様では、本発明の抗体は、KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)、GASTRES (配列番号2)、及びQNDHSDYPFT (配列番号3)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む軽鎖を含有してなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列KSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)を有する軽鎖H V R - L 1を含んでなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列GASTRES (配列番号2)を有する軽鎖H V R - L 2を含んでなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列QNDHSDYPFT (配列番号3)を有する軽鎖H V R - L 3を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、SYWMH (配列番号4)、FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)、及びRLKLLRYAMDY (配列番号6)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む重鎖を含有してなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列SYWMH (配列番号4)を有する重鎖H V R - H 1を含んでなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)を有する重鎖H V R - H 2を含んでなる。一実施態様では、抗体は、アミノ酸配列RLKLLRYAMDY (配列番号6)を有する重鎖H V R - H 3を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、SYWMH (配列番号4)、FINPSTGYTDYNQKFKD (配列番号5)、及びRLKLLRYAMDY (配列番号6)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む重鎖、とKSSQSLLNSGNQENYLA (配列番号1)、GASTRES (配列番号2)、及びQNDHSDYPFT (配列番号3)からなる群から選択されるH V R配列の少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてを含む軽鎖を含有してなる。

【 0 0 1 1 】

一実施態様では、本発明の抗体は、配列：DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCCKSSQSLLNSGNQENYLA WYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDHSDYPFTFGAGTKVEIKR (配列番号7)を有する軽鎖可変ドメインを含有してなる。

一実施態様では、本発明の抗体は、配列：QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKDKATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTTTLTVSA (配列番号8)を有する重鎖可変ドメインを含有してなる。

一実施態様では、本発明の抗体は、配列：DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCCKSSQSLLNSGNQENYLA WYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDHSDYPFTFGAGTKVEIKR (配列番号7)を有する軽鎖可変ドメインを含有し、配列：QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWM HWVKQRPGQGLEWIGFINPSTGYTDYNQKFKDKATLTVKSSNTAYMQLSRLTSEDSAVYYCTRRLKLLRYAMDYWGQGTT TLTVSA (配列番号8)を有する重鎖可変ドメインを含有してなる。

【 0 0 1 2 】

一態様では、本発明は、E p h B 2への結合について、上記の何れかの抗体と競合する抗体を提供する。一態様では、本発明は、上記の何れかの抗体と同じE p h B 2上のエピトープに結合する抗体を提供する。

当分野で公知、そして、以下により詳細に記述されるように、(後述のような)当分野の様々な定義及び前後関係に従って、抗体の高頻度可変領域を表すアミノ酸位/境界は異なってもよい。可変ドメイン内のいくつかの位置は、ある判断基準の下では高頻度可変領域内にあると判断されるが、異なるある判定基準の下では高頻度可変領域の外にあると判断される、ハイブリッド高頻度可変位置と見られうる。また、これらの位置の一又は複数は、伸展した高頻度可変領域内にありうる(以下にさらに定義する)。

いくつかの実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、抗体はポリクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体からなる群から選択される。いくつかの実施態様

では、抗体は抗体断片である。いくつかの実施態様では、抗体は、F a b、F a b'、F a b'-S H、F (a b')₂ 又は s c F v である。

【0013】

一実施態様では、抗体はキメラ抗体、例えば、異種性の非ヒト、ヒト又はヒト化配列(例えば、フレームワーク及び/又は定常ドメイン配列)に移植した非ヒトドナーの抗原結合配列を含有してなる抗体である。一実施態様では、非ヒトドナーはマウスである。一実施態様では、抗原結合配列は合成のもの、例えば突然変異誘発(例えばファージディスプレイスクリーニングなど)によって、得られるものである。一実施態様では、本発明のキメラ抗体は、マウスV領域とヒトC領域を有する。一実施態様では、マウス軽鎖V領域は、ヒトカッパ軽鎖に融合する。一実施態様では、マウス重鎖V領域は、ヒトI g G 1 C 10
領域に融合する。

本発明のヒト化抗体は、融合したC D R 内に変異を有する親和性成熟変異体及びF R 内にアミノ酸置換を有するものを含む。C D R 又はF R 内の置換されたアミノ酸は、ドナー又はレシピエントの抗体に存在するものに限らない。他の実施態様では、本発明の抗体はさらに、C D C 及び/又はA D C C の機能及びB細胞の殺傷の亢進を含め、エフェクター機能の改善を生じるF c 領域内のアミノ酸残基に変異を含有する。本発明の他の抗体には、安定性を改善する特定の変化を有するものが含まれる。また、本発明の抗体には、インビボでA D C C 機能を向上させているフコース欠陥変異体が含まれる。他の実施態様では、本発明の抗体は、エフェクター機能の低減、例えばC D C 及び/又はA D C C 機能の低減及び/又はB細胞殺傷の低減を生じるF c 領域内のアミノ酸残基に変化を含有する。いくつかの実施態様では、本発明の抗体は、ナチュラルキラー(N K)細胞上のヒトF c レセプター及び/又はヒト補体因子C 1 q への結合の減少(例えば結合の欠如)に特徴がある。いくつかの実施態様では、本発明の抗体は、ヒトのF c R I、F c R I I A 及び/又はF c R I I I A への結合の減少(例えば結合の欠如)に特徴がある。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、I g G クラスのもの(例えばI g G 1 又はI g G 4)であり、そしてE233、L234、L235、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331及び/又はP329(E U インデックスに従った番号付け)の少なくとも一つの突然変異を含んでなる。いくつかの実施態様では、抗体は、突然変異L234A/L235A又はD265A/N297Aを含んでなる。 20

【0014】

一態様では、本発明は、本明細書において、提供される何れかの抗原結合配列を含有してなる抗E p h B 2 ポリペプチドであって、E p h B 2 と特異的に結合する抗E p h B 2 抗体を提供する。 30

一態様では、本発明は、薬剤などの作用剤にコンジュゲートした、本明細書に開示された何れかの抗E p h B 2 抗体を含有してなる免疫コンジュゲート(「抗体薬剤コンジュゲート」又は「A D C」と交換可能に称される)を提供する。E p h B 2 過剰発現は、胃癌、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌及び肝細胞癌において、観察されており、結腸直腸腫瘍形成のすべての段階において、観察された。このことから、E p h B 2 が免疫コンジュゲート療法のための適切な標的であることが示唆される。E p h B 2 発現は大腸腺腫において、観察された。このことから、E p h B 2 が大腸腺腫に特徴がある疾患のための適切な標的であることが示唆される。 40

いくつかの実施態様では、免疫コンジュゲートの薬剤は、化学療法剤、成長阻害性剤、毒素(例えば細菌、菌類、植物又は動物の起源の酵素的に活性な毒素又はその断片)又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)である。いくつかの実施態様では、薬剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン又はカリケアマイシンである。いくつかの実施態様では、薬剤は、D M 1、D M 3、D M 4、M M A E 又はM M A F である。

【0015】

本発明の免疫コンジュゲートにおいて、抗体(A b)は、リンカー(L)を介して、一又は複数の薬剤成分(D)、例えば抗体につきおよそ1~およそ20の薬剤成分にコンジュゲートする。いくつかの実施態様では、リンカーは、一又は複数の6-マレイミドカプロイル(50

「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタネート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1カルボキシレート(「SMCC」)、及び/又はN-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート(「SIAB」)から選択されるリンカー成分を含む。いくつかの実施態様では、リンカーは、MC-val-cit-PABを含んでなる。いくつかの実施態様では、免疫コンジュゲートは、SPP-DM1、SMCC-DM1、BMPEO-DM1、MC-vc-PAB-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE、MC-MMAF又はMC-MMAEを含んでなる。

一態様では、本発明は、腫瘍細胞を死滅する抗EphA2抗体を含有してなる免疫コンジュゲートを提供する。いくつかの実施態様では、腫瘍細胞はインビトロで死滅される(実施態様によっては、およそ50ng/ml、40ng/ml、30ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、1ng/ml又はそれ以下、例えば900pg/ml、800pg/ml、700pg/ml、600pg/ml、500pg/ml又はそれ以下のIC50を有する)。いくつかの実施態様では、腫瘍細胞はインビボで死滅される。いくつかの実施態様では、免疫コンジュゲートの投与により、腫瘍成長が低減するか(実施態様によっては、コントロール腫瘍と比較して90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%又は10%又はそれ以下の腫瘍成長の低減を有する)、又は腫瘍倍加の時間が減少する。

【0016】

本発明の抗体及び免疫コンジュゲートはEphA2に結合する(例えば、特異的に結合する)。いくつかの実施態様では、本発明の抗体及び免疫コンジュゲートは、EphA2が関連する効果の一又は複数の態様、例えば限定するものではないが、EphA2活性化、EphA2下流の分子シグナル伝達、EphA2リガンド活性化、EphA2リガンド下流の分子シグナル伝達、EphA2へのリガンド(例えばエフリン-B1、エフリン-B2及び/又はエフリン-B3)結合の破壊、EphA2リン酸化及び/又はEphA2多量体化、及び/又はEphA2リガンドリン酸化、及び/又は任意の生物学的に関連するEphA2及び/又はEphA2リガンド生物学的経路の破壊、及び/又は腫瘍、細胞増殖性疾患又は癌の治療及び/又は予防、及び/又はEphA2発現及び/又は活性(例えばEphA2発現及び/又は活性の増加)と関係する疾患の治療又は予防、を調節しうる。いくつかの実施態様では、本発明の抗体又は免疫コンジュゲートはEphA2と特異的に結合する。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートはEphA2細胞外ドメイン(ECD)と特異的に結合する。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートは、ヒトEphA2のアミノ酸およそ19~およそ208から成るか又は基本的にそれらから成るポリペプチドと特異的に結合する。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートは、70pM以上のKDでEphA2を特異的に結合する。いくつかの実施態様では、本発明の抗体又は免疫コンジュゲートは、インビボ及び/又はインビトロでEphA2活性を減弱、阻害、及び/又はブロックする。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートはEphA2自己リン酸化を減弱、阻害、及び/又はブロックする。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートは、EphA2-リガンドとの結合に競合する(EphA2へのEphA2リガンド結合を減弱及び/又はブロックする)。いくつかの実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートは、哺乳類細胞に発現されるEphA2に結合する際に内部移行される。

【0017】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明の抗体又は免疫コンジュゲートの使用を提供する。いくつかの実施態様では、疾患は、大腸腺腫に特徴がある。

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数の抗体又は免疫コンジュゲートと担体を含有してなる組成物を提供する。一実施態様では、担体は薬学的に受容可能である。

一態様では、本発明は、本発明の抗EphA2抗体をコードする核酸を提供する。

一態様では、本発明は、本発明の核酸を含んでなるベクターを提供する。

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数の核酸と担体を含有してなる組成物を提供

10

20

30

40

50

する。一実施態様では、担体は薬学的に受容可能である。

一態様では、本発明は、本発明の核酸又はベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。ベクターは、何れの型のもの、例えば発現ベクターなどの組換えベクターでもよい。任意の様々な宿主細胞が使われてもよい。一実施態様では、宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌である。一実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの哺乳類細胞である。

【0018】

一態様では、本発明は、本発明の抗体又は免疫コンジュゲートの作製方法を提供する。例えば、本発明は、抗EphB2抗体(それは、本明細書で定義されるように、完全長及びその断片を含む)又は免疫コンジュゲートの作製方法であって、適切な宿主細胞において、前記の抗体(又はその断片)をコードする本発明の組み換えベクターを発現させ、該抗体を回収することを含む作製方法を提供する。さらに、本発明は、抗EphB2免疫コンジュゲートの作製方法であって、適切な宿主細胞において、本発明の抗EphB2抗体(又はその断片)をコードする本発明の組み換えベクターを発現させ、該抗EphB2抗体を回収して、薬剤に該抗EphB2抗体をコンジュゲートさせることを含む方法を提供する。

10

一態様では、本発明は、容器、と容器内に包含される組成物を具備する製造品であって、該組成物が本発明の一又は複数の抗EphB2抗体又は免疫コンジュゲートを含有するものである、製造品を提供する。一実施態様では、組成物は本発明の核酸を含有する。一実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートを含有してなる組成物は、さらに担体を含有するものであって、いくつかの実施態様ではその担体は薬学的に受容可能なものである。一実施態様では、本発明の製造品は、被検体に組成物(例えば抗体)を投与するための指示書をさらに具備する(例えば、本明細書に記載の何れかの方法のための指示書)。

20

【0019】

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数の抗EphB2抗体又は免疫コンジュゲートを含有してなる組成物を包含する第一容器、と、バッファを包含する第二容器を具備するキットを提供する。一実施態様では、バッファは薬学的に受容可能なものである。一実施態様では、抗体又は免疫コンジュゲートを含有してなる組成物はさらに担体を含有するものであって、いくつかの実施態様ではその担体は薬学的に受容可能なものである。一実施態様では、キットは、被検体に組成物(例えば抗体)を投与するための指示書をさらに具備する。

30

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、抗EphB2抗体又は免疫コンジュゲート(いくつかの実施態様では、本発明の抗EphB2抗体又は免疫コンジュゲート)の使用を提供する。

【0020】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明の核酸の使用を提供する。

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明の発現ベクターの使用を提供する。

40

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明の宿主細胞の使用を提供する。

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明の製造品の使用を提供する。

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍及び/又は細胞増殖性疾患の治療及び/又は予防治療のための医薬の調製における、本発明のキットの使用を提供する。

本発明は、EphB2の発現及び/又は活性、例として、発現及び/又は活性の増加又は望ましくない発現及び/又は活性、又は発現及び/又は活性の減少と関連している疾患状態を調整するために有用な方法及び組成物を提供する。

一態様では、本発明は、EphB2の発現及び/又は活性の増加と関連する腫瘍、癌及

50

び / 又は細胞増殖性疾患の治療方法又は予防方法であって、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては、本発明の抗 E p h B 2 抗体)が投与されることを含む方法を提供する。

【0021】

一態様では、本発明は、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては本発明の抗 E p h B 2 抗体)を投与することを含む、細胞(例えば癌細胞又は腫瘍細胞)を死滅する方法を提供する。

一態様では、本発明は、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては本発明の抗 E p h B 2 抗体)を投与することを含む、腫瘍又は癌の成長を低減、阻害、阻止(ブロック)又は防止する方法を提供する。

一態様では、本発明は、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては本発明の抗 E p h B 2 抗体)を投与することを含む、神経障害又は神経変性疾患を治療又は予防する方法、又は損傷した神経細胞を修復する方法を提供する。

一態様では、本発明は、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては本発明の抗 E p h B 2 抗体)を投与することを含む、ニューロンの発達、増殖、維持又は再生を促進する方法を提供する。

一態様では、本発明は、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗 E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては本発明の抗 E p h B 2 抗体)を投与することを含む、血管新生を阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様では、血管新生の部位は腫瘍又は癌である。

【0022】

本発明の方法を用いて、任意の適切な病理学的状態に作用させることができる。例示的な疾患は、本明細書に記載されており、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)及び肝細胞癌からなる群から選択される癌、及び、大腸腺腫に特徴がある疾患が含まれる。

一実施態様では、本発明の方法で標的とする細胞は癌細胞である。例えば、癌細胞は、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、乳頭カルシノーマ細胞、大腸癌細胞、膵臓癌細胞、卵巣の癌細胞、頸部癌細胞、中枢神経系癌細胞、骨原性肉種細胞、腎臓カルシノーマ細胞、肝細胞癌細胞、膀胱癌細胞、胃カルシノーマ細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞、メラノーマ細胞、白血病細胞及び大腸腺腫細胞からなる群から選択されるものであってもよい。一実施態様では、本発明の方法で標的とする細胞は、過剰増殖細胞及び / 又は過形成細胞である。一実施態様では、本発明の方法で標的とする細胞は形成異常細胞である。さらに他の実施態様では、本発明の方法で標的とする細胞は転移性細胞である。いくつかの実施態様では、標的とする細胞は大腸腺腫細胞である。いくつかの実施態様では、標的とする細胞は、少なくともおよそ20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、550,000、600,000、650,000、700,000、750,000、800,000、850,000又は850,000以上のE p h B 2分子を細胞膜上に発現する。

【0023】

本発明の方法は付加的な治療工程を更に含んでもよい。例えば、一実施態様では、方法は、標的とする細胞及び / 又は組織(例えば癌細胞)が放射線治療又は化学療法剤にさらされる工程を更に含む。

他の態様では、本発明は、試料中のE p h B 2 -抗E p h B 2抗体複合体を検出することを含む、E p h B 2の検出方法を提供する。本明細書において、使用する「検出」なる用語は、コントロールへの参照の有無にかかわらず、定性的及び / 又は定量的な検出(例えば測定レベル)を含む。

他の態様では、本発明は、疾患を有する又は有すると思われる患者の生体試料において、E p h B 2 -抗E p h B 2抗体複合体を検出することを含む、E p h B 2発現及び / 又

10

20

30

40

50

は活性と関連する疾患を診断するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、E p h B 2 発現は発現の増加又は異常な発現である。いくつかの実施態様では、疾患は、腫瘍、癌及び / 又は細胞増殖性疾患である。

他の態様では、本発明は、検出可能な標識を含有する、本明細書に記載の何れかの抗 E p h B 2 抗体を提供する。

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の何れかの抗 E p h B 2 抗体と E p h B 2 の複合体を提供する。いくつかの実施態様では、複合体はインビボ又はインビトロである。いくつかの実施態様では、複合体は、癌細胞を含んでなる。いくつかの実施態様では、抗 E p h B 2 抗体は、検出可能に標識される。

他の態様では、本発明は、E p h B 2 のアミノ酸 1 9 - 2 0 8 を含有するか、それから成るか、基本的にそれから成るポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 4 】

(本発明の詳細な説明)

本明細書中の発明は、例えば、E p h B 2 の発現及び / 又は活性の増加又は望ましくない発現及び / 又は活性などの E p h B 2 の発現及び / 又は活性に関連する疾患状態の治療又は予防に有用な、抗 E p h B 2 抗体、又は抗 E p h B 2 抗体を含んでなる免疫コンジュゲートを提供する。いくつかの実施態様では、本発明の抗体又は免疫コンジュゲートは、腫瘍、癌及び / 又は細胞増殖性疾患を治療するために用いられる。

他の態様では、本発明の抗 E p h B 2 抗体は、様々な組織及び細胞型での E p h B 2 留置などの E p h B 2 の検出及び / 又は単離のための試薬としての有用性を見出す。

さらに、本発明は、抗 E p h B 2 抗体、及び抗 E p h B 2 抗体をコードするポリヌクレオチドの作製方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

一般的な技術

本明細書中に記載又は引用される技術及び手順は、一般に十分に理解されるものであり、当業者によって、従来の方法論を用いて共通して実施されるものである。その例として、以下の文献に記載される方法論が広く利用されている。Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, 等 編集, (2003)), the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編集 (1995)), Harlow and Lane, 編集 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、及び ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, 編集 (1987))。

【 0 0 2 6 】

定義

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、タンパク質は、(1)ローリー法で測定した場合 9 5 % を越える抗体、最も好ましくは 9 9 重量 % を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 1 5 の N 末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での S D S - P A G E により均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

「単離された」核酸分子は、同定され、抗体核酸の天然源に通常付随している少なくとも一の汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子

が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にある抗体を通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0027】

「Kabatに記載の可変ドメイン残基番号付け」又は「Kabatに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語およびその異なる言い回しは、Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はCDR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばKabatによる残基82a、82bおよび82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」Kabat番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい決定した。

10

【0028】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる句は、当業者が2つの数値(一般的には、本発明の抗体に関連するものと参照/比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が十分に高く類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較抗体の値の好ましくは約50%以下、好ましくは約40%以下、好ましくは約30%以下、好ましくは約20%以下、好ましくは約10%以下である。

20

【0029】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(Kd)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示の実施態様を記載する。

30

【0030】

一実施態様では、本発明の「Kd」又は「Kd値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(10^{-5} I)-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような(Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、所望の抗体のFab型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(RIA)で測定される。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を5 µg/mlの捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)を含む50 mM炭酸ナトリウム(pH 9.6)にて一晚コートして、その後2%(w/v)のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温(およそ23 °C)で2~5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、100 pM又は26 pMの(10^{-5} I)抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Prestaら., (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。ついで所望のFabを一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば65時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のTween 20を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結

40

50

合の 20% 又はそれ以下濃度の Fab を選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、~ 10 反応単位 (RU) の固定した抗原 CM5 チップを用いて 25 の BIAcore™-2000 又は BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) にて表面プラズモン共鳴アッセイを行って K_d 又は K_d 値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化した。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) で $5 \mu\text{g/ml}$ (~ 0.2 μM) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (RU) がおよそ 10 になるように $5 \mu\text{l}$ / 分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した Fab (0.78 nM から 500 nM) を 25、およそ $25 \mu\text{l}$ / 分の流速で 0.05% Tween 20 (PBST) を含む PBS に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 (K_{on}) と解離速度 (K_{off}) を算出した。平衡解離定数 (K_d) を K_{off} / K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y., ら, (1999) J. Mol Biol 293:865-881 を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS (pH 7.2)、25 の、20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

10

20

30

40

【0031】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、~ 10 反応単位 (RU) の固定した抗原 CM5 チップを用いて 25 の BIAcore™-2000 又は BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化した。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) で $5 \mu\text{g/ml}$ (~ 0.2 μM) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (RU) がおよそ 10 になるように $5 \mu\text{l}$ / 分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した Fab (0.78 nM から 500 nM) を 25、およそ $25 \mu\text{l}$ / 分の流速で 0.05% Tween 20 (PBST) を含む PBS に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 (K_{on}) と解離速度 (K_{off}) を算出した。平衡解離定数 (K_d) を K_{off} / K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y., ら, (1999) J. Mol Biol 293:865-881 を参照。しかし、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS (pH 7.2)、25 の、20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。

【0032】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送する

50

ことのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なDNAセグメントが結合されうる円形の二重鎖DNAループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「組換えベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0033】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に、例えば標識との結合により、さらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ply-L-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤を含むもの(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。さらに、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体支持体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有するアミン又は有機キャップ基部分で置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。さらにポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、P(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラリジ(alaldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びD

10

20

30

40

50

NAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0034】

ここで使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

本願明細書において用いられるように、「E p h B 2」なる用語(「E p h B 2 R」なる用語と交換可能)は、特別に又は文脈上別途示されない限り、任意の(天然に生じるもの又は合成のもののいずれにせよ)天然の又は変異形のE p h B 2 ポリペプチドを指す。「天然の配列」なる用語は、特に天然に生じる切断型又は分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異型(例えば、選択的スプライシング型)及び天然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。「野生型E p h B 2」なる用語は、一般に、天然に生じるE p h B 2 タンパク質のアミノ酸配列を含有してなるポリペプチドを指す。「野生型E p h B 2 配列」なる用語は、一般に、天然に生じるE p h B 2 においてみられるアミノ酸配列を指す。

「抗体」及び「イムノグロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われ、モノクローナル抗体(例えば完全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、単価抗体、多価抗体、多特異性抗体(例えば所望の生物学的活性を示す限りの二重特異性抗体)及び本明細書で記載される抗体断片が含まれる。抗体はヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟したものであり得る。

【0035】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞性細胞毒性への抗体の関与を示す。

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「F c」断片と命名される。ペプシン処理はF(a b')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0036】

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。二本鎖のF v種において、この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。一本鎖F v種において、一つの重鎖及び一つの軽鎖の可変ドメインはフレキシブルなペプチドリンカーによって共有結合されて、軽鎖及び重鎖が「二量体」構造類似体内で二本鎖F v種内のものに結合しうる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むF vの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

またF a b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。F a

10

20

30

40

50

b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF a b断片とは異なる。F a b'-S Hは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているF a b'に対するこの命名である。F (a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0037】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

イムノグロブリンの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、イムノグロブリンは異なるクラスが割り当てられる。イムノグロブリンには5つの主なクラスがある：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M、更にそれらは、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g A₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。イムノグロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 μ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、好ましくはその機能のほとんどないしはすべてを保持することが好ましい。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばF c領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のF c領域に通常関連する生物学的な機能、例えばF c R n結合、抗体半減期の調節、A D C C機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるF c配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

【0038】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、一般的に微量に存在する変異体など、モノクローナル抗体の産生の際に生じうる突然変異体を除いて同一である、及び/又は同じエピトープに結合する抗体を指す。典型的に、このようなモノクローナル抗体は標的に結合するポリペプチド配列を含んでなる抗体を含んでおり、この標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含む方法によって得たものである。例えば、選択方法は、ハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組み換えD N Aクロンのプールなどの、複数のクローンからの特定のクローンの選択でありうる。さらに、選択された標的結合配列を変更して、例えば、標的について親和性を改善する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養物でのその産生を改善する、インビボでの免疫原性を減少する、多特異性の抗体を作製するなどを行うことができ、変更した標的結合配列を含んでなる抗体も本発明のモノクローナル抗体であることが理解されるであろう。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル調製物と比べて、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、他の免疫グロブリンと典型的には混入していない点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、様々な技術、例えば、ハイブリドーマ法(例えばKohler等, Nature, 256:495 (1975); Harlow等., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えD N A法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、

Clackson 等., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu 等, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee 等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及び Lee 等 *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004))、及びヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子又はヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又はすべてを含む動物のヒト抗体又はヒト様抗体を産生するための技術(例えば、国際公開公報1998/24893; 国際公開公報1996/34096; 国際公開公報1996/33735; 国際公開公報1991/10741; Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits 等., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann 等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,591,669号 (すべて GenPharm); 米国特許第5,545,807号; 国際公開公報1997/17852; 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 及び同第5,661,016号; Marks 等, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg 等, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); 及び Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995))によって作製されうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた最小配列を含むキメラ抗体である。多くの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, *Nature* 321, 522-525(1986); Riechmann等, *Nature* 332, 323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 593-596(1992)を参照のこと。また、以下の概説文献及びここに挙げる引用文献も参照のこと: Vaswani及びHamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

「キメラ」抗体(免疫グロブリン)は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体の断片を有する(アメリカ特許番号4,816,567、及び、Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。本明細書中で用いられるヒト化抗体は、キメラ抗体のサブセットである。

「抗原」は、抗体が選択的に結合しうる予め決められた抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン又は他の天然に生じる化合物ないしは合成化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが望ましい。

【 0 0 4 0 】

本願明細書において、用いられる「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列中の高頻度に可変しているおよび/または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、VH(H1、H2、H3)の3つと、VL(L1、L2、L3)の3つの計6つの高頻度可変領域を含んでなる。多くの高頻度可変領域が描写されており、本願明細書において、包含される。Kabat相補性決定領域(CDR

)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に用いられるものである(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置を指す(Chothia 及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。A b M高頻度可変領域は、Kabat C D RとChothia構造ループとが組み合わさったものであり、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されている。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複雑な結晶構造の分析に基づくものである。Kabat、Chothia及び接触高頻度可変領域の残基を以下に示す。

【 0 0 4 1 】

| ループ | Kabat | Chothia | 接触 |
|-------------|----------|----------|----------|
| ---- | ----- | ----- | ----- |
| L1 | L24-L34 | L24-L34 | L30-L36 |
| L2 | L50-L56 | L50-L56 | L46-L55 |
| L3 | L89-L97 | L89-L97 | L89-L96 |
| H1 | H31-H35B | H26-H32 | H30-H35B |
| (Kabat番号付け) | | | |
| H2 | H50-H65 | H52-H56 | H47-H58 |
| H3 | H95-H102 | H95-H102 | H93-H101 |

高頻度可変領域は、以下の「伸展した高頻度可変領域」を含有してもよい：V_Lの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)および89-97又は89-96(L3)およびV_Hの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)および93-102、94-102又は95-102(H3)。可変ドメイン残基は、各々のこれらの定義にあるように上掲のKabat等に従って番号を付けた。

【 0 0 4 2 】

本願明細書において、定められるように、「フレームワーク」又は「F R」残基は高頻度可変領域残基以外のその可変ドメイン残基である。

「一本鎖F_v」又は「s c F_v」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、s c F_vポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それはs c F_vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F_vの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、E P 4 0 4 , 0 9 7 ; W O 9 3 / 1 1 1 6 1 ; 及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

【 0 0 4 3 】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を有するもの、及び/又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用して、つくられたものである。この定義におけるヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、V_HドメインとV_Lドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。C D Rおよび/またはフレームワーク残

基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0044】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害; Fcレセプター結合性; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC); 貪食作用; 細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション; 及びB細胞活性化が含まれる。

10

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcRs)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFc

RIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等、(USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

20

【0045】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

30

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIレセプターには、FcRIIA(「活性型レセプター」)及びFcRIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGの胎児への移送を担い(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する新生児性レセプターFcRnも含まれる。

40

50

【 0 0 4 6 】

国際公開公報00/42072 (Presta) に F c R への結合を向上または減弱させた抗体変異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields ら J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

F c R n への結合の測定方法は公知である(例としてGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒト F c R n への結合とヒト F c R n 高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒト F c R n を発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又は F c 変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

【 0 0 4 7 】

F c 領域アミノ酸配列を変更して C 1 q 結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米特許第6,194,551号B1及び国際公開公報99/51642に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。またIdusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

「疾病」又は「疾患」は、本発明の物質/分子又は方法を用いた治療によって利益を得る任意の症状である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾病又は疾患を含む。限定的なものではなく、ここで治療する疾患の例には、悪性及び良性の腫瘍；癌腫、芽腫及び肉腫が含まれる。

「細胞増殖性疾患(障害)」及び「増殖性疾患(障害)」なる用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性にかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」「癌性」「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

【 0 0 4 8 】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節不可能な細胞成長/増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は表す。癌の例には、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれるが、これに限定されるものではない。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌、膵癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、胃癌、メラノーマ、及び様々なタイプの頭頸部癌が含まれる。血管新生の調節不全により、本発明の組成物及び方法により治療されうる多くの疾患が引き起こされうる。これらの疾患には、非腫瘍性及び腫瘍性の両方の状態が含まれる。腫瘍性のものには上記のものが含まれるが、これに限定されるものではない。非腫瘍性疾患には、限定するものではないが、例えば、望ましくない又は異常な肥大、関節炎、関節リウマチ(RA)、乾癬、乾癬のプラーク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化、アテローム硬化性プラーク、未熟児の網膜症を含む糖尿病性および他の増殖的な網膜症、水晶体後繊維増殖、血管新生緑内障、年齢関連性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡叢血管新生、角度(ルベオーシス)の血管新生、眼性新生血管疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺の過形成(甲状腺機能亢進症を含む)、角膜および他の組織移植、慢性の炎症、肺炎症、急性の肺損傷/ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺滲出、大脳浮腫(例えば、急性の脳卒中/非開放性頭部損傷/外傷と関係するもの)、滑液炎症、RAのパンヌス形成、筋炎骨化(myositis)、肥大性骨形成、骨関節炎(OA)、

抵抗性腹水、多嚢胞性卵巣疾患、子宮内膜症、体液疾患(膵炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患)の第3の間隔、子宮頸線維腫、早産、IBDなどの慢性炎症(クローン病および潰瘍性大腸炎)、腎臓同種異系移植片拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくないまたは異常な組織塊成長(非癌)、出血性関節、肥大性瘢痕、体毛成長の阻害、オスラー-ウェーバー症候群、化膿肉芽腫水晶体後繊維増殖、強皮症、トラコーマ、血管癒着、関節滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心嚢貯留液(心外膜炎と関係するものなど)および胸水が含まれる。

【0049】

「神経変性疾患」及び「神経変性障害」なる用語は、広義に用いられ、末梢神経障害に限らず、ニューロンの変性及び/又は機能不全を伴う病状を有するすべての疾患、運動神経疾患、例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS、Lou Gehrig's病)、Bell's麻痺及び脊髄筋萎縮又は麻痺を伴う様々な症状、及び、他のヒト神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、癲癇、多発性硬化症、ハンチントン舞蹈病、ダウン症候群、神経性難聴及びメニエール病が含まれる。

「末梢神経障害」は末梢神経に作用する神経変性疾患であり、多くの場合運動神経系、感覚神経系、感覚運動神経系、自律神経系の機能不全の一又は組合せとして現れる。末梢神経障害は、例えば、遺伝的に獲得されうるか、全身性疾患から生じうるか、毒性薬剤、例えば神経毒薬剤、例として抗腫瘍剤又は産業汚染物質ないし環境汚染物質により誘導されうる。「末梢感覚の神経障害」は、原因不明で起こりうる末梢感覚ニューロンの変性に特徴があり、例えば、糖尿病(糖尿病性神経障害)、癌の細胞増殖抑制薬物治療(例として、化学療法剤、例えばビンクリスチン、シスプラチン、メトトレキセート、3'-アジド-3'-デオキシチミジン又はタキサン、例えばパクリタキセル[TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.]及びドキセタキセル[TAXOTERE(登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France]による治療)、アルコール中毒、後天性免疫不全症候群(AIDS)又は遺伝子の素因の結果として生じうる。遺伝的に獲得した末梢神経障害は、例えば、レフサム病、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ファブリー病、デジュリーヌ・ソッタ病、無リポ蛋白血症、及びシャルコー・マリー・トゥース(CMT)病(別名腓骨筋萎縮症又は遺伝性運動感覚神経障害(HMSN))を含む。末梢神経障害の多くのタイプは数か月又は数年の期間にわたってゆっくりと進行する。医療において、このような神経障害は慢性という。場合によって、末梢神経障害は、2、3日の期間で急速に進行する、急性と呼ばれるものもある。通常、末梢神経障害は感覚神経及び運動神経ともに影響して、混合性の感覚及び運動神経障害を起こすが、単なる感覚神経障害及び単なる運動神経障害も知られている。

【0050】

ここで使用されるところの「治療」は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるために用いられる。

「個体」は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物(ウシなど)、スポーツ用動物、愛玩動物(ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類、マウス及びラットが含まれる。

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0051】

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。

本発明の物質/分子の「治療的有效量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、

及び体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの能力などの因子に従って変わりうる。また、治療の有効量は物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回るものである。「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には必ずではないが、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有效量よりも少ないであろう。

【 0 0 5 2 】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド(ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトボシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルビシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【 0 0 5 3 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphaoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトボテカン(HYCANTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニボシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamid)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofوسفamid)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン 1 I 及びカリケアマイシン I 1 (例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin) A を含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オ

10

20

30

40

50

キソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin); 代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU); 葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate); プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン; ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine); アン드로ゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone); 抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid); アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレブリン酸; エニルウラシル; アムサクリン(amsacrine); ベストラブシル(bestrabucil); ビサントレン(bisantrene); エダトラキセート(edatraxate); デフォファミン(defofamine); デメコルシン(demecolcine); ジアジコン(diaziquone); エルフォルニチン(elfornithine); 酢酸エリブチニウム(elliptinium); エポシロン; エトグルシド(etoglucid); 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダミン(lonidamine); メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine); ミトグアゾン(mitoguazone); ミトキサントロン; モピダモール(mopidamol); ニトラクリン(nitracrine); ペントスタチン; フェナメット(phenamet); ピラルビシン; ロソキサントロン; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR); ラゾキサン(razoxane); リゾキシン; シゾフィラン; スピロゲルマニウム(spirogermanium); テニウアゾン酸(tenuazonic acid); トリアジコン(triaziquone); 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine)); ウレタン; ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標)); ダカーバジン; マンノムスチン(mannomustine); ミトブロニトール; ミトラクトール(mitolactol); ピボプロマン(pipobroman); ガシトシン(gacytosine); アラビノシド(「Ara-C」); チオテパ; タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANETMパクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキシタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル; ゲムシタビン(GEMZAR(登録商標)); 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキセート; プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン; ビンブラスチン(VELBAN(登録商標)); プラチナ; エトボシド(VP-16); イホスファミド; マイトキサントロン; ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標)); オキサリプラチン; ロイコボビン(leucovovin); ビノレルビン(NAVELBINE(登録商標)); ノバントロン(novantrone); エダトレキセート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロナート(ibandronate); トボイソメラーゼ阻害剤RFS2000; ジフルオロメチロールニチン(DMFO); レチノイン酸のようなレチノイド; カペシタビン(XELODA(登録商標)); 上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体; 並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、及びブレドニソロン併用療法の略称であるCHOP、及び5-FU及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATINTM)を組み合わせた治療法の略称であ

るFOLFOXが含まれる。

【 0 0 5 4 】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(SERM)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標))；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD)；卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(tripterelin)；その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フォルメスタニー(formestane)、ファドロゾール、ボロゾール(RIVISOR(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、及びアナストロゾール(ARIMIDEX(登録商標))である。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロン酸(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロロン酸/ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロロン酸(ACTONEL(登録商標))、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras、及び上皮成長因子レセプター(EGF-R)；THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤(LURTOTECAN(登録商標))；rmRH(ABARELIX(登録商標))；ラパチニブ(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【 0 0 5 5 】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞(例えばEphB2を発現する細胞)の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期で細胞(例えばEphB2を発現する細胞)の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・ブーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞

の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキシソルピシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキシソルピシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-β-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0056】

本発明の組成物及び同組成物の作製方法

本発明は、医薬組成物を含む組成物であって、抗EphB2抗体を含んでなるもの、及び、抗EphB2抗体をコードする配列を包含する。本明細書で用いられるように、組成物は、EphB2に結合する一又は複数の抗体、及び/又はEphB2に結合する一又は複数の抗体をコードする配列を含む一又は複数のポリヌクレオチドを含有する。さらに、これらの組成物は、適切な担体、例えばバッファなどの薬学的に受容可能な賦形剤を含みうる。これは当分野で周知である。

また、本発明は、単離された抗体及びポリヌクレオチドの実施態様を包含する。また、本発明は、実質的に純粋な抗体及びポリヌクレオチドの実施態様を包含する。

本発明の抗EphB2抗体は望ましくはモノクローナルである。また、本明細書中で提供される抗EphB2抗体のFab、Fab'、Fab'-SH及びF(ab')₂断片も本発明の範囲内に包含される。これらの抗体断片は、従来の方法、例えば酵素消化により作製されるか、組換え体技術により生成されてもよい。このような抗体断片は、キメラでもよいし、ヒト化のものでもよい。これらの断片は、後述する診断目的及び治療目的のために有用である。

【0057】

モノクローナル抗体は実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、わずかながら存在しうる天然に生じる突然変異体を除いて同一のものである。よって、「モノクローナル」との修飾詞は、別個の抗体の混合物ではなく、抗体の特性を示すものである。

本発明の抗EphB2モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を誘導する。一般的に、EphB2への抗体は、EphB2とアジュバントを複数回皮下(s.c)又は腹腔内(i.p)に注射することにより動物内に生じる。EphB2は当分野で公知の方法を用いて調製されうる。その方法のいくつかは本明細書中でさらに記載される。例えば、EphB2の組み換え産生は以下に記載される。一実施態様では、動物を、免疫グロブリン重鎖のFc部位に融合したEphB2の細胞外ドメイン(ECD)を含有するEphB2の誘導体で免疫化する。好適な実施態様では、動物を、EphB2-IgG1融合タンパク質で免疫化する。通常、動物は、一リン酸化リビドA(MPL)/トレハロースジクリノミコレート(trehalose dicrynomycolate)(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)によりEphB2の免疫原性コンジュゲート又は誘導体に対して免疫化され、該溶液は複数の部位の皮下に注射される。2週後に、動物を追加免疫する。7~14日後、動物から採血して、血清を抗EphB2力価について検定する。力価がプラトーになるまで動物を追加免疫する。

【0058】

別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させ

10

20

30

40

50

る。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒボキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒボキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0059】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

10

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、EphB2に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

20

【0060】

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、DMEM又はRPMI-1640培地が包含される。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

サブクロンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-SEPHAROSE、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

30

【0061】

本発明の抗EphB2抗体は、所望される活性を有する合成抗体クローンをスクリーニングするために、コンビナトリアルライブラリを用いて同定することができる。原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収/溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗EphB2抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗EphB2抗体クローンの構築によって得ることができる。

40

【0062】

抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの超可変ループ又は相補鎖決定領域(CDRs)が存

50

在する。可変ドメインは、Winterら, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

【0063】

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winterら, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffithsら, *EMBO J.*, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

10

【0064】

繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboomら, *Nucl. Acids. Res.*, 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

20

【0065】

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗EphB2クローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合には、検体をEphB2で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び/又は他の末梢血リンパ球(PBLs)である循環B細胞を、ライブラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、EphB2免疫化により、EphB2に対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、抗ヒトEphB2クローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗ヒトEphB2抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

30

【0066】

抗EphB2反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してEphB2特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、EphB2アフィニティークロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識EphB2への細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(FACS)によって得ることができる。

40

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び/又はB細胞又は他のPBLの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、EphB2が免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

50

【 0 0 6 7 】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandiら, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandiら, (1989)及びWardら, *Nature*, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟VDメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJセグメントに基づいた前方向プライマーにより、cDNA及びゲノムDNAから増幅することが可能である。しかしながら、cDNAからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jonesら, *Biotechnol.*, 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastryら, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandiら(1989)又はSastryら(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。好ましくは、例えば、Marksら, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrumら, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及びVL配列を増幅するために、各V遺伝子ファミリーを標的にしたPCRプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandiら(1989)に記載のように、又はClacksonら, *Nature*, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内の1つの末端ヘタグとして導入することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinsonら, *J. Mol. Biol.* 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら, *Nature Genet.*, 3: 88-94(1993)); これらクローニングされたセグメント(H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。VHレパートリーは、また、Barbasら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いH3ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトV_H及びV_Lセグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。VH及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。DNAをコードするV遺伝子の増幅に続いて、生殖系のV遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

【 0 0 6 9 】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefeら, *Gene*, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouseら, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のFabフラグメントが利用される。ナイーブのVH及びVLレパートリーは、1つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この2つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせ

せを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約 10^{12} クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、VH及びVL遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージピリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約 10^{-8} Mの K_d^{-1})の多くの多様な抗体を提供する。

【0070】

別法として、このレパートリーは、例えばBarbasら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clacksonら, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにPCR後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。PCRアセンブリは、また、柔軟なペプチドスパーサーをコードしているDNAとVH及びVL DNAを連結させて、単鎖のFv(scFv)レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内でのPCRアセンブリ」は、Embletonら, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、PCRによってリンパ球内のVH及びVL遺伝子を組み合わせ、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

【0071】

ナイプのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約 $10^6 \sim 10^7$ M $^{-1}$ の K_d^{-1})である可能性があるが、Winterら(1994)、上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkinsら, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGramら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プロンポリメラーゼ(Leungら, Technique, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、1つ又はそれより多いCDRをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のFvクローンにおいて、対象のCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開9607754(1996年3月14日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marksら, Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、 10^{-9} Mの範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

【0072】

E p h B 2 をコードする核酸配列は、E p h B 2 の所望の領域のアミノ酸配列、例えばGenBank寄託番号NM_017449ないしNM_004442又は国際公開公報03/000113の図101に示されるアミノ酸配列のアミノ酸19~542に及ぶ細胞外ドメイン及び/又はGenBank寄託番号NM_017449ないしNM_004442又は国際公開公報03/000113の図101に示されるアミノ酸配列のアミノ酸およそ19~およそ208を含むポリペプチドを用いて設定できる。

これに対して、GenBank寄託番号NM_017449ないしNM_004442又は国際公開公報03/000113の図23のcDNA配列(又はその断片)を用いてもよい。更なるE p h B 2 配列は、例えばAnnu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998)、Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)、国際公開公報2003042661、国際公開公報200053216、国際公開公報2004065576、国際公開公報2004020583、国際公開公報2003004529(128-132ページ)、及び国際公開公報200053216にさらに開示される。E p h B 2 をコードするDNAは、当分野で公知の様々な方法によって、調製できる。これらの方法には、Engels等, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)に記載の何れかの方法、例えばトリエステル、亜リン酸エステル、ホスホラミダイト及びH-ホスホン酸塩方法による化学的な合成法が含まれるがこれに限定されるものではない。一実施態様では、発現宿主細胞に好ましいコドンが、DNAを

コードする E p h B 2 の設定に用いられる。これに対して、E p h B 2 をコードする D N A は、ゲノムないし c D N A のライブラリから単離できる。

【 0 0 7 3 】

E p h B 2 をコードする DNA 分子の構築に続いて、その DNA 分子は、プラスミド等の発現ベクターの発現コントロール配列と作用可能に連結し、このコントロール配列は、そのベクターで形質転換した宿主細胞によって認識される。一般的に、プラスミドベクターは、その宿主細胞と適合する種から誘導された複製及びコントロール配列を有する。このベクターは、通常は、形質転換細胞で表現型の選択を提供することが可能なタンパク質をコードする配列だけでなく複製部位を有する。原核宿主細胞及び真核宿主細胞での発現に好適なベクターは当分野で公知であり、さらにそのいくつかを本明細書に記載する。酵母菌などの原核生物、又は哺乳動物などの多細胞生物由来の細胞が用いられうる。

10

場合によっては、E p h B 2 をコードしている D N A は宿主細胞によって培地中への発現産物の分泌を生じさせる分泌リーダー配列に作用可能に結合される。分泌リーダー配列の例には、stII、エコチン(ecotin)、IamB、ヘルペスGD、Ipp、アルカリホスファターゼ、インベルターゼ、及びアルファ因子が含まれる。ここでの使用にまた適しているのはプロテイン A の 3 6 アミノ酸リーダー配列である(Abrahmsenら, EMBO J., 4:3901(1985))

宿主細胞はこの発明の上述の発現又はクローニングベクターでトランスフェクトされ、好ましくは形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように変性された一般的な培養液中で培養される。

20

【 0 0 7 4 】

トランスフェクションとは、実際に任意のコード化配列が発現するかどうか分からない宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。トランスフェクションの多くの方法は、通常の技能を有する技術者に知られており、例えば、CaPO₄沈降法及び電気穿孔法がある。一般に成功したトランスフェクションは、宿主細胞内で該ベクターの働きの兆候が現れた時に認識される。

形質転換とは、DNAが染色体外成分として又は染色体組み込みによってのいずれかで複製可能となるように、生物にDNAを導入することを意味する。用いる宿主細胞によって、その細胞に適した基本的な技術を用いて形質転換は行われる。形質転換法は当分野で公知であり、そのいくつかをさらに本明細書中に記載する。

30

E p h B 2 を産生するために用いる原核生物宿主細胞は、一般的に、Sambrookら, 上掲に記載のように培養することが可能である。

E p h B 2 を産生するために使用される哺乳動物宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。その培地は当分野で周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

この開示で言及している宿主細胞には、宿主動物内の細胞だけでなくインビトロ培養物の細胞が含まれる。

【 0 0 7 5 】

E p h B 2 の精製は、当分野で認識される方法を用いて実施される。その方法のいくつかを本明細書中に記載する。

40

ファージディスプレイクローンのアフィニティークロマトグラフィー分離での利用のために、例えば、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、種々のアクリルコポリマー、ヒドロキシルメタクリルゲル、ポリアクリル及びポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性及びイオン性担体等の適切な基質へ精製した E p h B 2 を付着させることが可能である。基質への E p h B 2 タンパク質の付着は、Methods in Enzymology, 4 4 巻(1976)に記載されている方法によって完遂することができる。アガロース、デキストラン又はセルロース等の多糖類基質へタンパク質リガンドを付着させるために広く用いられている技術には、ハロゲン化シアンによる担体の活性化、それに続く、活性化基質へのペプチドリガンドの第 1 級脂肪族又は芳香族アミンのカップリングが含まれる。

50

【0076】

あるいは、E p h B 2 は、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の当該分野の方法において利用することが可能である。

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージライブラリの試料を固定化 E p h B 2 と接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbasら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載されているようにアルカリで、又は例えばClacksonら, Nature, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法である E p h B 2 抗原競合によって溶出する。ファージは、1 回目の選択で 20 ~ 1, 000 倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

【0077】

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bassら, Proteins, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarksら, Biotechnol., 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【0078】

親和性に僅かな違いがあったとしても、E p h B 2 に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、上記の幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。E p h B 2 を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異体を保持するために、ファージは、E p h B 2 の標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化 E p h B 2 とインキュベーションできるが、過度のビオチン化 E p h B 2 とインキュベートすることが可能である。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに2倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

【0079】

抗 E p h B 2 クローンは活性選択されうる。一実施態様では、本発明は、E p h B 2 リガンド(例えばエフリン-B 1、エフリン-B 2 及び / 又はエフリン-B 3)と E p h B 2 との結合をブロックするが、E p h B 2 リガンドと第二タンパク質(例えば E p h B 1、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 5 及び / 又は E p h B 6)との結合をブロックしない抗 E p h B 2 抗体を提供する。このような抗 E p h B 2 抗体に対応する F v クローンは、(1) 上記のセクション B (1)(2)に記載のようなファージライブラリから抗 E p h B 2 クローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれぞれについて第二タンパク質と E p h B 2 を選択する、(3) 固定された E p

h B 2 に抗 E p h B 2 フェージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップする E p h B 2 - 結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する。そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって、選別できる。場合によって、所望のブロック / 非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。

【 0 0 8 0 】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードする D N A 又は本発明のファージディスプレイ F v クローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージ D N A 鋳型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、D N A を発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードする D N A の細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【 0 0 8 1 】

本発明の F v クローンをコードする D N A は、重鎖及び / 又は軽鎖定常領域をコードする公知の D N A 配列(例えば好適な D N A 配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び / 又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えば I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E 定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の変域ドメイン D N A から得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び / 又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域 D N A に融合した F v クローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。好適な実施態様では、ヒト変域 D N A から得た F v クローンをヒト定常領域 D N A に融合して、すべてのヒト、完全長ないし一部の重鎖及び / 又は軽鎖のコード配列を形成する。

【 0 0 8 2 】

また、本発明のハイブリドーマ由来の抗 E p h B 2 抗体をコードする D N A は、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えばMorrison等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又は F v クローン由来の抗体ないし抗体断片をコードする D N A は、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明の F v クローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

【 0 0 8 3 】

抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennanら, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、F a b、F v 及び S c F v 抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模生産が容易となる。抗体断片は上述に

において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF (a b')₂断片を形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F (a b')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したF a b及びF (a b')₂断片は米国特許第5,869,046号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖F v断片(s c F V)である。国際公開93/16185；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照のこと。F v及びs F vは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である；したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。s F v融合タンパク質は、s F vのアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

10

【0084】

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は従来からよく知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのF R残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

20

【0085】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域として受け入れる(Simsほか, J. Immunol., 151:2296 (1993)；Chothiaら, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carterほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；Prestaほか, J. Immunol., 151:2623(1993))。

30

【0086】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、ある方法によって、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

40

50

【 0 0 8 7 】

ヒト抗体

本発明のヒト抗 E p h B 2 抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択した F v クローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗 E p h B 2 抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner 等, J. Immunol., 147: 86 (1991) によって記載されている。

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255(1993); Jakobovits 等, Nature 362, 255-258(1993)を参照のこと。

【 0 0 8 8 】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性および特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、上記のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒト V ドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖/ヒト鎖 s c F v ないし F a b キメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラ s c F v ないし F a b が単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日公開のPCT特許出願WO 93/06213を参照)。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

【 0 0 8 9 】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒト抗体ないしヒト化抗体である。この場合、結合特異性の一つは E p h B 2 に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。例示的な二重特異性抗体は、E p h B 2 タンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。また、二重特異性抗体は E p h B 2 を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体は E p h B 2 結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えば F (a b ')₂ 二重特異性抗体)として調製することができる。

【 0 0 9 0 】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millsteinら, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行わ

れる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が1993年5月13日に公開の国際公報93/08829及びTrauneckerら、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

異なったより好適なアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

20

30

40

50

【0091】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0092】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4,676,980号)及びHIV感染の治療(国際公報91/00360、国際公報92/00373及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4,676,980号などに記されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら、Science, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0093】

最近の進歩により大腸菌から F a b' - S H 断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体にを形成する。Shalaby 等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体 F (a b')₂ 分子の産生について記述している。各々の F a b' 断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、H E R 2 を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

【 0 0 9 4 】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelnyら, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b' 部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V_L) に重鎖可変ドメイン (V_H) を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol., 147:60(1991)。

【 0 0 9 5 】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体 (I g M クラス以外のもの) であり得 (例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインは F c 領域又はヒンジ領域を有する (又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体は F c 領域と、F c 領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する (又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖 (好ましくは2つのポリペプチド鎖) を有し、ポリペプチド鎖 (類) は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖 (類) は V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - (X 2)_n - F c を有し、ここで V D 1 は第1の可変ドメインであり、V D 2 は第2の可変ドメインであり、F c は F c 領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1 及び X 2 はアミノ酸又はポリペプチドを表し、n は0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖 (類) は : V H - C H 1 - 柔軟なリンカー - V H - C H 1 - F c 領域鎖 ; 又は V H - C H 1 - V H - C H 1 - F c 領域鎖 を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ (好ましくは4つ) の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2 ~ 約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によっては C L ドメインを更に有する。

【 0 0 9 6 】

抗体変異体

いくつかの実施態様では、ここに開示する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性および/または生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗

体のアミノ酸配列変異体は、抗体の核酸に適切なヌクレオチド変化を導入して、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、又は挿入或いは置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入又は置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、配列ができるときに被検体の抗体アミノ酸配列に導入されうる。

突然変異誘発に好ましい位置である抗体の特定の残基または領域の同定に有益な方法は、CunninghamおよびWellsによりScience, 244:1081-1085 (1989年)に開示されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基または残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電した残基)、中性の、または負に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはボリアラニン)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、または置換の部位のために、さらなる、または他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要はない。例えば、任意の部位における突然変異の機能を分析するために、標的コドンまたは領域においてa l aスキャニングまたはランダム突然変異誘発を実行し、発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【0097】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ-末端融合および/またはカルボキシ-末端融合、ならびに、単一または多重アミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例には、N-末端メチオニル残基を持つ抗体、または細胞障害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドまたは(例えばADEPTのための)酵素の抗体のN-末端またはC-末端への融合が含まれる。

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

【0098】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のもの)を含むように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

抗体がFc領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体のFc領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国特許公開願番号2003/0157108(Presta, L.)に記載される。米国公開特許2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体のFc領域に接着した炭水化物内のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を二分する抗体は、国際公報03/011878, Jean-Mairet等、及び米国特許第6,602,684号, Umana等に参照されている。抗体のFc領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報97/30087, Patel等に報告される。また、抗体のFc領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報98/58964 (Raju, S.)及び国際公報99/22764 (Raju, S.)も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国特許公開2005/0123546 (Umana等)を参照。

【0099】

本明細書中の好適なグリコシル化変異形はF c領域を含有し、F c領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善されたA D C C機能を有する。場合によって、F c領域は、更にA D C Cを改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えばF c領域の位置298、333および/または334の置換(E u残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」または「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開番号2003/0157108；国際公報2000/61739；国際公報2001/29246；米国公開番号2003/0115614；米国公開番号2002/0164328；米国公開番号2004/0093621；米国公開番号2004/0132140；米国公開番号2004/0110704；米国公開番号2004/0110282；米国公開番号2004/0109865；国際公報2003/085119；国際公報2003/084570；国際公報2005/035586；国際公報2005/035778；；国際公報2005/053742；Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；およびYamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失Lec13 CHO細胞 (Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国公開番号2003/0157108, Presta, L；および国際公報2004/056312, Adams 等, 特に実施例11)、およびノックアウト細胞株、例として -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8,-ノックアウトCHO細胞 (Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))などがある。

10

【0100】

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基に異なる残基が挿入されている。置換突然変異について最も関心ある部位は高度可変領域を含むが、F R交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表1に示す。これらの置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入して、生成物をスクリーニングしてよい。

20

【0101】

表1

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|---------|------------------------------------|--------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Asp, Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu; Asn | Glu |
| Cys (C) | Ser; Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn; Glu | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln | Asp |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン | Leu |
| Leu (L) | ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン | Leu |

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性の親水性：cys、ser、thr、asn、gln；

(3) 酸性：asp、glu；

(4) 塩基性：his、lys、arg；

(5) 鎖配向に影響する残基：gly、pro；及び

(6) 芳香族：trp、tyr、phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【 0 1 0 3 】

ある型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は

、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6 - 7 部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM 1 3 の遺伝子I I I 産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスクランニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

10

20

30

40

50

【0104】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのFc領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域変異型を生成することが望ましい。Fc領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾(例えば、置換)を有するヒトFc領域配列(例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含みうる。

【0105】

当分野での記載や教示に従って、ある実施態様では、本発明の方法を用いた抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばFc領域内に一以上の変異を有することを考慮する。にもかかわらず、この抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性を示す実質的に同じ特徴を維持している。例えば、WO99/51642などに記載のようにC1q結合及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)を変更する(すなわち改良又は減少する)結果となるFc領域内に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Fc領域変異型の他の例に関するDuncan & Winter Nature 322:738-40 (1988) ; 米国特許第5,648,260号 ; 米国特許第5,624,821号 ; 及び国際公開公報94/29351を参照。国際公開公報00/42072(Presta)及び国際公開公報2004/056312(Lowman)は、FcRへの結合が改善したか、減退した抗体変異体を開示している。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Shields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。半減期が増加して、胎児への母性IgGの移送を担う(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))新生児Fcレセプター(FcRn)への結合が改善している抗体は、米国特許公開2005/0014934A1 (Hinton等)に開示されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するFc領域を含んでなる。Fc領域アミノ酸配列が変更されてC1q結合能力が増加したか減少したポリペプチド変異体は、米国特許第6,194,551号B1、国際公開公報99/51642に開示される。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Idusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【0106】

抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマ

ー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

10

20

30

40

50

【0107】

所望の特性を有する抗体のスクリーニング

本発明の抗体は当該分野で知られている様々なアッセイによってその物理的/化学的性質及び生物学的機能について特徴付けることができる。いくつかの実施態様では、抗体は、E p h B 2 活性化の減少又はブロック、E p h B 2 下流分子のシグナル伝達の減少又はブロック、E p h B 2 リガンド活性化の減少又はブロック、E p h B 2 リガンド下流分子のシグナル伝達の減少又はブロック、E p h B 2 に対するリガンド(例えばエフリン-B 1、エフリン-B 2 及び/又はエフリン-B 3)結合の破壊又はブロック、E p h B 2 リン酸化及び/又はE p h B 2 多量体化、及び/又はE p h B 2 リガンドリン酸化、及び/又は腫瘍、細胞増殖性疾患又は癌の治療及び/又は防止; 及び/又はE p h B 2 発現及び/又は活性(例えばE p h B 2 発現及び/又は活性の増加)と関連する疾患の治療又は防止の何れか一又は複数に特徴がある。

精製された抗体は、限定されるものではないが、N末端シーケンシング、アミノ酸解析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパパイン消化を含む一連のアッセイによって更に特徴付けることができる。

【0108】

本発明の特定の実施態様では、ここで生産された抗体はその生物学的活性について分析される。ある実施態様では、本発明の抗体はその抗原結合活性について試験される。当該分野で知られ、ここで使用することができる抗原結合アッセイには、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、エライザ(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインAイムノアッセイのような技術を用いた任意の直接的又は競合的結合アッセイが制限なく含まれる。抗原結合アッセイは以下の実施例の項で解説する。

他の実施態様では、本発明は、ハイブリドーマ細胞株2H9.11.14(ATCC 寄託番号PTA-6606)により産生される抗E p h B 2 モノクローナル抗体(本明細書では「2H9」又は「Ma b 2H9」と交換可能に称する)を提供する。

【0109】

さらに他の実施態様では、本発明は、E p h B 2 への結合について2H9抗体と競合する抗E p h B 2 モノクローナル抗体を提供する。このような競争抗体には、抗体2H9により認識されるE p h B 2 エピトープと同じか、このエピトープとオーバーラップするE p h B 2 エピトープを認識する抗体が含まれる。このような競争抗体は、標識した2H9抗体と競争して固定されたE p h B 2 へ結合することについて、抗E p h B 2 ハイブリドーマ上清をスクリーニングすることによって、得ることができる。競合抗体を含有するハイブリドーマ上清は、無関係な抗体を含有する(又は抗体を含有しない)コントロール結合混合物において、検出される結合した標識抗体の量と比較して、被検体競合結合混合物において、検出される結合した標識抗体の量が減少しているであろう。本明細書に記載の何れか

の競合結合アッセイが前述の手順に適している。

他の態様では、本発明は、2H9抗体の一又は複数(例えば2、3、4、5及び/又は6)のHVRを含んでなる抗EphB2モノクローナル抗体を提供する。2H9の一又は複数のHVRを含んでなる抗EphB2モノクローナル抗体は、2H9の一又は複数のHVRを鋳型抗体配列、例えば親の抗体の対応するマウス配列に最も近接するヒト抗体配列、又は親の抗体軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に融合させ、結果として生じたキメラ軽鎖及び/又は重鎖の可変領域配列を、定常領域配列(一又は複数)を伴うことの有無にかかわらず、本明細書に記載の組換え宿主細胞内で発現させることによって構築できる。

【0110】

本明細書に記載の特有の性質を有する本発明の抗EphB2抗体は、任意の簡便な方法によって、所望の性質について抗EphB2ハイブリドーマクローンをスクリーニングすることによって、得られうる。例えば、EphB2に対するEphB2リガンドの結合をブロックするかブロックしない抗EphB2モノクローナル抗体が望まれる場合、候補抗体は、結合競合アッセイ、例として競合的結合ELISAにて試験できる。このアッセイでは、EphB2にてプレートウェルをコートして、過剰量の対象のEphリガンドとの抗体溶液をコートしたプレートに重ね、例えば結合した抗体と西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート抗Ig抗体ないしビオチン化した抗Ig抗体とを作用させてHRP呈色反応を起こす、例えば、ストレプトアビジン-HRP及び/又は過酸化水素にてプレートを反応させて、ELISAプレートリーダーによる490nmの分光測定によって、HRP呈色反応を検出することによって、結合した抗体を酵素的に検出する。

EphB2活性化を阻害する抗EphB2抗体が望まれる場合、候補抗体をEphB2リン酸化アッセイにて試験できる。このようなアッセイは当分野で周知であり、そのようなアッセイは実施例の項目に記載され、例証される。抗体の内部移行を妨げる抗体が望まれる場合、候補アッセイは細胞内部移行アッセイにおいて、試験できる。このようなアッセイは当分野で周知であり、そのようなアッセイは実施例の項目に記載され、例証される。

細胞を死滅するか又は細胞成長を阻害する抗EphB2抗体又は免疫コンジュゲートが望まれる場合、候補抗体又は免疫コンジュゲートは、細胞成長の細胞死滅及び/又は阻害を測定する、インビトロ及び/又はインビボアッセイにおいて、試験できる。このようなアッセイは当分野で周知であり、本明細書中でさらに記載され、例証される。

【0111】

一実施態様では、本発明はすべてではなくいくつかのエフェクター機能を有する変更した抗体を考慮し、このことによって抗体のインビボ半減期が重要なある種のエフェクター機能(補体又はADCCなど)が不要で有害である多くの手法の所望する候補となる。特定の実施態様では、生成した免疫グロブリンのFc活性を測定して、所望の特性が維持されていることを確認する。インビボ及び/又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、CDC及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠損している(すなわちADCC活性をほとんど欠損している)が、FcRn結合能は維持していることを確認することができる。ADCCに参与している第一細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現しており、その一方で単核細胞はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現している。造血系細胞でのFcR発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの例は、米国特許第5,500,362号又は同第5,821,337号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のADCC活性は、例えばClynesら, PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデル内でインビボに評価することができる。また、C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合できない、つまりCDC活性を欠損していることを確認してもよい

。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro ら., J. Immunol. Methods 202 :163 (1996)に記載のように、C D Cアッセイを行ってもよい。また、F c R n 結合及びインビボクリアランス / 半減期測定を、当分野で公知の方法、例えば実施例の項目で示す方法を用いて行うことができる。

【 0 1 1 2 】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(D N A の増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするD N A は従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、好適な宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E 定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れかから得られうることは理解されるであろう。

【 0 1 1 3 】

a. 原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

i. ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はP C R 法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(R B S)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

【 0 1 1 4 】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるp B R 3 2 2を用いて形質転換する。p B R 3 2 2はアンピシリン(A m p)及びテトラサイクリン(T e t)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。p B R 3 2 2、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるp B R 3 2 2 誘導体の例はCarter等の米国特許第5 6 4 8 2 3 7号に詳細に記載されている。

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、G E M . T M . - 1 1のようなバクテリオファージを、大腸菌L E 3 9 2のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

【 0 1 1 5 】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモータ - シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモータはその発現を調節するシストロンの

上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモーターを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモーターを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び/又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【0116】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクトマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等(1980) Cell 20:269)。

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

【0117】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌trxB⁻系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(Serratia marcescans)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(Vitreoscilla)又はパラコッカス(Paracoccus)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lacIq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kan^R を有する33D3株(米国特許第5,639,635号)を含むW3110株(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446)、大腸菌B、大腸菌

10

20

30

40

50

776 (ATCC 31,537) 及び大腸菌RV308(ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bassら., *Proteins*, 8:309-314 (1990) に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、又は p K N 4 1 0 のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

10

【0118】

ii. 抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNAを原核生物宿主中に導入し、そのDNAを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール/DMSOを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

20

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地(LB)プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

【0119】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリール及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

30

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、好適な温度は約20 から約39、より好ましくは約25 から約37 の範囲、更により好ましくは約30 である。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。大腸菌に対しては、pHは好ましくは約6.8から約7.4、より好ましくは約7.0である。

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。好ましくは、リン酸限定培地はC, R, A, P培地である(例として、Simmonsら., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

40

【0120】

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タ

50

ンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、好ましくは約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

【0121】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD₅₅₀まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等(1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

【0122】

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等(1998); Georgiou等, 米国特許第5264365号; Georgiou等, 米国特許第5508192号; Hara等(1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

【0123】

iii. 抗体精製

当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である: 免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカ又はDEAEなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

10

20

30

40

50

一態様では、固形層に固定したプロテイン A を本発明の完全長抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテイン A は抗体の F c 領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した 41 kD の細胞壁タンパク質である。Lindmark ら (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテイン A を固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、より好ましくは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムが好ましい。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐためにグリセロールなどの試薬でコートされている。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテイン A 固定固形層に適応し、プロテイン A に対象とする抗体を特異的に結合させる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

10

【0124】

b. 真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、ベクターは、限定するものではないが、以下の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子。

(i) シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘル

20

ペス gD シグナルが利用できる。

このような前駆体領域の DNA は、多価抗体をコードする DNA に読み取り枠を一致させて結合される。

【0125】

(ii) 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、SV40 開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

(iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

30

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【0126】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えば DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び II、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

40

例えば、DHFR 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、まず、DHFR の競合的アンタゴニストであるメトトレキセート (Mtx) を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 株化細胞である(例として、ATCC CRL-9096)。

あるいは、抗体をコードする DNA 配列、野生型 DHFR タンパク質、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性 DHFR を含む野生型宿主)は、カナマ

50

イシン、ネオマイシンあるいはG 4 1 8のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照のこと。

【0127】

(iv) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され抗体ポリペプチド核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCACAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるAATAA配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウィルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0128】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体ポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0129】

(vi) 転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【0130】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巢細胞/-DHF R(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); パッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(He p G 2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT 0 6 0 5 6 2, ATCC CCL 51); TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS 4細胞; 及びヒト肝癌株(He p G 2)である。

10

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

20

【0131】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM), (シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

30

【0132】

(ix) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

40

【0133】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしての

50

プロテイン A の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリン F c 領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark 等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss 等, EMBO J. 5: 165715 75 (1986))。アフィニティリーガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C_H3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABX^{T M} 樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上での SEPHAROSE^{T M} クロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

10

予備的精製工程に続いて、目的の抗体および混入物を含む混合液を pH 約 2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度 (例として、約 0 - 0.25 M 塩) の溶出緩衝液を用いて低 pH 疎水性作用クロマトグラフィーを行う。

【0134】

免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素 (例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体 (すなわち放射性コンジュゲート) などの細胞毒性剤にコンジュゲートした本明細書中に記載の何れかの抗 E p h B 2 抗体を含む、免疫コンジュゲート (「抗体 - 薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される) を提供する。

20

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬に抗体 - 薬剤コンジュゲートを用いると (Syrigos 及び Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第 4,975,278 号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる (Baldwin ら., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera ら. (eds), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている (Rowland ら., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる (Rowland ら., (1986)、上掲)。抗体 - 毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン (Mandler ら (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92 (19):1573-1581; Mandler ら (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler ら (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド (EP 1391213; Liu ら., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン (Lode ら (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman ら (1993) Cancer Res. 53:3336-3342) などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA 結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

30

40

【0135】

ゼバリン (ZEVALIN) (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idex) は正常及び悪性の B リンパ球の細胞表面上にみられる CD 20 抗原に対するマウス Ig G 1 モノクローナル抗体と ¹¹¹In 又は ⁹⁰Y 放射性同位体とがチオウレアリンカ

50

ーキレート剤にて結合した抗体 - 放射性同位体コンジュゲートである(Wisemanら (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wisemanら (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼパリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したh u C D 3 3抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーS P Pを介してメイタンシノイド薬剤分子D M 1と連結しているh u C 2 4 2抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、C a n A gを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第I I相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子D M 1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(P S M A)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるM L N - 2 7 0 4(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE (A E)及びモノメチルアウリスタチン(M M A E)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体c B R 9 6(癌細胞上のルイスYに特異的)及びc A C 1 0(血液系悪性腫瘍上のC D 3 0に特異的)(Doroninaら (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療の開発段階にある。

10

20

【 0 1 3 6 】

免疫複合体(免疫コンジュゲート)の生成に有用な化学治療薬を本明細書中(上記)に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI, PAPII, 及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開公報93/21232を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

30

40

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichotheine)及びC C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【 0 1 3 7 】

50

i. メイタンシン及びメイタンシノイド

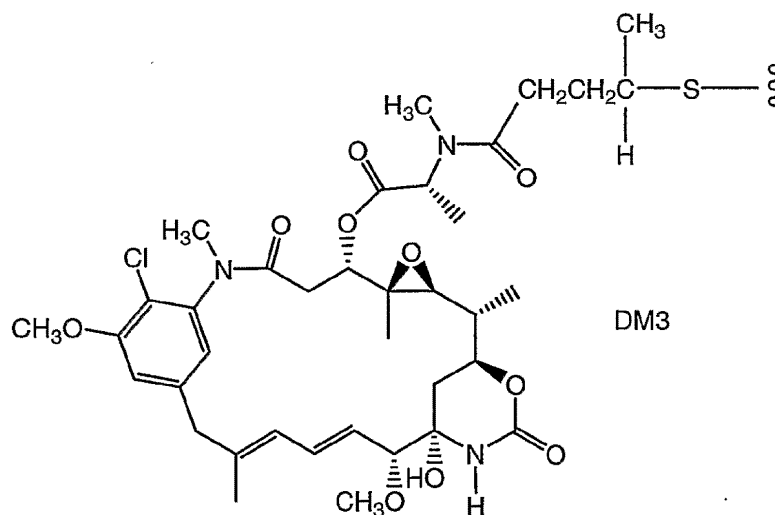
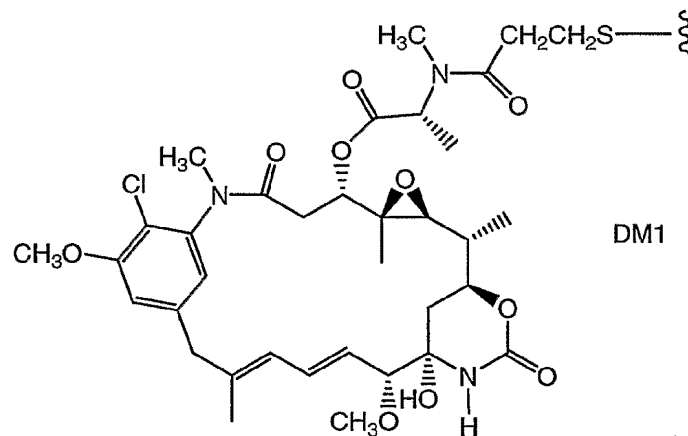
いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

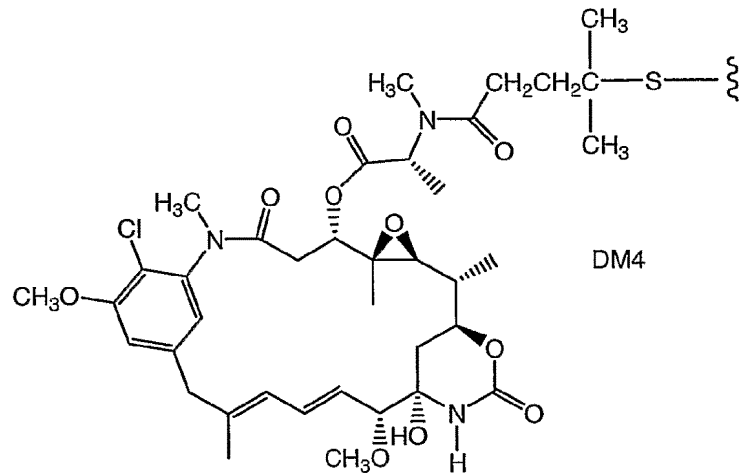
メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ *Maytenus serrata* から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号；同4,248,870号；同4,256,746号；同4,260,608号；同4,265,814号；同4,294,757号；同4,307,016号；同4,308,268号；同4,308,269号；同4,309,428号；同4,313,946号；同4,315,929号；同4,317,821号；同4,322,348号；同4,331,598号；同4,361,650号；同4,364,866号；同4,424,219号；同4,450,254号；同4,362,663号；及び同4,371,533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0138】

メイタンシノイド薬剤分子の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3及びDM4が含まれる：



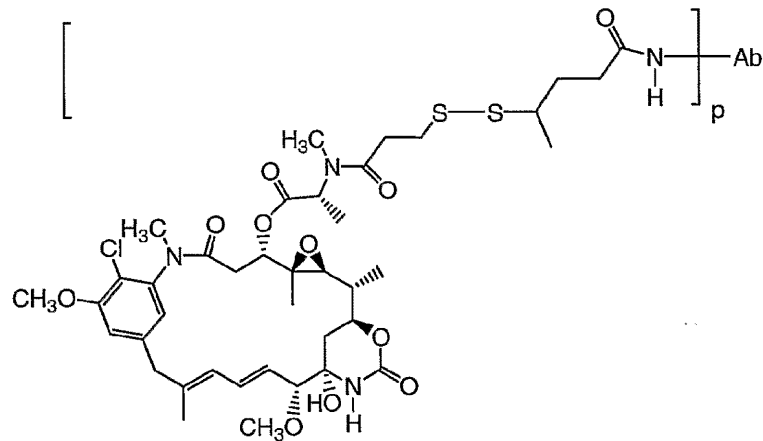


10

【 0 1 3 9 】

ここで、波形の線は、抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。

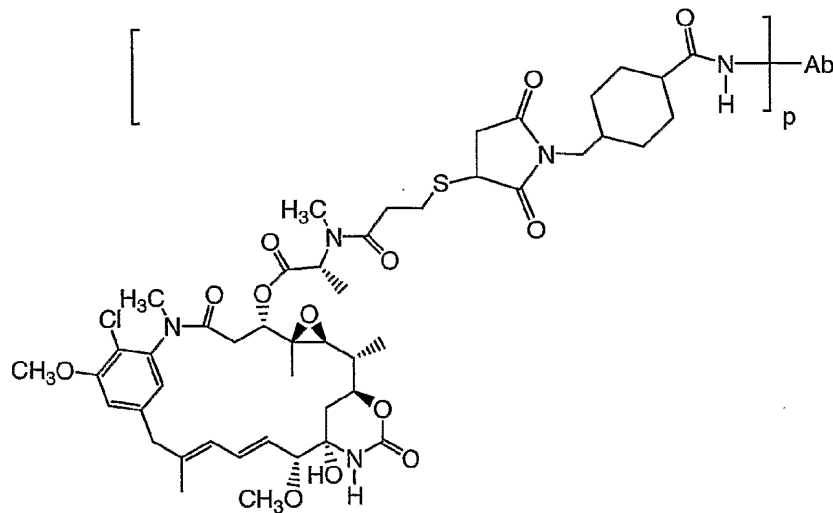
他の例示的なメイタンシノイド抗体薬剤コンジュゲートは、以下の構造および略号を有する(ここで、Abは抗体であり、pは1~約8である)：



20

Ab-SPP-DM1

30

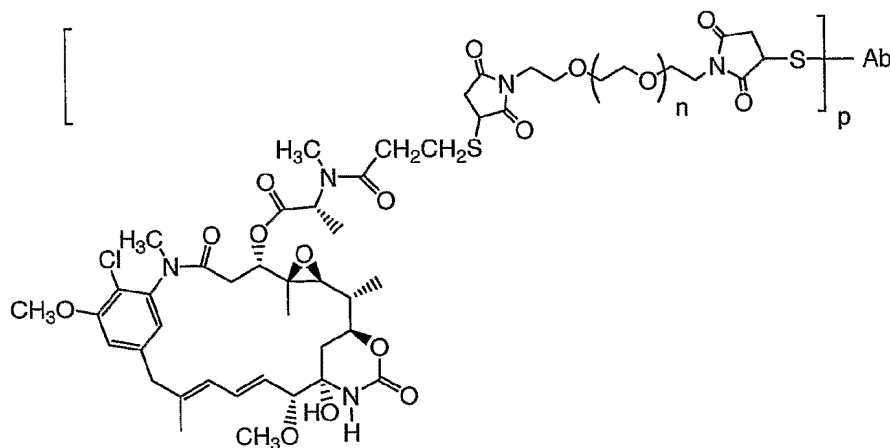


40

Ab-SMCC-DM1

【 0 1 4 0 】

DM1がBMPEOリンカーを介して抗体のチオール基に連結される例示的な抗体薬剤コンジュゲートは、以下の構造及び略号を有する：



Ab-BMPEO-DM1

ここで A b は抗体であり ; n は 0、1 又は 2 であり ; p は 1、2、3 又は 4 である。

【0141】

メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235 B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体 C 2 4 2 に結合する D M 1 と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52 : 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体 A 7、又は H E R - 2 / n e u オンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体 T A . 1 に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。T A . 1 -メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞 S K - B R - 3 におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 H E R - 2 表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A 7 -メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【0142】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5,208,020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3 - 4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5,208,020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第5,208,020号又は欧州特許第0425235 B1号、Chari等, Cancer Research, 52 : 127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分 S M C C を含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602に開示されるように調製されうる。結

10

20

30

40

50

合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

【0143】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピマートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施形態において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0144】

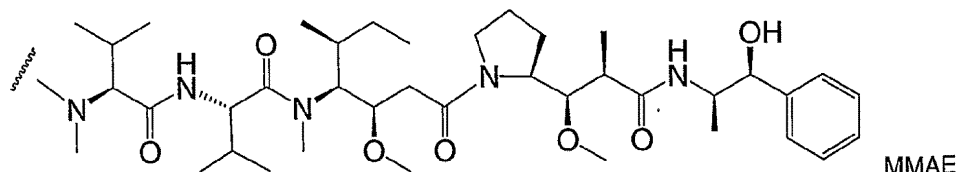
ii. アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号; 同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke 等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(US 5663149)及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開公報02/088172)。

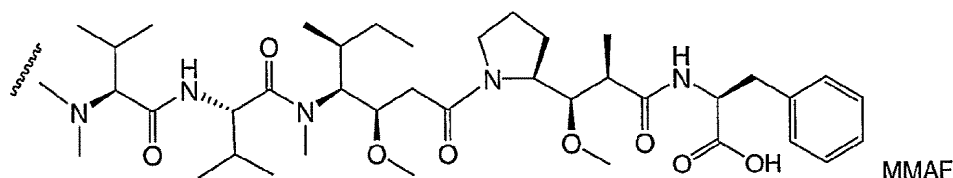
例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分DE及びDFを含み、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に組み込まれる。

【0145】

例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAEである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)。



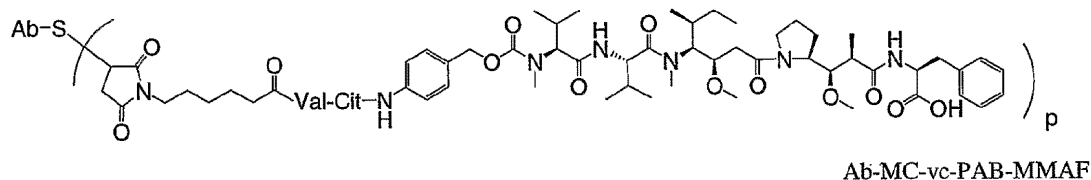
例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAFである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)。



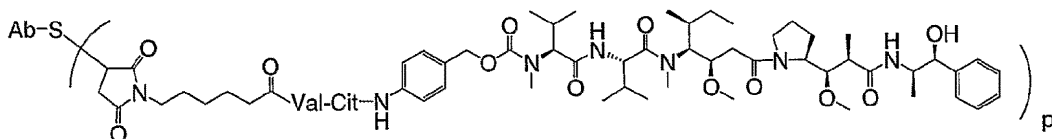
【 0 1 4 6 】

MMAE 又は MMAF 及び様々なリンカー構成成分(本明細書においてさらに記述される)を含んでなる更なる例示的な実施態様は、以下の構造及び略号を有する(ここで、A b は抗体を意味し、p は 1 ~ 約 8 である)：

10

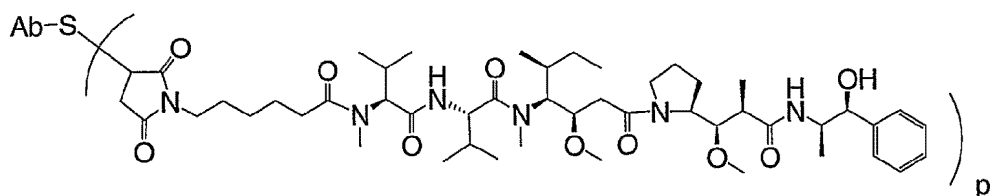


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



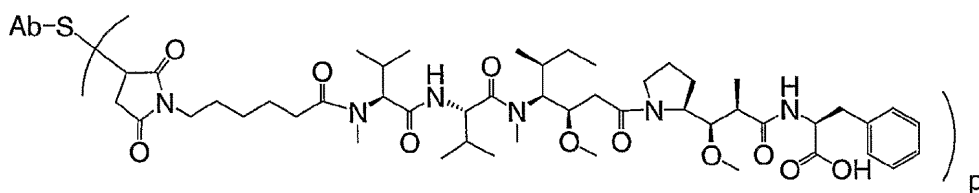
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

20



Ab-MC-MMAE

30



Ab-MC-MMAF

【 0 1 4 7 】

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2 以上のアミノ酸及び / 又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press を参照)。アウリスチチン / ドラスタチン薬剤成分は、US 5635483; US 5780588; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及び Pettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863の方法に従って調製されうる。また、Doroni na (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 2004年11月5日出願のUS Ser. No. 10/983,340も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる(例えば、リンカー及びモノメチルバリン化合物、例えば MMAE 及びリンカーにコンジュゲートした MMAF の調整方法を開示している)。

40

50

【 0 1 4 8 】

iii. カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N-アセチル- 1^I 、P S A G及び 1^I (Hinman等, Cancer Research, 53 : 3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58 : 2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQ F Aである。カリケアマイシン及びQ F Aは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

10

【 0 1 4 9 】

iv. 他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、B C N U、ストレプトゾイシン、ピンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にL L - E 3 3 2 8 8 複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラ

20

マイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28

30

日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【 0 1 5 0 】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 $R e^{186}$ 、 $R e^{188}$ 、 $S m^{153}$ 、 $B i^{212}$ 、 P^{32} 、 $P b^{212}$ 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば $t c^{99m}$ 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

40

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $t c^{99m}$ 又は I^{123} 、 $R e^{186}$ 、 $R e^{188}$ 及び $I n^{111}$ は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80 : 49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(

50

Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0151】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピマートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyI-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

【0152】

v. 抗体薬剤コンジュゲートの調製

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態および試薬を用いて調製されうる：(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SP P」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシラート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に出願した米出願番号10/983,340を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

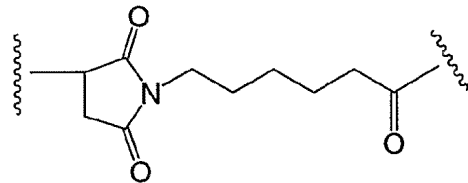
【0153】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルア

ラニン(alf又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

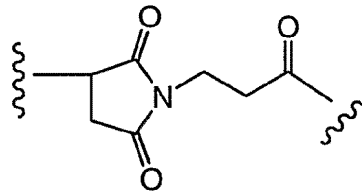
【0154】

例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線はADCの他の構成成分への共有結合の部位を示す)：



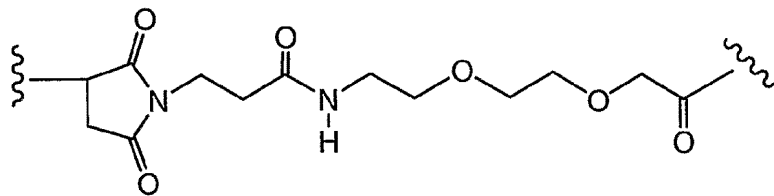
MC

10



MP

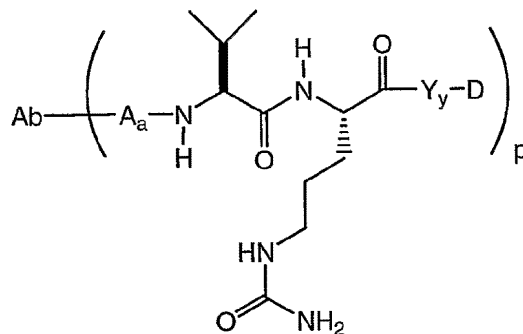
20



MPEG

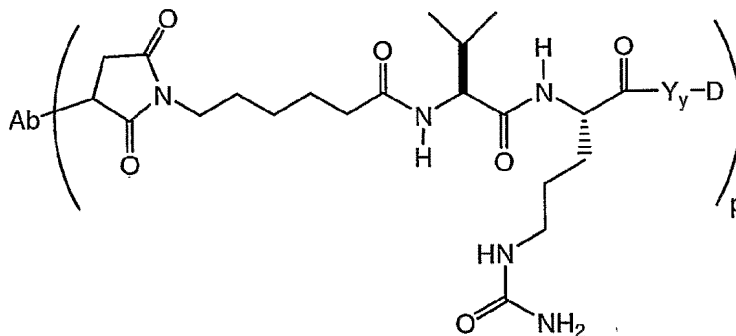
【0155】

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(Ab)及びリンカーが示されており、pは1～約8である)：



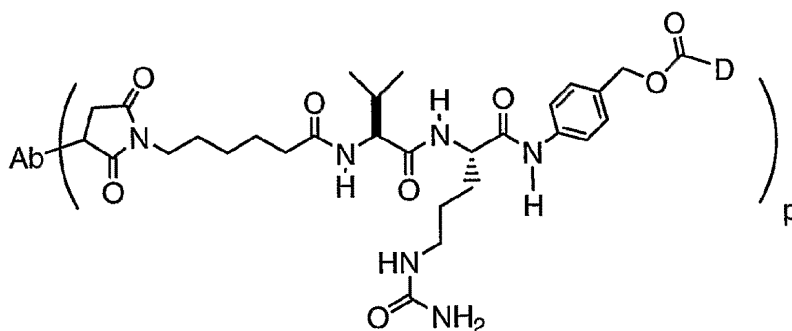
Val-cit

40



MC-val-cit

50



MC-val-cit-PAB

【 0 1 5 6 】

10

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(i) N末端アミノ基、(ii) 側鎖アミノ基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、および(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およびリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

20

【 0 1 5 7 】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミノ基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

30

40

【 0 1 5 8 】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物)；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基、が含まれる。

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊

50

しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0159】

抗体(Ab)-MC-MMAEは、本明細書中に提供される何れかの抗体と以下のMC-MMAEとのコンジュゲートにより調製されうる。抗体は、pH 8.0の500mM ホウ酸ナトリウムと500mM 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の100mM ジチオトレイトール(DTT)で処理した。37℃で30分インキュベートした後、Sephadex G25樹脂で溶出することによって、バッファを交換して、1mM DTPAを含むPBSにて溶出した。溶液の280nmの吸光度とDTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて412nmの吸光度の測定によるチオール濃度から減少した抗体濃度を決定することによって、チオール/Ab値を調べる。PBSに溶解した減少した抗体を氷上で冷やす。薬剤リンカー試薬であるマレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、すなわちMC-MMAEをDMSOに溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やした減少した抗体2H9を含むPBSに添加する。およそ1時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって、濃縮し、2H9-MC-MMAEを精製して、PBSのG25樹脂による溶出によって、脱塩して、無菌条件下で0.2mmのフィルターに濾過して、保存のために凍結した。

【0160】

抗体-MC-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAEは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAEと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。

抗体-SMCC-DM1は、以下のSMCC-DM1と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。精製された抗体は、(スクシンイミジル4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC、Pierce Biotechnology, Inc)で誘導体化して、SMCCリンカーを導入する。具体的には、50mM リン酸カリウム/50mM 塩化ナトリウム/2mM EDTA、pH 6.5中で、7.5モル等量のSMCC(DMSO中に20mM、6.7mg/mL)にて20mg/mLの抗体を処理した。室温のアルゴン下で2時間撹拌した後に、反応混合物を、50mM リン酸カリウム/50mM 塩化ナトリウム/2mM EDTA、pH 6.5にて平衡化したSephadex G25カラムにてろ過する。抗体を含有する分画をプールして、アッセイする。

【0161】

このようにして調製される抗体-SMCCは、50mM リン酸カリウム/50mM 塩化ナトリウム/2mM EDTA、pH 6.5で希釈して、最終濃度およそ10mg/mLとし、10mMのDM1の溶液を含むジメチルアセトアミドにて反応させる。反応は、16.5時間、室温、アルゴン下にて撹拌して行う撹拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、pH 6.5の1xPBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5x4.9cm)にろ過する。252nmと280nmの吸光度で測定されるように、抗体に対するDM1薬剤の比率(p)はおよそ2~5でありうる。

Ab-SPP-DM1は、本明細書中で提供される何れかの抗体と以下のSPP-DM1とのコンジュゲートにより調製されうる。精製された抗体は、ジチオピリジル基を導入するために、N-

スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエートによって、誘導体化される。NaCl(50 mM)及びEDTA(1 mM)を含有する44.7 mLの50 mM リン酸カリウムバッファ(pH 6.5)中の抗体(376.0 mg、8 mg/mL)を、SPP(2.3 mL エタノール中に5.3のモル等量)にて処理した。室温、アルゴン下にて90分間インキュベートした後、抗応混合物を、35 mMのクエン酸ナトリウム、154 mM NaCl、2 mM EDTAにて平衡化したSephadex G25カラムにろゲル濾過する。抗体含有分画をプールして、アッセイした。抗体の修飾の程度は、上記の通りに決定される。

【0162】

抗体-SPP-Py(およそ10 mmolの解放可能な2-チオピリジン基)を上記の35 mM クエン酸ナトリウムバッファ、pH 6.5にて希釈して、およそ2.5 mg/mLの終濃度にした。次いで、DM1(1.7等量、17 mmol e)を含む3.0 mMのジメチルアセトアミド(DMA、最終反応混合物中3%v/v)を抗体溶液に添加する。およそ20時間、室温、アルゴン下にて反応を行う。反応物を、35 mM クエン酸ナトリウム、154 mM NaCl、pH 6.5にて平衡化したセファクリルS300ゲル濾過カラム(5.0 cm x 90.0 cm、1.77 L)に流す。流速はおよそ5.0 mL/分よく、65の分画(各々20.0 mL)を回収する。抗体分子当たりの結合されるDM1薬剤分子の数(p')は、252 nm及び280 nmの吸光度を測定して決定し、抗体当たりのDM1薬剤成分をおよそ2~4としてもよい。

抗体-BMPEO-DM1は、本明細書中に示される何れかの抗体と以下のBMPEO-DM1とのコンジュゲートにより調製されうる。抗体を、ビスマレイミド試薬BM(PEO)4 (Pierce Chemical)にて修飾して、抗体の表面上の反応していないマレイミド基を除去する。これは、BM(PEO)4を50%のエタノール/水混合液に10 mMの濃度になるまで溶解して、およそ1.6 mg/mL(10 マイクロモル)の濃度でリン酸緩衝食塩水に抗体を含有する溶液に10倍のモル過剰量を加え、1時間反応させて、抗体-リンカー中間生成物である抗体-BMPEOを形成させることにより達成される。150 mMのNaClバッファと0 mMのクエン酸塩、pH 6のゲル濾過(HiTrap column, Pharmacia)によって、過剰なBM(PEO)4を取り除く。およそ10倍のモル過剰DM1を、ジメチルアセトアミド(DMA)に溶解して、抗体-BMPEO中間生成物に加える。また、ジメチルホルムアミド(DMF)を用いて薬剤成分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させて、PBSでゲル濾過ないし透析を行って反応していないDM1を取り除く。PBSのS200カラムによるゲル濾過を用いて、高分子量凝集塊を取り除いて、精製された抗体-BMPEO-DM1に供給する。

【0163】

医薬製剤

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシipientに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファ；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【 0 1 6 4 】

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要ならば一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものも含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)に開示されている。

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【 0 1 6 5 】

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の免疫グロブリンを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【 0 1 6 6 】

使用

本発明の抗体を、例えば、インピトロ、エクスピボ及びインピボの治療法に用いてもよい。

一態様では、本発明は、E p h B 2 の発現増加及び/又は活性増加に関連する腫瘍、癌及び/又は細胞増殖性疾患を治療するか又は予防するための方法であって、このような治療を必要とする被検体に有効量の抗E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲートが投与されることを含む方法を提供する。

一態様では、本発明は、治療を必要とする被検体に、有効量の抗E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート(実施態様によっては、本発明の抗E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲート)が投与されることを含む、腫瘍細胞を死滅させる方法を提供する。

一態様では、本発明は、治療を必要とする被検体に、有効量の抗E p h B 2 抗体又は免疫コンジュゲートが投与されることを含む、腫瘍又は癌の成長を低減、阻害ないしは予防する方法を提供する。

【 0 1 6 7 】

さらに、少なくとも本発明のいくつかの抗体は、他の種由来の抗原を結合しうる。したがって、本発明の抗体は、例えば、抗原を含有する細胞培養物、ヒト被験者、又は、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の哺乳類の被検体(例えばチンパンジ、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)において、特異的な抗原活

性を結合するために用いてもよい。一実施態様では、本発明の抗体は、抗原活性が阻害されるように抗原と抗体を反応させることによって、抗原活性を阻害するために用いることができる。抗原はヒトタンパク質分子であることが望ましい。

一実施態様では、本発明の抗体は、抗原の発現及び／又は活性の増加に関連する疾患に罹患している被検体での抗原を結合する方法であって、被検体の抗原が結合されるように本発明の抗体が被検体に投与されることを含む方法に用いることができる。好ましくは、抗原はヒトのタンパク質分子であり、被検体はヒト被験者である。これに対して、被検体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現している哺乳動物であってもよい。また更に、被検体は、抗原が導入されている(例えば、抗原の投与、又は抗原導入遺伝子の発現によって、)哺乳動物であってもよい。本発明の抗体は、治療目的のためにヒト被験者に投与されてもよい。さらに、本発明の抗体は、獣医学のために又はヒト疾患の動物モデルとしての、免疫グロブリンが交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳動物(例えば霊長類、ブタ又はマウス)に投与されてもよい。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体の治療有効性を評価するため(例えば、投与の用量及び時間経過の試験)に有用でありうる。

10

【0168】

本発明の抗体を、一又は複数の抗原分子の発現及び／又は活性に関連する疾患、障害ないし症状を治療、阻害、進行を遅延、再発を予防／遅延、寛解、又は予防するために用いることができる。

例示的な疾患には、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ系悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより具体的な癌には、扁平細胞癌(例えば上皮性扁平細胞癌)、肺癌、例えば小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞性癌、胃癌(gastric又はstomach)、例えば胃腸癌、膀胱癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、尿路癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌又は腎癌(kidney又はrenal)、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門の上皮癌、陰茎上皮癌、メラノーマ、多発性骨髄腫及びB細胞リンパ腫、脳、並びに頭頸部癌、及び関連する転移が含まれる。いくつかの実施態様では、癌は、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)及び肝細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施態様では、癌は結腸直腸癌である。

20

30

また、本発明の抗体は、疾患の病態が細胞の変性ないし機能不全を伴うものである疾患の治療(防止を含む)、例えば様々な(慢性)神経変性疾患及び急性神経細胞損傷の治療に有用である。このような神経変性疾患としては、末梢性神経障害、運動神経疾患、例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS、Lou Gehrig's病)、Bell's麻痺、及び脊髄筋萎縮又は麻痺を伴う様々な症状、及び、他のヒト神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、癲癇、多発性硬化症、ハンチントン舞蹈病、ダウン症候群、神経性難聴及びメニエール病、及び例えば外傷又は脊髄損傷による急性神経細胞損傷が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0169】

また、本発明の抗体は、血管新生を阻害するために有用である。いくつかの実施態様では、血管新生の部位は腫瘍又は癌である。

40

いくつかの実施態様では、疾患は、大腸腺腫(一又は複数)に特徴がある。本発明の方法は、複数の大腸腺腫(例えば10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000以上の大腸腺腫)に特徴がある疾患に特に適する。この疾患には少なくとも以下のものが含まれる：APC遺伝子の突然変異によって、生じる常染色体優性家族性大腸ポリープ症(FAP)(Tomlinson等、J Med Genet 1996、33:268-73)、ポイツ・ジェガース症候群(PJS)、若年性ポリープ症候群(JPS)、MYH遺伝子の突然変異による弱毒性FAP(Sieber等 N Eng J Med 348:791-9 (2003))、遺伝性混合性ポリープ症候群(HMPs)、カウデン病及びBannayan-Ruvalcaba-Riley症候群。

EphB2は、発生中の胚における軸索運動(motoaxon)誘導及び神経冠細胞の移動に関

50

係している。したがって、本発明の抗体は、インビトロ又はインビボでの軸索誘導、神経系発達及び／又は神経冠移動を調整するためにも有用である。

【0170】

ある実施態様では、一又は複数の細胞障害性剤とコンジュゲートした抗体を含んでなる免疫コンジュゲートを患者に投与する。いくつかの実施態様では、免疫コンジュゲート及び／又はそれが結合する抗原が細胞に内在化されていると、結合する標的細胞を殺す際の免疫コンジュゲートの治療効果が増す。一実施態様において、細胞障害性剤は標的細胞内の核酸を標的とするか又は妨げる。一実施態様では、細胞障害性剤は微小管重合を標的とするか又は妨げる。このような細胞障害性剤の例には、本明細書に記載の何れかの化学療法剤(例えばメイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン又はカリケアマイシン)、放射性同位元素、又はRNA分解酵素ないしDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

本発明の抗体又は免疫コンジュゲートは、単独で、または、他の組成物と組み合わせて治療に用いることができる。例えば、本発明の抗体は、他の抗体、化学療法剤(一又は複数)(化学療法剤の混合を含む)、他の細胞障害性剤(一又は複数)、抗血管形成剤(一又は複数)、サイトカインおよび／または増殖阻害性剤(一又は複数)と同時に投与してもよい。本発明の抗体が腫瘍成長を阻害する場合、腫瘍成長を阻害する一又は複数の他の治療薬と組み合わせることが特に望ましい。例えば、転移性乳癌の治療において、VEGF活性を遮断する抗VEGF抗体は抗ErbB抗体(例えばハーセプチン(登録商標)抗HER2抗体)と組み合わせてもよい。あるいは又は加えて、放射線療法(例えば、外部光線照射、又は放射性標識した抗体などの作用剤を用いた治療)を患者に併用してもよい。上記の併用治療には、併用投与(2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に包含される)及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体は補助治療(一又は複数)の前及び／又はその後投与することができる。

【0171】

本発明の抗体(及び補助治療薬)は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与する。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体を、特に抗体の用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

本発明の抗体組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与する。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、および医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するかまたは治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。一般的に、以前用いたのと同じ用量及び投与経路で、又は前回用いた用量の1~99%で用いる。

【0172】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$)の抗体が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 4.0mg

/ k g 又は 1 0 m g / k g の一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約4 m g / k g の初期負荷投与量の後、約2 m g / k g の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

【0173】

本発明の抗 E p h B 2 抗体は、特定の細胞又は組織における E p h B 2 の発現を検出するアッセイ(例えば診断アッセイ又は予後のアッセイ)に有用であり、このアッセイでは抗体は後述のように標識され、及び/又は不溶性の基質に固定される。

10

他の態様では、本発明は、試料中の E p h B 2 -抗 E p h B 2 抗体複合体を検出することを含む、E p h B 2 の検出方法を提供する。本明細書において、用いられる「検出」なる用語は、コントロールに対する参照の有無にかかわらず、定性的及び/又は定量的な検出(測定レベル)を含む。

他の態様では、本発明は、E p h B 2 の発現及び/又は活性に関連する疾患を診断するための方法であって、該疾患を有する又は有すると思われる患者からの生体試料において、E p h B 2 -抗 E p h B 2 抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、E p h B 2 発現は、発現の増加又は異常な(望ましくない)発現である。いくつかの実施態様では、疾患は、腫瘍、癌及び/又は細胞増殖性疾患である。

20

【0174】

他の態様では、本発明は、癌を有する又は有すると思われる患者の評価(予後の評価)のための方法を提供するものであって、該方法は、(a)患者から生体試料を得る、(b)生体試料中の E p h B 2 の発現を検出する、(c)生体試料中の E p h B 2 の発現をコントロール試料(コントロール基準値)の E p h B 2 の発現と比較する、そして(d) (c)の比較に基づいて患者の癌の予後を予測し、このとき、コントロール試料と比較して患者の生体試料中の E p h B 2 の発現が増加している場合に患者に癌が予測される、ことを含む。E p h B 2 発現の増加は癌の予後徴候である。2005年1月6日に出願のJubb等の米国特許出願を参照のこと。しかして、癌予後を決定することは、患者を治療するための適切な治療の選別を含め、疾患の将来の経過を評価する際に有用なデータ及び情報を得るための便利で、効率的で、潜在的に費用効率の良い手段となりうる。

30

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の何れかの抗 E p h B 2 抗体を提供するものであって、この抗 E p h B 2 抗体は検出可能な標識を含んでなる。

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の何れかの抗 E p h B 2 抗体と E p h B 2 の複合体を提供する。いくつかの実施態様では、複合体はインビボ又はインビトロである。いくつかの実施態様では、複合体は癌細胞を含んでなる。いくつかの実施態様では、抗 E p h B 2 抗体は検出可能に標識される。

【0175】

抗 E p h B 2 抗体は、多くの良く知られた診断的アッセイ法の任意の1つにおいて、E p h B 2 の検出に利用することができる。例えば、所望する起源から試料を得て、抗体が混合物に存在する任意の E p h B 2 と抗体/ E p h B 2 複合体を形成するように試料と抗 E p h B 2 抗体を混合させ、混合物に存在する任意の抗体/ E p h B 2 複合体を検出することによって、E p h B 2 に関して生物学的試料をアッセイすることができる。特定の試料に適した当該分野で知られた方法によって、アッセイのために生物学的試料を調製することができる。用いられるアッセイの型によって、抗体と試料を混合させる方法、及び抗体/ E p h B 2 複合体を検出する方法を選択する。そのようなアッセイには、免疫組織化学法、競合及びサンドイッチアッセイ、及び立体障害アッセイが含まれる。立体障害アッセイが単一反応混合液で行われるのに対して、競合アッセイ及びサンドイッチ法は不可欠な部分として相分離ステップを利用する。

40

E p h B 2 についての分析法では、すべて、1つ又はそれより多い次の試薬を用いる：

50

標識 E p h B 2 アナログ、固定化 E p h B 2 アナログ、標識抗 E p h B 2 抗体、固定化抗 E p h B 2 抗体及び立体コンジュゲート。標識試薬は、「トレーサー」としても知られている。

【 0 1 7 6 】

利用される標識は、E p h B 2 と E p h B 2 抗体の結合を妨害しない任意の検出可能な機能性である。免疫アッセイでは、多くの標識が知られており、その例には、直接に検出することができる分子、例えば蛍光色素、化学発光剤、及び放射性標識、並びに分子、酵素等の検出されるように反応又は誘導体化されるべきものが含まれる。そのような標識の例には、ラジオアイソトープ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼであり、色素前駆体、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどを酸化する過酸化水素を利用する酵素とカップリングさせたものを含む。

10

【 0 1 7 7 】

これら標識を共有的にタンパク質又はポリペプチドと結合させるために、常套的方法が利用可能である。例えば、カップリング剤、例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジン等が、上記の蛍光剤、化学発光剤、酵素標識で抗体をタグするのに利用することが可能である。例えば、米国特許第3,940,475号(フルオロメトリー)及び3,645,090号(酵素)；Hunterら，Nature，144：945(1962)；Davidら，Biochemistry，13：1014-1021(1974)；Painら，J. Immunol. Methods，40：219-230(1981)；及びNygren，J. Histochem. and Cytochem.，30：407-412(1982)を参照せよ。ここでの好ましい標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリフォスファターゼ等の酵素である。抗体への酵素を含むそのような標識のコンジュゲーションは、免疫アッセイ技術における通常の技術の1つにとって標準的な操作法である。例えば、O'Sullivanら，"Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, 編 J. J. Langone & H. Van Vunakis, 73巻(Academic Press, ニューヨーク, ニューヨーク, 1981), 147-166頁を参照せよ。

20

30

【 0 1 7 8 】

あるアッセイ法では、試薬の固定化を必要とする。固定化は、溶液で遊離に存在するあらゆる E p h B 2 から抗 E p h B 2 抗体を分離することを伴う。水不溶性基質又は表面への吸着による(Bennichら., 米国特許第3,720,760号)、共有結合による(例えば、グルタルアルデヒド架橋を利用して)、又は例えば免疫沈降による、後に抗 E p h B 2 抗体又は E p h B 2 アナログを不溶化することによるように、アッセイ法の前に抗 INF 抗体又は E p h B 2 アナログの何れかを不溶化することによって、これは常套的に完遂される。

40

試料におけるタンパク質の発現は、免疫組織化学及び染色プロトコールを用いて試験しうる。組織切片の免疫組織化学染色は、試料中のタンパク質の存在を評価ないしは検出するための確実な方法であることが示されている。免疫組織学法(「IHC」)技術は、抗体を用いて、一般的には色素生産性方法または蛍光性方法によって、インサイトで細胞性抗原を探索して視覚化する。試料の調整では、哺乳動物(典型的にはヒト患者)の組織または細胞試料を用いてもよい。試料の例として、大腸、乳房、前立腺、卵巣、肺、胃、脾臓、リンパ系および白血球などの癌細胞が含まれるが、これらに限定するものではない。前記試料は、当分野で公知の様々な手順、限定するものではないが、外科的切除、吸引または生検などによって採取することができる。組織は新鮮なものでも凍結したものでもよい。一実施態様では、前記試料は固定し、パラフィンなどに包埋する。前記組織試料は従来の

50

方法によって固定(すなわち保存)されてもよい。当分野の通常の技術者は、組織学的染色ないしは他の分析に供する試料の目的に応じて固定液を選択することは理解するところであろう。また、当分野の通常の技術者は、組織試料の大きさおよび用いる固定液に応じて固定の長さを決定することも理解するであろう。

【0179】

IHCは、形態学的染色および/または蛍光発光インサイツハイブリダイゼーションなどの付加的な技術と組み合わせて行ってもよい。IHCの直接アッセイおよび間接アッセイの2つの一般的な方法が有用である。第一のアッセイでは、標的抗原(例えばEphB2)に対する抗体の結合は、直接的に測定される。この直接アッセイは、更なる抗体相互作用を必要とせず可視化されうる酵素標識一次抗体または蛍光タグ付加一次抗体などの標識された試薬を用いる。代表的な間接アッセイでは、コンジュゲートしていない一次抗体が抗原と結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体と結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートする場合、抗原を視覚化させるために色素生産性基質ないしは蛍光発生基質が加えられる。二次抗体の中には一次抗体上の異なるエピトープと反応するものもあるので、シグナルの増幅が起こる。

一般的に、免疫組織化学に使用する一次および/または二次抗体は、検出可能な成分にて標識されるであろう。通常、以下の種類に分類できる多くの標識が利用可能である：

【0180】

上記の試料調整手順以外に、IHC前、IHCの間又はIHC後に組織切片の更なる処置が所望されてもよい。例えば、クエン酸塩バッファ中で組織サンプルを加熱するなどのエピトープ検索方法が実施されてもよい(例として、Leong等 Appl. Immunohistochem. 4(3): 201 (1996)を参照)。

場合によって行うブロック処置の後に、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原と結合するような好適な条件下と十分な時間、組織切片を一次抗体に曝露させる。これを達成するための好適な条件は慣例的な実験によって決定できる。試料に対する抗体の結合の範囲は、上記の検出可能な標識の何れか一つを用いて決定される。標識は、3,3'-ジアミノベンジジンクロモゲンなどの色素生産性基質の化学変化を触媒する酵素標識(例えばHRPO)であることが望ましい。好ましくは、酵素標識は、一次抗体(例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせる。

【0181】

このようにして調製される検査材料はマウントしてカバーガラスをかけてもよい。その後、例えば顕微鏡を使用してスライドの評価を行い、当分野で通常用いられる染色強度判定基準を用いてもよい。染色強度判定基準は以下の通りに評価してもよい：

表 2

| 染色パターン | スコア |
|-------------------------------|-----|
| 細胞内で染色が観察されない | 0 |
| 10%以上の細胞に淡い/わずかに認識できる染色が検出される | 1+ |
| 10%以上の細胞に弱～中程度の染色が検出される | 2+ |
| 10%以上の細胞に中程度～強度の染色が検出される | 3+ |

【0182】

典型的に、IHCアッセイのおよそ2+以上の染色パターンスコアは診断/予後を予測するものである。いくつかの実施態様では、およそ1+以上の染色パターンスコアは診断/予後を予測するものである。他の実施態様では、およそ3以上の染色パターンスコアは診断/予後を予測するものである。腫瘍又は大腸腺腫の細胞及び/又は組織をIHCを用いて試験する場合、一般的に、染色は(試料中に存在しうる間質性組織又は周辺組織とは

対照的に)腫瘍細胞及び/又は組織内で決定又は評価されることは理解される。

【0183】

競合アッセイ又はサンドイッチアッセイとして知られている他のアッセイ方法は十分に確立されており、市販の診断法産業において、広く使われている。

競合アッセイは、限られた数の抗E p h B 2抗体抗原結合部位について試験試料E p h B 2と競合するトレーサーE p h B 2類似体の能力に依存する。一般的に、抗E p h B 2抗体は、競合の前又は競合の後に不溶化して、次いで抗E p h B 2抗体に結合したE p h B 2とトレーサーを結合していないトレーサーとE p h B 2から分離する。この分離は、別の容器へ移す(結合パートナーが予め不溶化された場合)か、又は遠心分離する(結合パートナーが競合反応の後で沈殿した場合)ことにより達成される。マーカー物質の量で測定されるように、試験試料E p h B 2の量は結合したトレーサーの量に反比例する。E p h B 2の既知量による用量-反応曲線を作成して、試験結果と比較して試験試料に存在するE p h B 2の量を量的に決定する。検出可能なマーカーとして酵素が用いられる場合に、これらのアッセイはE L I S Aシステムと呼ばれている。

「均質な」アッセイと称される競合アッセイの他の種類は、相分離を必要としない。ここで、E p h B 2と酵素とのコンジュゲートが調製され、抗E p h B 2抗体がE p h B 2に結合する場合に抗E p h B 2抗体の存在により酵素活性が修飾されるように用いられる。この場合、E p h B 2又はその免疫学的に活性な断片は、二機能性有機架橋によって、ペルオキシダーゼなどの酵素にコンジュゲートされる。抗E p h B 2抗体の結合が標識の酵素活性を阻害するか又は強化するために、抗E p h B 2抗体により使用についてコンジュゲートを選別する。この方法自体は、E M I Tという名前で広く実施される。

【0184】

立体的コンジュゲートは、均質なアッセイの立体障害方法で用いられる。ハプテンに対する抗体は抗E p h B 2抗体と同時にコンジュゲートを結合することが実質的にできないので、これらのコンジュゲートは低分子のハプテンを小さいE p h B 2断片に共有結合することにより合成される。このアッセイ手順で、試験試料に存在するE p h B 2は抗E p h B 2抗体を結合し、それによって、抗ハプテンはコンジュゲートを結合できる。その結果、コンジュゲートハプテンの特徴の変化、例えばハプテンが蛍光体である場合の蛍光の変化が生じる。

サンドイッチアッセイは、E p h B 2又は抗E p h B 2抗体の測定のために特に有用である。一連のサンドイッチアッセイにおいて、固定された抗E p h B 2抗体を用いて、試験試料E p h B 2を吸着し、洗浄によって、試験試料を除去し、結合したE p h B 2を用いて第二の標識した抗E p h B 2抗体を吸着して、次いで結合した材料を残留するトレーサーから分離する。結合したトレーサーの量は、試験試料E p h B 2に正比例する。「同時」サンドイッチアッセイにおいて、試験試料は、標識した抗E p h B 2を加える前に分離されない。一抗体として抗E p h B 2モノクローナル抗体を、他方の抗体としてポリクローナル抗E p h B 2抗体を用いる一連のサンドイッチアッセイは、試料をE p h B 2について試験する際に有用である。

前述は、単にE p h B 2のための例示的な検出アッセイにすぎない。E p h B 2の測定のために抗E p h B 2抗体を用いる、現在の他の方法又は今後開発される方法は、本明細書に記載のバイオアッセイを含め、本願の権利内に包含される。

【0185】

製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療、予防及び/又は診断するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である

。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌のような選択した症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、(a)本発明の抗体を含有する組成物を中に収容する第一の容器；と(b)更なる細胞毒性剤を含有する組成物を中に収容する第二の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、第一及び第二の抗体組成物を癌などの特定の症状の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(B W F I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

10

【0186】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上記に示す一般的な説明により、様々な他の実施態様が実施しうることは理解される。

【実施例】

【0187】

実施例

以下の材料及び方法が実施例において用いられた。

抗体及び組換えタンパク質

西洋わさびペルオキシダーゼとコンジュゲートしたモノクローナル抗-ホスホチロシンは、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から入手した。p44/42 MAPキナーゼ、リン酸-p44/42 MAPキナーゼ、EGF及びリン酸-上皮性成長因子(EGF)に対する抗体は、Cell Signaling Technology (Beverly, MA)から購入した。エフリン-B2-Fc及び融合タンパク質エフリン-B1-Fc及びGDエピトープに対する抗体は、Genentech (South San Francisco, CA)で生産された。

20

【0188】

細胞株及びプラスミド

ヒトの大腸腺癌細胞株SW480、SW620、及びColo 205及び線維肉腫細胞株HT1080は、American Type Culture Collection (Manassas, VA)から入手した。HT1080-EphB2及びHT1080-GD細胞株は、EphB2のNH2末端GDエピトープ-タグ付加型をコードするSV40動作性ベクター又は空のベクターそれぞれと、サイトメガロウイルスプロモータ動作性ピューロマイシンベクターにて同時形質移入して生成した。細胞は、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のピューロマイシンにて選択した。SVT2-EphB2細胞株は、マウス3T3細胞にサイトメガロウイルスプロモータ動作性Neoを同時形質移入し、細胞を $400\mu\text{g}/\text{ml}$ でジェネテシン(Life Technologies, Inc.)にて選択したことを除き同じ様式で作成した。細胞は、10%ウシ胎児血清、2mM グルタミン及びペニシリン-ストレプトマイシン(100 単位/ ml)を添加した高グルコースDMEMにて生育した。

30

EphB2リガンド結合ドメインコンストラクト(ss.EphB2LBD.gD.GPI)は、COOH終末GPILinker及びNH2終末GDエピトープ標識(ss.his.gD.GPI)をコードしているベクターに、ヒトEphB2のアミノ酸19~208をコードするポリヌクレオチドをクローニングして調製した。このベクターを、293細胞に過渡的に形質移入した。細胞を、10%FBSを含有するF12 DMEM Mix(50:50)培地にて生育した。形質移入した細胞を、形質移入の48時間時間後に更に分析した。

40

【0189】

RNA発現分析

腫瘍及び正常大腸の組織試料の分析のために(図3A)、各ヒト腫瘍又は正常大腸の組織試料の全RNAのおよそ $10\mu\text{g}$ を、Affymetrix GeneChipのオリゴヌクレオチドアレイ分析に必要なプローブの調製のための開始材料として用いた。プローブは製造業者の指示に従って調製した。ハイブリダイゼーションの後、アレイを洗浄して、ストレプトアビジン-フィコエリトリンで染色して、次いでGene Arrayスキャナ(Agilent Technologies)でスキャンした。Affymetrixデータ分析ソフトウェアパッケージで提供されるデフォルトバ

50

ラメータを適応して、シグナル強度を決定して、平均的相違とした。Affymetrix Expression Analysis Technical Manualにおいて述べられるように、広域のスケーリング(global scaling)を用いて試料の正規化を行い、1500の標的強度を用いて平均的相違発現値を決定した。複数のヒト腫瘍及び正常な生検試料におけるEphB2 mRNA発現の分析のために、Gene Logic, Inc. (Gaithersburg, MD)からAffymetrixデータを得た。

示した分析に、合計4841の試料を用いた(正常試料 1808; 癌試料 1545; そして、非癌性疾患試料 1488)。また、Gene Logicデータを、広域のスケーリングを用いて正規化したが、この場合、標的強度を100とした。EphB2 mRNA発現のAffymetrixデータは、U95プローブセットID 41678_atから生成した。EphB2 mRNAのためのリアルタイムPCR (TaqMan; Perkin-Elmer, Applied Biosystems)は、遺伝子特異的なプライマー(5'-CGA-GCC-ACG-TTA-CAT-CA-3' (配列番号10)及び5'-TCA-GTA-ACG-CCG-TTC-ACA-GC-3' (配列番号11))とプローブ(5'-CCC-ACA-CCC-AGT-ACA-CCT-TCG-AGA-TCC-3' (配列番号12))を用いて行った。インサイツハイブリダイゼーションのために、458塩基対の³³P標識アンチセンスリボプローブを、オリゴヌクレオチド配列5'-TCTGTCCATCTGTCCCGTCCT-3' (配列番号13)によるプライマー及びプライマー5'-GCCCTCCTGGTGCTCTATCC-3' (配列番号14)によるセンスコントロールリボプローブを用いてEphB2 PCR産物から生成した。

【0190】

モノクローナル抗-EphB2抗体

BALB/cマウス(Charles River Laboratories, Wilmington, DE)は、Ribiaジュバント(Corixa, Hamilton, MT)にて希釈したバキュロウイルス由来のHis8タグ付加EphB2レセプターを、週2回、経足蹠にて5用量投与して免疫化した。高い血清力価を示している5匹のマウスのリンパ節からB細胞を回収して、マウス骨髄腫細胞(X63.Ag8.653; American Type Culture Collection)と融合した。10~14日後に、HT1080-GD細胞及びHT1080-EphBR細胞の直接ELISA及びフローサイトメトリによって抗体産生について上清をスクリーニングした。ポジティブのものを2度サブクローニングしてモノクローナルにした。精製した抗体の大量産生のために、ハイブリドーマ細胞を、プリスタンで初回刺激したBALB/cマウスへ腹腔内投与した。腹水液をプールして、プロテインA親和性クロマトグラフィ(Pharmacia Fast Protein Liquid Chromatography; Pharmacia, Uppsala, Sweden)にて精製した。

【0191】

2H9 Fv配列の決定

RNeasyミニキット(Qiagen, Germany)を用いてマウス抗ヒトEphB2モノクローナル抗体2H9を生産しているハイブリドーマ細胞から総RNAを抽出した。可変軽鎖(VL)ドメイン及び可変重鎖(VH)ドメインは、以下の変性プライマーによるRT-PCRを用いて増幅した:

軽鎖(LC)フォワード: 5'-GATCGATATCGTGATGACMCAGTCTCCATC-3' (配列番号15)

軽鎖リバー: 5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (配列番号16)

重鎖(HC)フォワード: 5'-GATCCGTACGCTCAGGTTCARCTSCAGCAGTCTGG-3' (配列番号17)

重鎖リバー: 5'-ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (配列番号17)

フォワードプライマーは、VL領域及びVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的なものであった。それぞれのLC及びHCリバープライマーは、定常軽鎖(CL)及び定常重鎖ドメイン1(CH1)の領域にアニールするように設定した。この領域は種全体に非常に保存されている。増幅したVLを、pRK哺乳類細胞発現ベクター(Shields等 J Biol Chem (2000) 276:659-604)にクローニングした。増幅したVHは、pRK哺乳類細胞発現ベクターに挿入した。挿入物のポリヌクレオチド配列は、常法の配列決定方法を用いて決定した。

【0192】

EphB2活性化の分析

可溶性エフリン-FcリガンドによるEphB2活性化の分析は、精製したFc-エフリンB2

10

20

30

40

50

(5 μ g / ml、15分)にてSVT2-EphB2細胞株を刺激して、以下のプロトコールを用いてEphB2自己リン酸化を検出することによって実施した。細胞は放射性免疫沈降アッセイバッファ(50 mM トリス、150 mM NaCl、1%デオキシコレート、1%NP40、2 mM パナジウム酸ナトリウム、1 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物、及び、完全なプロテイナーゼインヒビター混合物(Roche Molecular Biochemicals))に溶解した。10 μ gの抗GDMAbを溶解物に加えて、プロテインGアガロース(Life Technologies, Inc.)にて、4で終夜インキュベートした。免疫沈降物を回収して、溶解バッファにて洗浄し、SDS-PAGE及びイムノブロットングの試料とした。プロットを、1 μ g / mlの西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗ホスホチロシンマウスMAb(Santa Cruz Biotechnology)又は抗GDマウスMAbとともにインキュベートした。二次抗体としてヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて、プロットを洗浄し、高感度化学発光システム(Pierce)を用いて反応させた。MAPキナーゼ活性化の分析は、HT1080-EphB2細胞株を用いて行った。細胞を12時間無血清状態にして、無処置のままにしたものと、5 μ gのヒトFc-エフリンB2 / mlの存在下及び非存在下で100 ng / mlのEGFにて刺激したものを作製した。細胞溶解物は、タンパク質濃度を等しくして、SDS-PAGEを行い、抗ホスホ-EGFレセプター又はホスホ-MAPキナーゼ抗体にてイムノブロットした。

10

【0193】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーのために、細胞は、90%の集密度まで生育して、細胞解離バッファ(Invitrogen)を用いてプレートから取り除いた。細胞を洗浄して、蛍光活性細胞-分類バッファ(1%のBSAを含むPBS)に再懸濁して、抗EphB2 MAb 2H9又は抗GD抗体(Genentech)とともに45分間インキュベートして、フィコエリトリンにコンジュゲートした抗マウス二次抗体とともに30分インキュベートした。FACSスキャンにて分析を行った。

20

【0194】

結合親和性、ELISA及びアイソタイピング

室温で、Pharmacia BIAcore(登録商標) 3000 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden)を用いた表面プラスモン共鳴法によって、MAb 2H9の結合親和性を測定した(例としてMorton, T.A.等(1998) Methods in Enzymology 295: 268-294を参照)。抗EphB2抗体を、一次アミン基を介してセンサチップ(CM5)に固定した。0.025 M N-ヒドロキシスクシンイミド及び0.1 M N-メチル-N'(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの混合物20 μ lを5 μ l / 分で注入することによって、カルボキシメチル化したセンサチップ表面基質を活性化した。10 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5中に10 μ g / mlの抗EphB2抗体を含む溶液5~10 μ lを5 μ l / 分で注入した。カップリングの後、チップ上のカップリングしなかった部位を、20 μ lの1 M エタノールアミン(pH 8.5)を注入してブロックした。ランニングバッファは、0.05% ポリソルベート20を含有するPBSとした。動態学的な測定のために、ランニングバッファにて2倍に段階希釈したポリHisタグ付加EphB2を、フローセルに対して30 μ l / 分の流速で3分間注入し、結合したポリHisタグ付加EphB2を20分間解離させた。20 μ lの10 mM グリシン・HCl(pH 1.5)を注入することによって、結合表面を再生した。活性化されるが、固定した抗体を有さないフローセル1をコントロールセルとして用いた。フローセル1に対するポリHisタグ付加EphB2の有意な非特異的結合はなかった。見かけの結合親和性を算出するために、データを、広域フィッティング(global fitting)を用いた1:1結合モデルによって分析した。結合速度定数及び解離速度定数は、同時にフィッティングした(BIAevaluationソフトウェア)。

30

40

【0195】

以下のプロトコールによるELISAを用いて、ヒト及びマウスのEphB2ポリペプチドを結合するMAb 2H9を決定した。マイクロタイタープレート(Nunc, Roskilde, Sweden)を、1 μ g / mlのパキユロウイルス由来のHis8タグ付加EphB2レセプターを

50

含む 0.05 M 炭酸塩バッファ (pH 9.6) 100 μ l / ウェルにて、4 で終夜コートした。プレートを PBS / 0.05 % T20 にて洗浄して、PBS ウシ血清アルブミン (BSA) / T20 にてブロックした。ハイブリドーマ上清を加え (100 μ l / ウェル)、攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。洗浄工程の後、結合した抗体をやぎ抗マウス IgG (Fc 特異的) ペルオキシダーゼコンジュゲート (Sigma, St. Louis, MO; PBS / BSA / T20 バッファにて 1 : 10 K 希釈; 室温にて 1 時間インキュベート) にて検出した。プレートを TMB 基質溶液 (KPL/Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) にて反応させ、TMB 1-コンポーネント停止溶液 (KPL) にて反応を止めた。プレートは、オートメーション化したプレートリーダーを用いて、630 nm の参照値とともに、450 nm の吸光度を読取った。

10

関連した Eph レセプター EphB3 との Mab 2H9 の反応を以下の通りに試験した。EphB3 を発現する 293 細胞は、EphB3 ECD 配列、NH₂ 末端 GD タグ及び COOH 末端 GPI リンカーを含有するベクターにて過渡的に形質移入して生成した。48 時間後に、Mab 2H9 を細胞とともにインキュベートして、その後洗浄し、細胞を上記の通りに FACS 分析した。Mab 2H9 は、EphB3 との非常に低い交差結合を示した。

Mab 2H9 は、標準的な方法を用いて測定したところ、アイソタイプ IgG1 であることが明らかとなった。

【0196】

抗体結合及び内部移行、免疫組織化学

精製した Mab 2H9 は、ラクトペルオキシダーゼ方法を用いてヨード化し、放射性標識した抗体を Pharmacia PD-10 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィによって遊離した¹²⁵I-Na から精製した。基本的に既に記載されているように (Gladhaug I. P. 等, J. Biol. Chem., 263: 12199-12203, 1988)、内部移行の評価を行った。細胞をヨード化した抗体とともに氷上でインキュベートして、37 に移して 4 時間置き、その後 4 で酸 / 塩 / 尿素インキュベートして表面結合したリガンドを分離した。全体の表面結合した抗体と内部移行した抗体を、シンチレーションカウンターで測定した。また、EphB2 の内部移行を、細胞の免疫蛍光染色法によって評価した。

20

抗 EphB2 抗体によりヒトの大腸腫瘍切片の免疫組織化学的染色を、凍結組織切片に行った。結腸直腸腺癌の悪性上皮細胞を含有する切片を、5 μ g / ml の濃度の一次抗体 2H9 とともにインキュベートして、その後、ビオチン化したウマ抗マウス IgG 親和性精製抗血清とともにインキュベートした。コントロールとして、先の (adjacent) 切片を無関係な一次抗体とともにインキュベートして、ヘマトキシリンで対比染色した。

30

HT1080-EphB2 細胞を含有するスライドは、氷上で 30 分間、1 μ g / ml の 2H9 抗体とともにインキュベートして、37 の CO₂ インキュベータに移して 1 時間置いた。スライドを PBS で洗浄して、3 % パラホルムアルデヒドに固定して、ローダミンコンジュゲート抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories) にて 1 : 2000 に希釈して室温で 20 分間インキュベートした。基本的に既に記載のあるように (Holmes W. 等, Science, 256: 1205-1210, 1992)、漸増濃度の非標識の Mab 2H9 と組み合わせた固定濃度の¹²⁵I 標識 Mab 2H9 とともに、氷上で 4 時間インキュベートして、細胞表面 Mab 2H9 結合部位の数を推定した。

40

【0197】

EphB2 リガンド結合ドメインの決定及び 2H9 結合決定基のマッピング

EphB2 のリガンド結合ドメインを決定するために、過渡的形質転換の 48 時間後に、1 μ l の EphB2 リガンド (91 ng / μ l のエフリン B1-IgG) を ss.EphB2LBD.gD.GPI-293 細胞に添加して、細胞を氷上に 20 分間置いた。2 回洗浄した後、細胞を FITC コンジュゲート Fc 特異的抗ヒト IgG 抗体 (Sigma カタログ番号 F9512) とともに 30 分間氷上でインキュベートした。さらに 2 回洗浄した後、上記のように細胞を FACS 分析した。この結果から、EphB2 リガンドエフリン B1 が EphB2 アミノ酸 19-208 を結合したことを示したため、EphB2 リガンド結合ドメインを含有するとして、EphB2 アミノ酸 19-208 を定めた。結合は、コントロールベクターを発現する細胞

50

を用いると結合は観察されなかった。

E p h B 2 のアミノ酸番号 1 9 - 2 0 8 にて Mab 2H9 の反応性を決定するために、Mab 2H9 (1 μ g / m l) 又は抗 G D 抗体 (4 μ g / m l) を ss.EphB2LBD.gD.GPI-293 細胞とともにインキュベートして、洗浄した後、細胞を上記の通りに F A C S 分析した。この結果から、その G D タンパク質と E p h B 2 リガンド結合ドメインタンパク質がこれらの抗体にて検出された。これらの結果は、Mab 2H9 が E p h B 2 リガンド結合ドメインを結合することを示した。2H9 又は抗 G D 抗体結合は、コントロールベクターを発現した細胞を用いて観察されなかった。

【 0 1 9 8 】

抗EphB2 Mab 2H9免疫コンジュゲートの調製

他で記述されるように (Doronina S. O. 等 Nat. Biotechnol., 21: 778-784, 2003 ; 2004 年 11 月 5 日に出願の米国特許第 10/983,340 号)、MC-vc-PAB-MMAE による抗 E p h B 2 抗体 2 H 9 とコントロール抗インターロイキン (I L) - 8 のコンジュゲートと、MC-vc-PAB-MMAF による 2 H 9 のコンジュゲートを行った。2004 年 11 月 5 日に出願の米国特許第 10/983,340 号の後に上掲の Doronina に示されるプロトコルにて、MC-MMAE 及び MC-MMAF による 2 H 9 のコンジュゲートを行った。2004 年 10 月 8 日に出願の米国特許第 10/960,602 号に記載のように、SMCC-DM1 及び SPP-DM1 にて 2 H 9 のコンジュゲートを行った。

【 0 1 9 9 】

インビトロ腫瘍細胞死滅アッセイ

HT1080-EphB2 細胞株又はベクターコントロール細胞株を、1 . 5 \times 1 0 ³ 細胞 / ウェル (1 0 0 μ l / ウェル) で 9 6 ウェルマイクロタイプレート の 各々のウェルに加えて、5 % C O 2 の加湿空気中にて 3 7 $^{\circ}$ C で終夜インキュベートした。細胞を 1 : 3 の段階希釈を元にした様々な濃度の Mab 2H9-MC-vc-PAB-MMAE 又は Mab 抗 I L -8-MC-vc-PAB-MMAE に曝した。4 8 時間のインキュベーションの後、Cell Titer-Glo 試薬 (Promega, Madison, WI) を 1 0 0 μ l / ウェルでウェルに加え、室温で 1 0 分間インキュベートした後、蛍光シグナルを記録した。

別の実験では、基本的に上記の通りに、HT1080-EphB2 細胞を、様々な濃度の 2H9-SPP-Dm1、2H9-SMCC-DM1、2H9-MC-vc-PAB-MMAE、2H9-MC-vc-PAB-MMAF 又は抗インターロイキン-8-MC-vc-PAB-MMAE に曝し、上記の通りに 2 日後に細胞生存度を測定した。

【 0 2 0 0 】

インビボ腫瘍成長アッセイ

実験動物のケアと使用に関するガイドラインに従って、雌ヌードマウス (Charles River Laboratories, Hollister, CA) を維持した。HT1080-EphB2 細胞及び HT1080-GD 細胞を回収して、P B S に再懸濁して、6 ~ 8 週齢のマウスの左右の横腹のそれぞれに (1 \times 1 0 ⁶ 細胞 / 腹)、s . c . 注入した。腫瘍がおおよそ 1 0 0 m m ³ に達したとき、各動物に、最終用量 3 m g / k g 体重で週 1 回 i . v . で、0 . 2 m l の天然の E p h B 2 M A b 又は 2H9-MC-vc-PAB-MMAE 又は Mab 抗 IL-8-MC-vc-PAB-MMAE を腹腔内投与した。既に記載のように、長さ (l) 及び幅 (w) を計量して、容量 (V = l w ² / 2) を算出することによって腫瘍容積を決定した。

C X F 1103 腫瘍株によるアッセイを、Oncotest GmbH (Feiburg, Germany) によって実施した。米国特許第 6,271,342 を参照。Affymetrix オリゴヌクレオチドアレイ分析を、Oncotest コレクションの、CXF1103 において E p h B 2 m R N A の発現を示す腫瘍について行った。これはリアルタイム P C R 及び免疫組織化学によって確認した。CXF1103 は、ヌードマウスの連続継代によって定着されたヒト大腸腫瘍である。N M R I バックグラウンドの 1 0 匹のヌードマウスのグループに腫瘍を皮下移植して、ランダム化のために同じサイズの腫瘍を有する 3 0 匹のマウスを得た。腫瘍は平均 1 0 0 ~ 2 0 0 m g のサイズに大きくした。このとき、溶媒コントロール、コントロール抗体コンジュゲート抗 GD-MC-vc-PAB-MMAE、又は抗 E p h B 2 抗体コンジュゲート 2H9-MC-vc-PAB-MMAE による処置を i . v . 注射にて開始した。3 m g / k g 体重の抗体コンジュゲートを、7 日間の間隔を置いて 3 週間投与した。

10

20

30

40

50

【0201】

結果

実施例1：癌及び正常なヒト組織におけるEphB2 mRNA及びタンパク質発現の分析

EphB2 mRNA及びタンパク質は、癌組織において過剰発現する。オリゴヌクレオチドベースのマイクロアレイ発現分析法は、38のヒト結腸直腸腫瘍及び7の正常大腸生検試料について行った。データマイニングにより、大部分の腫瘍では、正常試料の平均発現レベルの2～6倍のEphB2の過剰発現が明らかとなった(図3A)。大腸癌における過剰発現を確認するために、リアルタイムPCR(TaqMan)を11の更なるヒト結腸直腸腫瘍について行った。その各々は患者が一致する正常大腸試料と比較した。これらのデータは、マイクロアレイデータと非常に一致していた(図3B)。4800以上のヒト生検試料のマイクロアレイデータを含むより大きなデータベースのマイニングでは、EphB2 mRNAが腸組織において主に発現しており、多くの他の組織と比較して、結腸直腸の柔組織癌(例えば線維肉腫及び他の肉腫)及び胃癌において発現が増加したことが示された。

10

20

また、EphB2 mRNA発現を、組織マイクロアレイのインサイツハイブリダイゼーションによって調べた。この方法では、EphB2タンパク質発現が検出された正常なヒト組織は大腸及び小腸のみであった。また、様々な癌由来の試料を含有する胃腸組織マイクロアレイにおいてインサイツハイブリダイゼーションを行った。ここで、18の原発性結腸腺癌のうちの12、8の肝臓への転移性腺癌のうちの6、9の原発性胃上皮癌のうちの2、及び4の食道上皮癌のうちの1に、EphB2 mRNA発現が見られた。4の膵臓腺癌のうちの4に、発現は観察されなかった。インサイツハイブリダイゼーションにより正常な結腸粘膜及び結腸直腸癌における発現の実験を図4Aに示す。

Mab 2H9は、ヒト大腸腺癌から得た組織切片と強く反応した(図4B)。EphB2タンパク質発現は、すべての正常な陰窩、及び77%の腺腫、82%の原発性癌及び64%の転移の過剰発現を含め、結腸直腸腫瘍形成のすべての段階で示されている。2005年1月6日出願中の共有の米国特許出願番号60/642,164を参照。

【0202】

実施例2：抗EphB2モノクローナル抗体2H9の調製及び特徴づけ

EphB2の細胞外配列に対する抗体は上記のように調整して、EphB2を発現する細胞のフローサイトメトリ(蛍光標示式細胞分取器)による完全長EphB2及び精製したEphB2抗原と反応するMAbを発現したいくつかのハイブリドーマをクローニングした。陽性ハイブリドーマからのMAbを精製して、内因的にEphB2を発現する結腸直腸癌細胞株及び、レセプターを過剰発現するように操作した細胞株(HT-1080EphB2、及びSVT2EphB2)に対する反応性について比較した。これらのアッセイにおいてMAb設定の2H9を十分に行った。

30

ELISA分析により、Mab 2H9がヒト及びマウスのEphB2を結合したことが示された。アイソタイプ分析により、Mab 2H9がIgG1アイソタイプを有することが示された。また、Mab 2H9結合親和性をBiaCore分析で測定した。Mab 2H9は、 $K_a(1/Ms)$ $8.28E+04$ 、 $K_d(1/s)$ $1.03E-05$ 及び $K_d(nM)$ 0.12 のヒトEphB2を結合した。Mab 2H9は、FACSベースの分析法において、関連したEphレセプターであるEphB3と非常に低い交差反応を示した。

40

【0203】

実施例3：EphB2リガンド結合を競合的に阻害することによるMab 2H9のEphB2活性化の阻害

EphB2のチロシンキナーゼ活性は、エフリンBリガンドとレセプターの結合により活性化されうる(Davis S. 等 Science, 266: 816-819, 1994)。これは、ヒトEphB2を発現するマウス3T3細胞株が精製したFc-エフリンB2融合タンパク質とともにインキュベートされた場合に観察された(図5A)。このアッセイにおいてMAb 2H9を試験した。Fc-エフリンB2によるEphB2のチロシン自己リン酸化は、細胞をMab 2H9と予めイ

50

ンキュベートした場合に阻害されるが、コントロール抗体は効果を示さなかった(図5A)。MAb 2H9がEphB2活性化を阻害するメカニズムを調べたところ、リガンド結合の競合的な阻害を伴うことが明らかとなった。これは、MAb 2H9とともに又はMAb 2H9なしでインキュベートした後にFc-エフリンB1リガンドとインキュベートした細胞にてフローサイトメトリを行うことによって決定した。この実験では、結合したFc-エフリンB1リガンドへのFITCコンジュゲート抗ヒトFc抗体の特異的な結合からポジティブな蛍光活性化細胞-分類シグナルが得られた。MAb 2H9の量を増やすと、対応してFc-エフリンB1リガンド結合が減少した(図5B)。すべてのインキュベーションを、レセプター内部移行が最小となる氷上で行ったので、取り込まれた抗体媒介性レセプターのために結合はなかった。したがって、MAb 2H9は、EphB2レセプターへのエフリンリガンドの結合を阻害した。

10

【0204】

MAb 2H9が癌細胞の分裂促進能又は腫瘍形成能に作用することができたかどうか決定するために、様々な細胞株に対するMAb 2H9の成長効果をインビトロで決定した。しかしながら、MAb 2H9は、レセプターを発現する様々な細胞株(細胞株HT-1080-EphB2及びPC3-EphB2)のインビトロでの成長に対して特異的な効果を全く示さなかった。細胞成長の阻害が期待されないが、Ephレセプターが分裂促進性であると考えられておらず、さらに、MAPキナーゼ経路の活性によって評価されるように、分裂促進のシグナル伝達を妨げることが報告されている(Kim 等, FASEB J., 16: 1126-1128, 2002; Elowe 等, Mol. Cell. Biol., 21: 7429-7441, 2001)。EGFに対して強く応答する腫瘍形成性細胞株においてこのことを確認するために、EphB2を過剰発現する線維肉腫細胞株HT1080の安定したクローン(HT1080-EphB2)を生成した。HT1080細胞株はエフリンB1転写産物を生産した。これらの細胞において、EphB2は、EGFによるMAPキナーゼ経路の活性化を阻害せず、むしろわずかに上げたように見えた。

20

【0205】

実施例4：EphB2結合後のMAb 2H9の内部移行

EphB2結合後のMAb 2H9の内部移行を調べた。HT1080-EphB2細胞を、MAb 2H9とともに氷上で30分間インキュベートして、その後37℃に移して1時間置いた後、固定して二次抗体にて染色した。実験経過中氷上に置いた細胞と比較して、37℃に移した細胞は、有意な量の内部移行した抗体を含んでいた(図6A)。¹²⁵I放射性標識した抗体とともに細胞を4℃でインキュベートすることによってMAb 2H9取り込みを調べた。細胞を37℃に移して1時間置いた後に内部移行した¹²⁵I標識MAb 2H9の量は、4℃に置いたままにした細胞のおよそ2倍であった(図6B)。EphB2への結合の際にMAb 2H9は容易に内部移行された。したがって、MAb 2H9は、抗原-抗体複合体の取り込み又は内部移行により癌細胞内部で薬剤の放出が優先的に生じる免疫コンジュゲート治療法に適する。

30

【0206】

実施例5：EphB2リガンド結合ドメインへのMAb 2H9結合

エフリンB1-IgGとともにss.EphB2LBD.gD.GPI-293細胞をインキュベートして、その細胞をFACS分析することによって、EphB2リガンド結合ドメインを定めた。この結果から、EphB2リガンドであるEphB1がEphB2アミノ酸19-208を結合したので、EphB2リガンド結合ドメインを含有するEphB2アミノ酸19-208を定めた(図11)。コントロールベクターを発現する細胞を用いると結合は観察されなかった。

40

EphB2リガンド結合ドメインに対するMAb 2H9結合は、ss.EphB2LBD.gD.GPI-293細胞とともにMAb 2H9又は抗GD抗体をインキュベートして、その細胞をFACS分析することによって調べた。この結果から、GDタンパク質及びEphB2リガンド結合ドメインがこれらの抗体によって検出されたことが示された。これはMAb 2H9がEphB2リガンド結合ドメインを結合したことを示唆する。コントロールベクターを発現する細胞を用いると2H9又は抗GD抗体の結合は観察されなかった。

【0207】

50

実施例 6 : インビトロで効果的に腫瘍細胞を死滅するMab 2H9免疫コンジュゲート

Mab 2H9は、カテプシン B により切断されやすいリンカーMC-vc-PABを介して薬剤MMAEに共有結合していた(Weiner L. M. Semin. Oncol., 26: 43-51, 1999)。カテプシン B による切断では、活性なMMAEが放出され、細胞のチューブリン重合の動態力学を崩壊させる。2H9-MC-vc-PAB抗体薬剤コンジュゲート(免疫コンジュゲート)を、HT1080癌細胞を漸増濃度の抗体にて処理することによって、インビトロで試験した。ベクターコントロールHT1080細胞株(HT1080-GD)とEphB2を過剰発現するクローン誘導体(HT1080-EphB2)の両方は、コントロール抗体コンジュゲート抗IL-8-MC-vc-PABと比較して、有意に低い濃度の2H9-MC-vc-PAB-MMAEにより死滅した(図7)。10mg/mlの濃度以下の非誘導体化Mab 2H9では効果は見られなかった。最大半量の細胞死滅(IC50)に必要な抗体濃度は、癌細胞HT1080-EphB2では0.006μg/mlであった。

10

【0208】

細胞の死滅をレセプターコピー数と関連づけるために、HT1080-GD及びHT1080-EphB2細胞株にてMab 2H9を用いて定量的結合アッセイを行った。スキャッチャード分析によって、これら2つの細胞株のそれぞれについておよそ71,000及び308,000コピー/細胞が推定された(図8A)。両方の細胞株では、Mab 2H9の見かけの解離定数はおよそ4nMであった。また、EphB2コピー数の相違は、Mab 2H9を用いて2つの細胞株のフローサイトメトリを行った場合に観察される相対的な蛍光強度から明らかであった(図8B)。また、MC-vc-PAB-MMAEとMab 2H9とのコンジュゲートは、HT1080細胞への結合性質に認められるほどに作用しなかった。2つのHT1080細胞株のレセプターコピー数の相対的な相違は、2H9-MC-vc-PAB-MMAEの結合からやはり明らかであった(図8C)。これらの結果から、標的コピー数が薬剤コンジュゲート抗体の有効性を決定する際の重要な因子であることが示された。EphB2の場合、コピー数の中程度の相違により、インビトロで決定されるIC50値に非常に大きな相違が生じた。

20

異なる実験において、基本的には上記の通りに、HT1080-EphB2細胞を様々な濃度の2H9-SPP-Dm1、2H9-SMCC-DM1、2H9-MC-vc-PAB-MMAE、2H9-MC-vc-PAB-MMAF又は抗インターロイキン-8-MC-vc-PAB-MMAEに曝し、上記のように2日後に細胞生存度を測定した。HT1080-EphB2細胞は、コントロール抗体コンジュゲート抗IL-8-MC-vc-PAB-MMAEと比較して、有意に低い濃度の2H9-MC-vc-PAB-MMAE、2H9-SMCC-DM1及び2H9-SPP-DM1により死滅した(図9A)。HT1080-EphB2細胞は、2H9-MC-vc-PAB、2H9-MC-vc-PAB-MMAF、2H9-SPP-DM1及び2H9-SMCC-DM1により死滅した(図9B)。

30

【0209】

実施例 7 : インビボで腫瘍細胞を効果的に死滅するMab 2H9抗体薬剤コンジュゲート
2H9-MC-vc-PAB-MMAEは、ヒト腫瘍異種移植片を有するヌードマウスに投与することによって、インビボ有効性について試験した。腫瘍は、マウスの一方の脇腹にHT1080-GD細胞をそして、逆側の脇腹にHT1080-EphB2細胞を接種することによって、定着させた。腫瘍は、100~200mm³のサイズにまで大きくして、週に1回、3mg/kg用量の2H9-MC-vc-PAB-MMAEをi.v.投与した。更なる動物を、溶媒コントロール又は、3mg/kgのコントロール抗体抗IL-8-MC-vc-PAB-MMAEにて処理した。この実験では、HT1080-EphB2細胞株は、コントロール条件下において、HT1080-GDベクターコントロール細胞株より急速に成長した。これは、HT1080-EphB2クローンの以前の試験では腫瘍成長速度に対して再現性のある効果を示さなかったもので、EphB2の過剰発現によるものであるとは考えられない。にもかかわらず、両方のタイプの腫瘍は、溶媒コントロール及びコントロール抗体コンジュゲート抗IL-8-MC-vc-PAB-MMAEと比較して、2H9-MC-vc-PAB-MMAEによる治療に十分に応答した(図10A)。コントロール動物グループは、それらの腫瘍の悪性の成長のために、7~14日の間で死に至った。2H9-MC-vc-PAB-MMAEで処置した動物は、処置を中止する4週まで維持した。対照的に、裸のMab 2H9抗体は、週2回、10mg/kg体重の用量のMab 2H9を与えられたヌードマウスにおいて、腫瘍異種移植片としてHT1080-EphB2細胞株を成長させて試験した。しかしながら、このアッセイでは、裸のMab 2H9による処置により腫瘍成長の速度に有意な効果が全く得られなかった。

40

50

インビボ有効性の更なる試験として、ヌードマウスの連続継代により定着されたヒト大腸腫瘍を皮下に移植して、上記のHT1080モデルについて記載されたのと同じように治療経過中その成長を測定した。溶媒コントロール又はコントロール抗体抗GD-MC-vc-PAB-MMAEと比較して、2H9-MC-vc-PAB-MMAEによって、有意な成長遅延が再び観察された(図10B)。全体として、これらの結果から、インビボ腫瘍成長モデルの2H9-MC-vc-PAB-MMAEの特異性及び有効性が示された。

【0210】

以下のハイブリドーマをアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA (ATCC)に寄託した:

| 細胞株 | ATCC受託番号 | 受託日 |
|------------------|----------|------------|
| ハイブリドーマ2H9.11.14 | PTA-6606 | 2005年2月24日 |

10

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。これらの細胞株はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、関連の米国特許の発行及び任意の米国又は外国特許出願の公開のうち、いずれか早く行なわれた方の時点で、これらの細胞株を永久且つ非制限的に入手可能とすることを保証し、35USC122条及びそれに従う特許商標庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者に細胞株を入手可能とすることを保証するものである。

20

本出願の譲受人は、寄託した細胞株が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託された細胞株の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【0211】

前述の発明は、理解の明確性の目的のために図及び実施例によりある程度詳細に記載しているが、この記載や実施例が本発明の権利範囲を制限するものと解されるものではない。

【図面の簡単な説明】

30

【0212】

【図1】モノクローナル抗体2H9重鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。アミノ酸は、カバットに従って番号をつける。

【図2】モノクローナル抗体2H9軽鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。アミノ酸は、カバットに従って番号をつける。

【図3】EphB2 mRNAは、正常なヒト組織に対してヒト癌組織において、過剰発現する。A、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析は、38のヒト結腸直腸腫瘍と7のヒト結腸粘膜の検査材料から抽出されたRNAにて行った。平均的相違は、シグナル強度(1500まで測定)を意味する。B、リアルタイムPCRは、11のヒト結腸直腸癌生検材料と対応する患者が一致した正常な大腸組織検査材料から抽出されたRNAにて行った。

40

【図4】癌及び正常なヒト大腸組織のEphB2発現。A、インサイツハイブリダイゼーション。EphB2転写は暗視野画像において、堆積した銀色の粒として検出され、対応する明視野画像はH&Eで切片を着色することによって生成する。上部パネル及び下部パネルはそれぞれ、大腸腫瘍及び正常大腸組織のものである。B、EphB2タンパク質発現は免疫組織化学を用いて検出した。ヒト腺癌の冷凍連続組織切片を、抗EphB2モノクローナル抗体2H9(右パネル)、又は、コントロール抗体(左パネル)にて着色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

【図5】モノクローナル抗体(MAb)2H9は、エフリン-EphB2相互作用を中和する。A、SVT2-EphB2細胞株を精製したFc-エフリンB2融合タンパク質とともにインキュベ

50

ートして、NH₂末端に融合したGDエピトープタグを介する免疫沈降法(IP)によって、細胞溶解物からEphB2タンパク質を回収した。ウェスタンブロッティング(WB)は、抗ホスホチロシン(P-Tyr、上部パネル)により行い、ホスホチロシン及び抗GD(下部パネル)を検出して、総EphB2タンパク質を検出した。リガンドインキュベーションの間、MAb 2H9又はコントロール抗体(EGVEGF MAb)を培養液に含めた。B、EphB2を過剰発現するHT1080細胞に対する精製されたヒトFc-EphrinB1融合タンパク質の結合は、FITCにコンジュゲートしたヒト抗Fcを用いたフローサイトメトリによって、評価した。次いで、相対的な蛍光強度をMAb 2H9の濃度を増加しながら測定した。コントロールとして、MAb 2H9又は二次抗体の存在下及び非存在下において、Fc-エフリンB1を除いた。

【図6】抗EphB2モノクローナル抗体(MAb)2H9の内部移行。A、MAb 2H9は、EphB2を過剰発現するHT1080細胞とともに氷上でインキュベートした。細胞は、氷上に置いたままにするか、37℃に移して1時間置いた後に固定して二次抗体で染色した。B、MAb 2H9は125Iにて標識して、氷上でHT1080-EphB2細胞とともにインキュベートした。細胞は氷上(4℃)に置いたままにするか、37℃に移して1時間置いた後に、内部移行した125Iのパーセンテージをシンチレーションカウンターにて測定した。

【図7】免疫コンジュゲート2H9-MC-パリン-シトルリン(vc)-PAB-モノメチルアウリスタチンE(MMAE)によりインビトロで腫瘍細胞が死滅する。安定してEphB2を過剰発現するHT1080細胞株(HT1080-EphB2)又はベクターコントロールのHT1080細胞株(HT1080-GD)を、裸の(すなわち抱合していない)モノクローナル抗体2H9、免疫コンジュゲート2H9-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「MMAE-vc-2H9」と省略)、又は免疫コンジュゲート抗インターロイキン-8-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「MMAE-vc-anti-IL8」と省略)の濃度を上げながら処理して、2日後に細胞生存度を測定した。最大半量の死滅が達成されるために必要とされる抗体濃度をIC₅₀と表す。

【図8】HT1080細胞株及び免疫コンジュゲート2H9-MC-vc-PAB-MMAEの特徴づけ。A、HT1080-EphB2細胞株及びHT1080-GD細胞株のモノクローナル抗体2H9結合アッセイを行った。総結合部位の推定数と解離定数(K_d)をスキャッチャード分析で測定した。B、MAb 2H9を用いてHT1080-EphB2細胞株とHT1080-GD細胞株のフローサイトメトリを行った。相対的な蛍光強度を、MAb 2H9と二次抗体のみ(コントロール)について棒グラフに示す。C、裸のMAb 2H9(この図では「2H9」と省略)及び免疫コンジュゲート2H9-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「2H9-vc-MMAE」と省略)を用いてHT1080-EphB2細胞株及びHT1080-GD細胞株の飽和結合を行った。西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて相対的な結合を決定して、450nmの吸光度を測った。

【図9】免疫コンジュゲート2H9-SPP-Dm1、2H9-SMCC-DM1、2H9-MC-vc-PAB-MMAE、及び2H9-MC-vc-PAB-MMAFによりインビトロで腫瘍細胞が死滅される。安定してEphB2を過剰発現するHT1080細胞株(HT1080-EphB2)を、2H9-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「vc-MMAE」と省略)、2H9-SMCC-DM1(この図では「SMCC-DM1」と省略)、2H9-SPP-DM1(この図では「Spp-DM1」と省略)、又は抗インターロイキン-8-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「IL8MMAE」と省略)の濃度を上げながら処理して、2日後に細胞生存度を測定した。B、安定してEphB2を過剰発現するHT1080細胞株(HT1080-EphB2)を、2H9-MC-vc-PAB-MMAE(この図では「vc-MMAE」と省略)、2H9-MC-vc-PAB-MMAF(この図では「vc-MMAF」と省略)、2H9-SMCC-DM1(この図では「SMCC-DM1」と省略)、又は2H9-SPP-DM1(この図では「Spp-DM1」と省略)の濃度を上げながら処理して、2日後に細胞生存度を測定した。

【図10】2H9-MC-vc-PAB-MMAEはインビボでヒト腫瘍の成長を特異的に阻害する。A、ヌードマウスの片方の側腹にHT1080-GD細胞を、そして他方の側腹にHT1080-EphB2を皮下注射し、結果として生じる腫瘍異種移植片を各々平均150mm³のサイズにまで大きくした。各グループの10匹の動物に、溶媒コントロール()を投与するか、免疫コンジュゲート2H9-MC-vc-PAB-MMAE() (この図では「MMAE-vc-2H9」と省略)ないし免疫コンジュゲート抗インターロイキン8-MC-vc-PAB-MMAE() (この図では「MMAE-vc-抗-IL-8」と省略)の何れかを週に1回、3mg/kg体重投与した。B、CXF1103ヒト大腸腫瘍は、HT1080モデルについて記載したのと同じ処置プロトコルを行ったヌードマウスにおいて、異種

10

20

30

40

50

移植片として大きくなった。コントロール抗体は、MC-vc-PAB-MMAE(この図では「MMAE-vc-GD」と省略)にコンジュゲートした抗GDであった。SEとともに平均腫瘍容積を示す。

【図 1 1】 E p h B 2 (配列番号9) のリガンド結合ドメインのアミノ酸配列を表す。

【 図 1 】

(配列番号 :8)

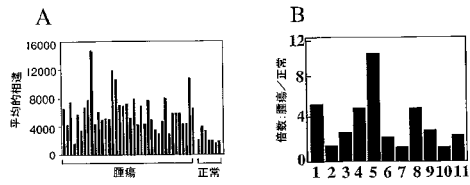
[illegible]

【圖 2】

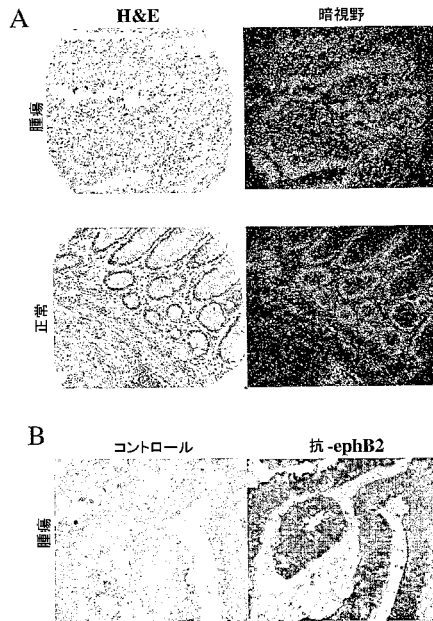
(配列番号:7)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 102

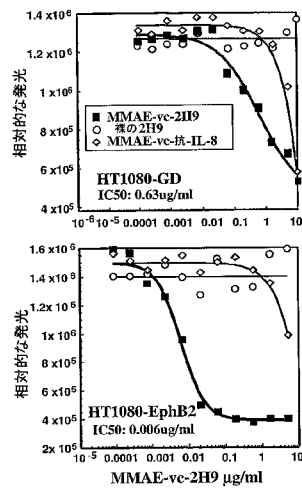
【図3】



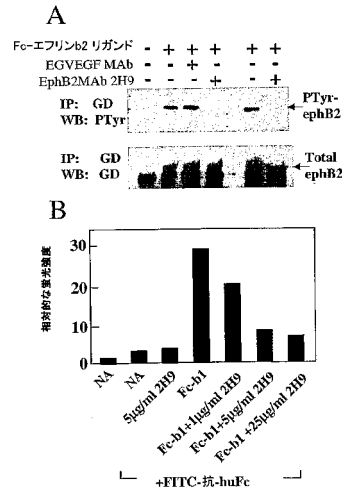
【図4】



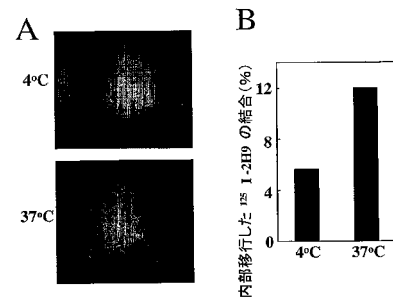
【図7】



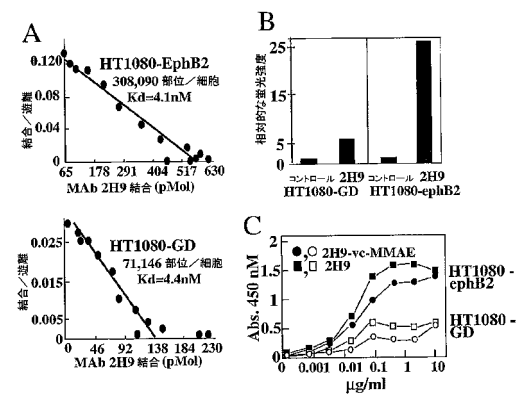
【図5】



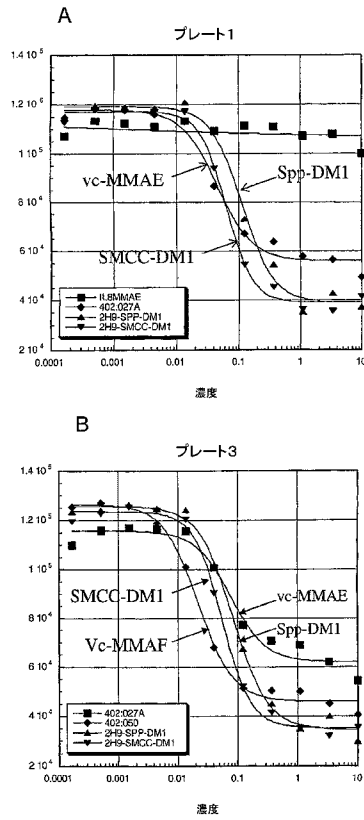
【図6】



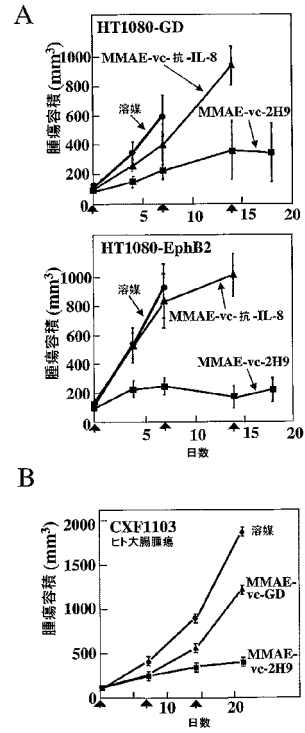
【図8】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

EphB2 リガンド結合ドメイン (配列番号:9)

```

VEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRT
YQVCNVFESSQNNWLRTKFIRRRGAHRIHVEMKFSVRDCS
SIPSVPGSCKETFNLYYEADFDSATKTFPNWMENPWVKV
DTIAADESFSQVDLGGFVMKINTEVRSFGPVSRSGFYLAQ
DYGGCMSLIAVRVYFKCPRIQ

```

【配列表】

2008537673000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/003502

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/003502

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The application provides anti-EphB2 antibodies, immunoconjugates, and compositions comprising and methods of using these antibodies and immunoconjugates.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/003502

| | | | | |
|--|--|--|-----------|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | |
| INV. C07K16/28 | C07K16/30 | C12N15/13 | C12N15/85 | A61K47/48 |
| C12N5/10 | C12N1/21 | A61K39/395 | A61P35/00 | G01N33/577 |
| G01N33/574 | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P C12N A61K G01N | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | | | Relevant to claim No. |
| X | <p>MAO WEIGUANG ET AL: "EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 64, no. 3, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 781-788, XP002343724 ISSN: 0008-5472 page 782, left-hand column, paragraph 2 page 783, left-hand column, paragraph 1-3 page 784, left-hand column, paragraph 2 page 785, left-hand column, lines 19-21 page 786, right-hand column, paragraph 2 page 786, left-hand column, paragraph 2 page 787, left-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-/-</p> | | | 1-42 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | |
| * Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family | | | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report | | |
| 4 July 2006 | | 22/08/2006 | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Siaterli, M-Z | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2006/003502

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>NAKADA MITSUTOSHI ET AL: "The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells."</p> <p>CANCER RESEARCH. 1 MAY 2004, vol. 64, no. 9, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 3179-3185, XP002382537</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>page 959, right-hand column, paragraph 5</p> <p>page 963, right-hand column, paragraph 3</p> | 36-39 |
| X | <p>HANDRA-LUCA ADRIANA ET AL: "Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation."</p> <p>THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. SEP 2003, vol. 163, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 957-967, XP002382538</p> <p>ISSN: 0002-9440</p> <p>page 958, right-hand column, paragraph 3</p> <p>page 959, right-hand column, paragraph 5</p> <p>page 965, right-hand column, paragraph 3 -</p> <p>page 966, left-hand column, paragraph 2</p> | 36-39 |
| P,X | <p>GUO DONG LI ET AL: "Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours."</p> <p>CARCINOGENESIS. MAR 2006, vol. 27, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 454-464, XP002382564</p> <p>ISSN: 0143-3334</p> <p>page 463, left-hand column, last paragraph</p> <p>page 455, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1</p> | 36-39 |
| P,X | <p>JUBB ADRIAN M ET AL: "EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer."</p> <p>CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. 15 JUL 2005, vol. 11, no. 14, 15 July 2005 (2005-07-15), pages 5181-5187, XP002382565</p> <p>ISSN: 1078-0432</p> <p>abstract</p> <p>page 5182, right-hand column, paragraph 2</p> <p>- page 5183, left-hand column, paragraph 1</p> <p>page 5186, right-hand column, paragraph 2</p> <p>page 5187, right-hand column, last paragraph</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p> | 36-39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/003502

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | WO 2005/101017 A (KADKHODAYAN, MIRYAM; MANN, EMILY; GENENTECH, INC) 27 October 2005 (2005-10-27) figures 25,26; table 1 ----- | 1-35, 40-42 |
| X | WO 2004/044218 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA; CELL SIGNALING TECHNOLOGY) 27 May 2004 (2004-05-27) page 46, lines 5-7; claims 10,20 ----- | 36-39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/003502

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 31-35 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2006/003502 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|--|
| WO 2005101017 | A | 27-10-2005 | NONE |
| WO 2004044218 | A | 27-05-2004 | AU 2003291736 A1 03-06-2004 CA 2504042 A1 27-05-2004 DE 03768629 T1 26-01-2006 EP 1567860 A2 31-08-2005 ES 2245619 T1 16-01-2006 JP 2006505793 T 16-02-2006 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|--|----------------|---------------|
| C 0 7 K 16/42 (2006.01) | | C 0 7 K 16/42 | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | | C 0 7 K 16/46 | |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | | C 1 2 P 21/02 | C |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | | A 6 1 K 39/395 | D |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | | A 6 1 K 39/395 | N |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | | A 6 1 P 35/00 | |
| G 0 1 N 33/577 (2006.01) | | A 6 1 K 39/395 | Y |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | | G 0 1 N 33/574 | A |
| | | G 0 1 N 33/577 | B |
| | | C 1 2 P 21/08 | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ボラキス , ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリンゲーム , コルテス アヴェニュー 1 4 4 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA01
HA01 HA11
4B064 AG26 AG27 CA20 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB02 AB04 AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 AA21 CC21
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA50 CA40 DA50 DA75 DA76
EA20 FA74