

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5988436号
(P5988436)

(45) 発行日 平成28年9月7日 (2016.9.7)

(24) 登録日 平成28年8月19日 (2016.8.19)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
請求項の数 28 (全 111 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2012-554083 (P2012-554083)	(73) 特許権者 509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ ス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日 平成23年2月22日 (2011.2.22)	
(65) 公表番号 特表2013-520174 (P2013-520174A)	(74) 代理人 110002077 園田・小林特許業務法人
(43) 公表日 平成25年6月6日 (2013.6.6)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2011/025642	(72) 発明者 ポラキス, ポール 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, シー/オ ー ジェネンテック, インコーポレイテ ッド
(87) 国際公開番号 W02011/106297	
(87) 国際公開日 平成23年9月1日 (2011.9.1)	
審査請求日 平成26年2月24日 (2014.2.24)	
(31) 優先権主張番号 61/308,791	
(32) 優先日 平成22年2月26日 (2010.2.26)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 61/307,338	
(32) 優先日 平成22年2月23日 (2010.2.23)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
前置審査	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の診断と治療のための組成物と方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号：7 の C D R－L 1 配列と、
(b) 配列番号：8 の C D R－L 2 配列と、
(c) 配列番号：9 の C D R－L 3 配列と、
(d) 配列番号：10 の C D R－H 1 配列と、
(e) 配列番号：11 の C D R－H 2 配列と、
(f) 配列番号：12 の C D R－H 3 配列と

を含む、配列番号：2 の T A T 4 1 9 ポリペプチドと結合する単離された抗体。

【請求項 2】

抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

キメラ又はヒト化の抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

毒素、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素からなる群から選択される細胞障害性剤にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

細胞障害性剤が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される毒素である、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

アウリスタチンがモノメチルアウリスタチン E (MMA E) である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

MC-v a l - c i t - P A B - M M A E に結合した、請求項 1 ないし 3 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

細菌又は C H O 細胞内で産生される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

結合する細胞の死を誘導する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

結合する細胞の増殖を抑制する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記細胞がヒトメラノーマ癌細胞又は多発性骨髄腫癌細胞である、請求項 9 又は 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号：14 の重鎖配列と配列番号：13 の軽鎖配列とを含む単離された抗体。

【請求項 13】

配列番号：15 の V L 配列と配列番号：16 の V H 配列とを含む単離された抗体。

【請求項 14】

配列番号：15 の V L 配列と配列番号：17 の V H 配列とを含む単離された抗体。

【請求項 15】

MC-v a l - c i t - P A B - M M A E に結合した、請求項 12 ないし 14 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の抗体を産生する細胞。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 18】

配列番号：2 の T A T 4 1 9 ポリペプチド又はその細胞外ドメインを過剰発現する細胞の増殖を抑制するための薬剤であって、請求項 1、7 又は 15 に記載の抗体を含む薬剤。

【請求項 19】

配列番号：2 の T A T 4 1 9 ポリペプチド又はその細胞外ドメインを過剰発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物の治療に使用するための薬学的組成物であって、請求項 1 ないし 18 の何れか一項に記載の抗体を含む、組成物。

【請求項 20】

前記細胞がヒトメラノーマ癌細胞又は多発性骨髄腫癌細胞である、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

配列番号：2 のアミノ酸配列を含む T A T 4 1 9 タンパク質又はその細胞外ドメインを含むことが予測される試料において T A T 4 1 9 タンパク質の存在を決定する方法であって、請求項 1 ～ 3、8、12 ～ 14 の何れか一項に記載の抗体に該試料を曝すことと、該試料における該抗体の該タンパク質への結合を決定することを含み、このとき抗体の該タンパク質への結合が、該試料における該タンパク質の存在を示す、方法。

【請求項 22】

前記抗体が検出可能に標識されている、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

哺乳動物における癌の存在を検出する方法であって、該哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び、同じ組織起源の既知の正常細胞のコントロール試料において配列番号：2 の T A T 4 1 9 ポリペプチド又はその細胞外ドメインをコードする遺伝子の発現レベルを決定することを含み、このとき、コントロール試料と比較して、試験試料での T A T

10

20

30

40

50

4 1 9 ポリペプチドの発現レベルが高いことが、試験試料の得られた哺乳動物での癌の存在を示し、

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定する工程が、免疫組織化学法又はウェスタンブロット分析に請求項 1 ～ 3、8、1 2 ～ 1 4 の何れか一項に記載の抗体を用いることを含む、方法。

【請求項 2 4】

哺乳動物における癌の存在を診断するためのキットであって、該哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び、同じ組織起源の既知の正常細胞のコントロール試料において配列番号：2 の T A T 4 1 9 ポリペプチド又はその細胞外ドメインをコードする遺伝子の発現レベルを決定するための手段を含み、このとき、コントロール試料と比較して、試験試料での T A T 4 1 9 ポリペプチドの発現レベルが高いことが、試験試料の得られた哺乳動物での癌の存在を示し、

10

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定するための手段が、免疫組織化学法又はウェスタンブロット分析のための請求項 1 ～ 3、8、1 2 ～ 1 4 の何れか一項に記載の抗体を含む、キット。

【請求項 2 5】

哺乳動物における癌の存在を検出する方法であって、請求項 1 ～ 3、8、1 2 ～ 1 4 の何れか一項に記載の抗体を哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料に接触させることと、試験試料における該抗体と配列番号：2 のアミノ酸配列を含む T A T 4 1 9 タンパク質又はその細胞外ドメインとの複合体の形成を検出することとを含み、このとき複合体の形成が該哺乳動物での癌の存在を示す、方法。

20

【請求項 2 6】

前記癌がヒトメラノーマ癌又は多発性骨髄腫である、請求項 2 1 又は 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

哺乳動物における癌の存在を診断するためのキットであって、請求項 1 ～ 3、8、1 2 ～ 1 4 の何れか一項に記載の抗体を含み、哺乳動物から得た組織細胞の試験試料における該抗体と配列番号：2 のアミノ酸配列を含む T A T 4 1 9 タンパク質又はその細胞外ドメインとの複合体の形成が該哺乳動物での癌の存在を示す、キット。

30

【請求項 2 8】

前記癌がヒトメラノーマ癌又は多発性骨髄腫である、請求項 2 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 0 年 2 月 2 3 日に出願された米国特許仮出願番号第 6 1 / 3 0 7 3 3 8 号及び 2 0 1 0 年 2 月 2 6 日に出願された米国特許仮出願番号第 6 1 / 3 0 8 7 9 1 号の優先権を主張し、これら出願は出典明記によって本明細書中に全体が援用される。

【0 0 0 2】

40

発明の分野

本発明は、哺乳動物における腫瘍の診断と治療に有用な物質の組成物と、同用途のために該物質の組成物を使用する方法に関する。

【0 0 0 3】

発明の背景

悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第 2 の主要な死亡原因である（Boring 等，CA Cancel J. Clin. 43:7(1993)）。癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍塊を形成する異常な又は腫瘍形成性の細胞の数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節や遠くの部位に転移と呼ばれる過程を介して広がる悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞

50

が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。

癌の診断及び治療に効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、一又は複数の特定の型の癌細胞の表面に特に発現する膜貫通又はさもなければ膜結合型のポリペプチドの同定を探索してきた。しばしば、このような膜結合ポリペプチドは非癌性細胞の表面と比べて癌細胞の表面により豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介する癌細胞を標的として特異的に破壊する能力を生み出す。この点、抗体ベースの治療が、ある種の癌の治療において非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）（双方共にジェネンテック社、サウス サンフランシスコ、カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター 2（HER2）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 DNA 誘導ヒト化モノクローナル抗体である。HER2 タンパク質の過剰発現は、25-30% の原発性乳癌に観察される。リツキサン（登録商標）は、正常及び悪性 B リンパ球の表面に見出される CD20 抗原に対する遺伝子操作キメラマウス／ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方共、CHO 細胞中で組換え操作によって産生される。

哺乳動物の癌治療は上記のような進歩を見ているが、それぞれ哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性の細胞成長を有効に抑制するためのさらなる診断薬及び治療薬に対する需要は依然大きい。従って、本発明の目的は、正常細胞又は他の癌細胞と比較して、1 以上の種類の癌細胞に大量に発現する細胞膜随伴ポリペプチドを同定すること、及び、それらポリペプチドとそれらがコードする核酸を使用して哺乳動物の癌の治療的処置及び診断的検出に有用な組成物を生成することである。

【0004】

発明の概要

本明細書において、本出願人は、正常な非癌細胞の一又は複数の型の表面より、癌細胞の一又は複数の型の表面で多く発現される細胞性ポリペプチド（及びそれらのコード核酸又はその断片）の同定を最初に記載する。このようなポリペプチドは、本明細書で腫瘍関連抗原性標的（Tumor-associated Antigenic Target）ポリペプチド（「TAT」ポリペプチド）と呼ばれ、哺乳動物における癌治療及び診断の効果的な標的となることが予想される。

従って、本発明の一実施態様では、本発明は、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド又はその断片（「TAT」ポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。

【0005】

ある態様では、単離された核酸分子は、（a）ここで開示されるアミノ酸配列を有する完全長 TAT ポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠く TAT ポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通 TAT ポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを含む又は含まないもの、又はここに開示される完全長 TAT ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードする DNA 分子、又は（b）（a）の DNA 分子の相補鎖に対して、少なくとも約 80% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

他の態様では、単離された核酸分子は、（a）ここで開示される完全長 TAT ポリペプチド cDNA のコード化配列、ここで開示されるシグナルペプチドを欠く TAT ポリペプチドのコード化配列、ここに開示される膜貫通 TAT ポリペプチドの細胞外ドメインのシグナルペプチドを含む又は含まないコード化配列、又はここに開示される完全長 TAT ポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片のコード化配列、又は（b）

(a) のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0006】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかである、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列と相補的であるTATポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここで開示されている。従って、ここに記載のTATポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0007】

他の態様では、本発明は、(a) ここで開示される完全長アミノ酸配列を有するTATポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くTATポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通TATポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを伴う又は伴わないもの、又はここで開示される完全長TATポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は(b) (a) のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば、診断用プローブ、PCRプライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得る、ここに開示される、完全長TATポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖、又は抗TATポリペプチド抗体に対する結合部位を含むポリペプチドを任意にコードし得る完全長TATポリペプチドのコード化断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約5のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。更に、このような核酸断片は、通常、TATポリペプチド又はその相補鎖の完全長コード化配列から得られる連続するヌクレオチドからなる。TATポリペプチド又はその相補鎖のコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してTATポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのTATポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片、又はその相補鎖が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうるということが知られている。そのようなTATポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片の全て、又はその相補鎖がここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるTATポリペプチド断片、好ましくは抗TAT抗体に対する結合部位を含んでなるTATポリペプチド断片である。

【0008】

他の実施態様では、本発明は上記において特定した単離された核酸配列の何れかにより

10

20

30

40

50

コードされる単離されたT A Tポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有するT A Tポリペプチド、ここに開示されるシグナルペプチドを欠くT A Tポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示されるシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通T A Tポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示される核酸配列の任意のもの、又はここに開示される完全長T A Tポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたT A Tポリペプチドに関する。

10

【0009】

また別の態様では、本発明は単離されたT A Tポリペプチドに関し、本単離されたT A Tポリペプチドは、(a) 本明細書に開示される完全長アミノ酸配列を有するT A Tポリペプチド、(b) 本明細書に開示されるシグナルペプチドを欠くT A Tポリペプチドアミノ酸配列、(c) シグナルペプチドを有するか又は欠く、本明細書に開示される膜貫通T A Tポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、(d) 本明細書に開示される核酸配列のいずれかによってコードされるアミノ酸配列、又は(e) 本明細書に開示される完全長T A Tポリペプチドアミノ酸配列の、特に規定された他のいずれかの断片、をコードするDNA分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。

20

【0010】

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離されたT A Tポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、T A Tポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含有するベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からT A Tポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失したか又は膜貫通ドメインが不活性化している単離されたT A Tポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、T A Tポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からT A Tポリペプチドを回収することを含む。

30

【0011】

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているポリペプチドの何れかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに開示されているポリペプチドの何れかの製造方法がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することを含んでなる。

40

他の実施態様では、本発明は、異種(非-T A T)ポリペプチドに融合した、ここに開示のT A Tポリペプチドの何れかを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのFc領域等の異種ポリペプチドと融合したここに開示のT A Tポリペプチドの何れかを含む。

【0012】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの何れかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体又は抗T A Tポリペプチド抗体がその各抗原性エピトープと結合するのを競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害性剤又は細胞障害

50

性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の抗体は、場合によってはC H O細胞又は細菌細胞で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の成長又は増殖を阻害するか、又は死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明の抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりする。

本発明の他の実施態様では、本発明はここで開示されている抗体の何れかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、この宿主細胞はC H O細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されている抗体の製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

より更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わせられて、ここに記載のT A Tポリペプチド、ここに記載のキメラT A Tポリペプチド、又はここに記載の抗T A T抗体を含む組成物に関する。場合によっては、この担体は薬学的に受容可能な担体である。

【0013】

更に他の実施態様では、本発明は、容器及び容器内に収容された組成物を含む製造品に関し、その組成物には、ここに記載のT A Tポリペプチド、ここに記載のキメラT A Tポリペプチド、又はここに記載の抗T A T抗体が含まれ得る。製造品は、更に場合によっては、腫瘍の治療的処置又は診断的検出のためのこの組成物の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を含みうる。

本発明の他の実施態様は、T A Tポリペプチド、キメラT A Tポリペプチド、又は抗T A Tポリペプチド抗体に反応する症状の治療に有用な医薬の調製のための、ここに記載のT A Tポリペプチド、ここに記載のキメラT A Tポリペプチド、ここに記載の抗T A Tポリペプチド抗体、ここに記載のT A T結合オリゴペプチド、又はここに記載のT A T結合有機分子の使用に関する。

【0014】

本発明の他の実施態様は、本明細書に開示するC D R-L 1、C D R-L 2、C D R-L 3、C D R-H 1、C D R-H 2、又はC D R-H 3配列の内の1以上を含む単離された任意の抗体、或いはそのような抗体と同じエピトープに結合する任意の抗体を目的とする。

【0015】

本発明の他の実施態様は、T A Tポリペプチドを発現する細胞の成長を阻害する方法に関し、該方法は、細胞を、T A Tポリペプチドと結合する抗体と接触させることを含み、ここでT A Tポリペプチドへの抗体の結合がT A Tポリペプチドを発現する細胞の成長の阻害を引き起こす。好適な実施態様では、細胞は癌細胞であり、T A Tポリペプチドへの抗体の結合がT A Tポリペプチドを発現する細胞の死を引き起こす。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害性剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはC H O細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

本発明の更に他の実施態様は、T A Tポリペプチドを発現する細胞を含む癌性細胞を持つ哺乳動物を治療的に処置する方法に関し、該方法は、T A Tポリペプチドと結合する抗体の治療的に有効な量を哺乳動物に投与することを含み、それによって腫瘍の効果的な治療的処置が達成される。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害性剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされる。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはC H O細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【0016】

本発明の更に他の実施態様は、T A Tポリペプチドを含むと思われる試料中のT A Tポ

10

20

30

40

50

リペプチドの存在を決定する方法に関し、該方法は、試料をT A Tポリペプチドと結合する抗体に曝して（又は接触させて）、試料中のT A Tポリペプチドへの抗体の結合を測定（又は検出）することを含み、そのような結合の存在が、試料中のT A Tポリペプチドの存在を示す。場合によっては、試料は、T A Tポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いる抗体は、場合によっては検出可能なように標識されたり、固体支持体に付着させられたりする。

本発明の更なる実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（a）前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び（b）同じ組織源又は型の既知の正常な非癌性細胞のコントロール試料中における、T A Tポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して、試験試料中のT A Tポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物での腫瘍の存在を示す。

【0017】

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（a）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料を、T A Tポリペプチドと結合する抗体と接触させ、（b）試験試料中での、抗体とT A Tポリペプチドの間で形成される複合体を検出することを含んでなり、複合体の形成が、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられる抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりするか、及び／又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

本発明の更に他の実施態様は、T A Tポリペプチドの改変、好ましくは増加された発現又は活性に関連した細胞増殖性疾患を治療又は防止する方法に関し、該方法はそのような治療を必要とする患者に、有効量のT A Tポリペプチドのアンタゴニストを投与することを含んでなる。好ましくは、細胞増殖性疾患は癌であり、T A Tポリペプチドのアンタゴニストは抗T A Tポリペプチド抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。細胞増殖性疾患の効果的な治療又は防止はT A Tポリペプチドを発現する細胞の直接の死滅化又は成長阻害の結果又はT A Tポリペプチドの細胞成長増強活性のアンタゴナイズによるものでありうる。

【0018】

本発明の更に他の実施態様はT A Tポリペプチドを発現する細胞へ抗体を結合させる方法に関し、該方法は、T A Tポリペプチドを発現する細胞を、上記抗体に、抗体が上記T A Tポリペプチドに結合するのに適した条件下で接触させ、それらの結合を可能にすることを含んでなる。好ましい実施態様では、抗体の細胞に対する結合の位置及び／又は量の、定性的及び／又は定量的な決定に有用な化合物又は分子を用いて抗体を標識する。

本発明のさらに他の実施態様は、T A Tポリペプチドを発現する細胞へ細胞障害性剤又は診断用試薬を送達する方法に関し、該方法は、該T A Tポリペプチドに結合する抗体にコンジュゲートした細胞障害性剤又は診断用試薬を提供し、抗体－薬剤コンジュゲートを形成すること、そして、該抗体－薬剤コンジュゲートに細胞を曝すことを含む。場合によって、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は単鎖抗体である。

本発明の他の実施態様は、T A Tポリペプチド、T A Tポリペプチドをコードする核酸又はその核酸を含むベクター又は宿主細胞、抗T A Tポリペプチド抗体の、（i）癌又は腫瘍の治療的処置又は診断的検出、又は（i i）細胞増殖性疾患の治療的処置又は防止に有用な医薬の製造における使用に関する。

【0019】

本発明の他の実施態様は、癌細胞の成長を阻害する方法に関し、ここで、上記癌細胞の成長はT A Tポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存し（ここで、T A Tポリペプチドは癌細胞自体又は癌細胞に成長増強効果を有するポリペプチドを産生する細胞の何れかによって発現されうる）、該方法は、T A Tポリペプチドに結合する抗体にT A Tポリペプチドを接触させることを含んでなり、それによってT A Tポリペプチドの成

長増強活性をアンタゴナイズし、次には癌細胞の成長を阻害する。好ましくは癌細胞の成長は完全に阻害される。更により好ましくは、T A Tポリペプチドへの抗体の結合は癌細胞の死を誘導する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害性剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされる。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはC H O細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物において腫瘍を治療的に処置する方法に関し、ここで、上記腫瘍の成長はT A Tポリペプチドの成長増強効果に少なくとも部分的に依存し、該方法は、T A Tポリペプチドに結合する抗体の治療上有効な量を哺乳動物に投与することを含んでなり、それによって上記T A Tポリペプチドの成長増強活性をアンタゴナイズし、腫瘍の効果的な治療的処置をもたらす。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害性剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされる。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはC H O細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【0020】

更なる実施態様において、本発明は、本出願に可能な以下の請求項を目的とする。

1. (a) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列をコードするDNA分子；
 (b) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするDNA分子；
 (c) 配列番号2の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つものをコードするDNA分子；
 (d) 配列番号2の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするDNA分子；
 (e) 配列番号1の何れかに示されたヌクレオチド配列；
 (f) 配列番号1の何れかに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域；或いは
 (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)の相補鎖；
 に対して少なくとも80%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する単離された核酸。
2. (a) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；
 (c) 配列番号2の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つものをコードするヌクレオチド配列；
 (d) 配列番号2の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；
 (e) 配列番号1の何れかに示されたヌクレオチド配列；
 (f) 配列番号1の何れかに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域；或いは
 (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)の相補鎖；
 を有する単離された核酸。
3. (a) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列をコードする核酸；
 (b) 配列番号2の何れかに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードする核酸；
 (c) 配列番号2の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その

10

20

30

40

50

関連シグナルペプチドを持つものをコードする核酸；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードする核酸；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列；

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域；或いは

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) の相補鎖；
にハイブリダイズする単離された核酸。

4. ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションが起こる、請求項 3 に記載の核酸。

5. 少なくとも約 5 ヌクレオチド長である、請求項 3 に記載の核酸。

6. 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の核酸を有する発現ベクター。

7. 前記核酸が、前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に作用可能に結合する、請求項 6 に記載の発現ベクター。

8. 請求項 7 に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。

9. CHO 細胞、大腸菌細胞、又は酵母細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

10. 前記ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの生産方法。

11. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

12. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する単離されたポリペプチド。

13. 異種ポリペプチドに融合した請求項 11 又は 12 に記載のポリペプチドを有するキメラポリペプチド。

14. 前記異種ポリペプチドが免疫グロブリンのエピトープタグ配列又は Fc 領域である、請求項 13 に記載のキメラポリペプチド。

15. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その

10

20

30

40

50

関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する単離された抗体。

16. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

10

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

20

を有するポリペプチドに結合する単離された抗体。

17. モノクローナル抗体である、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

18. 抗体断片である、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

19. キメラ又はヒト化抗体である、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

20. 増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

21. 細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

22. 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 21 に記載の抗体。

23. 細胞障害性剤が毒素である、請求項 21 に記載の抗体。

24. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項 23 に記載の抗体。

30

25. 毒素がメイタンシノイドである、請求項 23 に記載の抗体。

26. 細菌中で産生される、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

27. CHO 細胞中で産生される、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

28. 結合する細胞に死を誘発する、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

29. 検出可能に標識される、請求項 15 又は 16 に記載の抗体。

30. 請求項 15 又は 16 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸。

31. 前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に作用可能に結合する、請求項 30 に記載の核酸を有する発現ベクター。

40

32. 請求項 31 に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。

33. CHO 細胞、大腸菌細胞、又は酵母細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

34. 前記抗体の発現に適した条件下で請求項 32 に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記抗体を回収することを含む抗体の生産方法。

35. 担体と組み合わせて、(a) 請求項 11 に記載のポリペプチド、(b) 請求項 12 に記載のポリペプチド、(c) 請求項 13 に記載のキメラポリペプチド、(d) 請求項 15 に記載の抗体、又は (e) 請求項 16 に記載の抗体を含有する組成物。

36. 前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項 35 に記載の組成物。

37. (a) 容器；及び

(b) 前記容器に収容された請求項 35 に記載の組成物

50

を含んでなる製造品。

38. 癌の治療的処置又は診断的検出のための前記組成物の使用に言及した、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器に含められたパッケージ挿入物を更に含む、請求項37に記載の製造品。

39. (a) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号1の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号1の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞の成長を阻害する方法であって、前記タンパク質に結合する抗体を接触させ、前記タンパク質に前記抗体が結合することにより前記細胞の成長が阻害される方法。

40. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項39に記載の方法。

41. 前記抗体が抗体断片である、請求項39に記載の方法。

42. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項39に記載の方法。

43. 前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項39に記載の方法。

44. 前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項39に記載の方法。

45. 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44に記載の方法。

46. 細胞障害性剤が毒素である、請求項44に記載の方法。

47. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項46に記載の方法。

48. 毒素がメイタンシノイドである、請求項46に記載の方法。

49. 前記抗体が細菌中で産生される、請求項39に記載の方法。

50. 前記抗体がCHO細胞中で産生される、請求項39に記載の方法。

51. 前記細胞が癌細胞である、請求項39に記載の方法。

52. 前記癌細胞に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項51に記載の方法。

53. 前記癌細胞が、乳癌細胞、直腸結腸癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頸部癌細胞、黒色腫細胞、及び白血病細胞からなる群から選択される、請求項51に記載の方法。

54. 前記癌細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項51に記載の方法。

55. 前記細胞の死を誘発する、請求項39に記載の方法。

56. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号2の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号2の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号1の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

10

20

30

40

50

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する、請求項 39 に記載の方法。

57. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物の治療方法であって、前記タンパク質に結合する抗体の治療的有効量を前記哺乳動物に投与することにより前記哺乳動物を有効に治療する方法。

58. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 57 に記載の方法。

59. 前記抗体が抗体断片である、請求項 57 に記載の方法。

60. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 57 に記載の方法。

61. 前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 57 に記載の方法。

62. 前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 57 に記載の方法。

63. 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 62 に記載の方法。

64. 細胞障害性剤が毒素である、請求項 62 に記載の方法。

65. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項 64 に記載の方法。

66. 毒素がメイタンシノイドである、請求項 64 に記載の方法。

67. 前記抗体が細菌中で産生される、請求項 57 に記載の方法。

68. 前記抗体が CHO 細胞中で産生される、請求項 57 に記載の方法。

69. 前記腫瘍に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項 57 に記載の方法。

70. 前記腫瘍が、胸部腫瘍、直腸結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、中枢神経系腫瘍、肝臓腫瘍、膀胱腫瘍、膵臓腫瘍、又は子宮頸部腫瘍からなる群から選択される、請求項 57 に記載の方法。

71. 前記腫瘍の癌性細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項 57 に記載の方法。

72. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する、請求項 57 に記載の方法。

73. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を含むことが疑われる試料中における前記タンパク質の存在を決定する方法であって、前記タンパク質に結合する前記抗体に前記試料を曝し、前記試料中における前記タンパク質への前記抗体の結合を決定し、前記タンパク質に対する抗体の結合により前記試料中における前記タンパク質の存在が示される方法。

74. 前記試料が前記タンパク質の発現が疑われる細胞を含む、請求項 73 に記載の方法。

75. 前記細胞が癌細胞である、請求項 74 に記載の方法。

76. 前記抗体が検出可能に標識される、請求項 73 に記載の方法。

77. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する、請求項 73 に記載の方法。

78. 哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを、前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料中と、同一組織由来の既知の正常細胞のコントロール試料中で測定することを含み、コントロール試料と比較して試験試料中に前記タンパク質が高いレベルで発現していることが、試験試料を採取した哺乳動物中に腫瘍が存在することを示す方法。

79. 前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程が、インサイツハ

10

20

30

40

50

イブリダイゼーション又は R T - P C R 分析でオリゴヌクレオチドを使用することを含む、請求項 7 8 に記載の方法。

8 0. 前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程が、免疫組織化学分析又はウェスタンブロッティング分析で抗体を使用することを含む、請求項 7 8 に記載の方法。

8 1. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する、請求項 7 8 に記載の方法。

8 2. 哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、

前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質に結合する抗体に対し、前記哺乳動物由来の組織細胞の試験試料を接触させ、試験試料中における、前記抗体と前記タンパク質の複合体の形成を検出することを含み、複合体の形成が哺乳動物中における腫瘍の存在を示す方法。

8 3. 前記抗体が検出可能に標識される、請求項 8 2 に記載の方法。

8 4. 前記組織細胞の試験試料が、癌性腫瘍を有することが疑われる個体から得たものである、請求項 8 2 に記載の方法。

8 5. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

10

20

30

40

50

を有する、請求項 8 2 に記載の方法。

8 6. (a) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の発現又は活性の増大に関連する細胞増殖障害を治療又は予防する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対し、前記タンパク質のアンタゴニストの治療的有効量を投与することによって、前記細胞増殖障害を有効に治療又は予防する方法。

8 7. 前記細胞増殖障害が癌である、請求項 8 6 に記載の方法。

8 8. 前記アンタゴニストが抗 T A T ポリペプチド抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 8 6 に記載の方法。

8 9. (a) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞に対し、抗体を結合させる方法であって、前記タンパク質に結合する抗体に前記細胞を接触させ、前記細胞に抗体を結合させることにより、前記細胞に抗体を結合させることを含む方法。

9 0. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 9 に記載の方法。

9 1. 前記抗体が抗体断片である、請求項 8 9 に記載の方法。

9 2. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 8 9 に記載の方法。

9 3. 前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 8 9 に記載の方法。

9 4. 前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 8 9 に記載の方法。

9 5. 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 9 4 に記載の方法。

9 6. 細胞障害性剤が毒素である、請求項 9 4 に記載の方法。

9 7. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項 9 6 に記載の方法。

9 8. 毒素がメイタンシノイドである、請求項 9 6 に記載の方法。

9 9. 前記抗体が細菌中で産生される、請求項 8 9 に記載の方法。

1 0 0. 前記抗体が C H O 細胞中で産生される、請求項 8 9 に記載の方法。

1 0 1. 前記細胞が癌細胞である、請求項 8 9 に記載の方法。

1 0 2. 前記癌細胞に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

103. 前記癌細胞が、乳癌細胞、直腸結腸癌細胞、肺癌細胞、卵巢癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頸部癌細胞、黒色腫細胞又は白血病細胞からなる群から選択される、請求項101に記載の方法。

104. 前記癌性細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項103に記載の方法。

105. 前記細胞の死を誘発する、請求項89に記載の方法。

106. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項1から5のいずれか1項又は請求項30に記載の核酸の使用。

107. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項1から5のいずれか1項又は請求項30に記載の核酸の使用。

10

108. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項1から5のいずれか1項又は請求項30に記載の核酸の使用。

109. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項6、7又は31に記載の発現ベクターの使用。

110. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項6、7又は31に記載の発現ベクターの使用。

111. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項6、7又は31に記載の発現ベクターの使用。

112. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項8、9、32、又は33に記載の宿主細胞の使用。

20

113. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項8、9、32、又は33に記載の宿主細胞の使用。

114. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項8、9、32、又は33に記載の宿主細胞の使用。

115. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項11から14のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

116. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項11から14のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

117. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項11から14のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

30

118. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項15から29のいずれか1項に記載の抗体の使用。

119. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項15から29のいずれか1項に記載の抗体の使用。

120. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項15から29のいずれか1項に記載の抗体の使用。

121. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項35又は36に記載の組成物の使用。

122. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項35又は36に記載の組成物の使用。

40

123. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項35又は36に記載の組成物の使用。

124. 癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項37又は38に記載の製造品の使用。

125. 腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項37又は38に記載の製造品の使用。

126. 細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項37又は38に記載の製造品の使用。

127. (a) 配列番号2の何れか一に示されたポリペプチド；

(b) 配列番号2の何れか一に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプ

50

チドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の成長増強効果に細胞の成長が少なくとも部分的に依存する細胞の成長を阻害する方法であって、前記タンパク質に結合する抗体に対して前記タンパク質を接触させることにより、前記細胞の成長を阻害する方法。

128. 前記細胞が癌細胞である、請求項 127 に記載の方法。

129. 前記細胞が前記タンパク質を発現する、請求項 127 に記載の方法。

130. 前記タンパク質に対する前記抗体の結合が、前記タンパク質の細胞成長増強活性をアンタゴナイズする、請求項 127 に記載の方法。

131. 前記タンパク質に対する前記抗体の結合が前記細胞の死を誘発する、請求項 127 に記載の方法。

132. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 127 に記載の方法。

133. 前記抗体が抗体断片である、請求項 127 に記載の方法。

134. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 127 に記載の方法。

135. 前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 127 に記載の方法。

136. 前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 127 に記載の方法。

137. 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 136 に記載の方法。

138. 細胞障害性剤が毒素である、請求項 136 に記載の方法。

139. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項 138 に記載の方法。

140. 毒素がメイタンシノイドである、請求項 138 に記載の方法。

141. 前記抗体が細菌中で産生される、請求項 127 に記載の方法。

142. 前記抗体が CHO 細胞中で産生される、請求項 127 に記載の方法。

143. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

を有する、請求項 127 に記載の方法。

144. (a) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチド；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド；

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の成長増強効果に腫瘍の成長が少なくとも部分的に依存する、哺乳動物の腫瘍の治療的処置法であって、前記タンパク質に結合する抗体に対して前記タンパク質を接触させることにより、前記腫瘍を有効に処置する方法。

145. 前記腫瘍の細胞が前記タンパク質を発現する、請求項 144 に記載の方法。

146. 前記タンパク質に対する前記抗体の結合が、前記タンパク質の細胞成長増強活性をアンタゴナイズする、請求項 144 に記載の方法。

147. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 144 に記載の方法。

148. 前記抗体が抗体断片である、請求項 144 に記載の方法。

149. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項 144 に記載の方法。

150. 前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 144 に記載の方法。

151. 前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 144 に記載の方法。

152. 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 151 に記載の方法。

153. 細胞障害性剤が毒素である、請求項 151 に記載の方法。

154. 毒素が、メイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群から選択される、請求項 153 に記載の方法。

155. 毒素がメイタンシノイドである、請求項 153 に記載の方法。

156. 前記抗体が細菌中で産生される、請求項 144 に記載の方法。

157. 前記抗体が CHO 細胞中で産生される、請求項 144 に記載の方法。

158. 前記タンパク質が、

(a) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 の何れかーに示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの；

(d) 配列番号 2 の何れかーに示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 1 の何れかーに示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列；

である、請求項 144 に記載の方法。

159. 請求項 15 から 29 のいずれかーに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する単離された抗体。

160. モノクローナル抗体である請求項 159 に記載の抗体。

161. 抗体断片である、請求項 159 に記載の抗体。

162. キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 159 に記載の抗体。

163. 増殖阻害性剤にコンジュゲートしている、請求項 159 に記載の抗体。

164. 細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項 159 に記載の抗体。

10

20

30

40

50

165. 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より選択される、請求項164に記載の抗体。

166. 細胞障害性剤が毒素である、請求項164に記載の抗体。

167. 毒素がメイタンシノイド、カリケアマイシン及びアウリスタチンからなる群より選択される、請求項166に記載の抗体。

168. 毒素がメイタンシノイドである、請求項166に記載の抗体。

169. 細菌中で産生される請求項159に記載の抗体。

170. CHO細胞中で産生される請求項159に記載の抗体。

171. 結合する細胞の死を誘発する、請求項159に記載の抗体。

172. 検出可能に標識される、請求項159に記載の抗体。

10

173. 請求項15から29のいずれかに記載の抗体のいずれかの相補性決定領域の少なくとも一つを含む、請求項159に記載の抗体。

174. TATポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞。

175. 請求項15から29のいずれかの抗体によって結合されるエピトープに結合する抗体を同定する方法であって、請求項15から29のいずれかの抗体の結合を遮断する試験抗体の能力を測定することを含み、このとき、請求項15から29のいずれかの抗体のTATポリペプチドへの結合を、少なくとも40%そして等しい抗体濃度で試験抗体が遮断する場合に、該試験抗体が請求項15から29のいずれかの抗体によって結合されるエピトープへ結合することができることを示す、方法。

20

【0021】

本発明のさらなる実施態様は、本明細書を読むことで当業者に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】TAT419 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：1）を示し、配列番号：1はここでは「DNA96945」と称するクローンである。予測される開始および停止コドンを下線で示す。

【図2】図1に示す配列番号：1のコード配列から得られるTAT419ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図3】ネズミ科5E9モノクローナル抗体の完全長軽鎖のアミノ酸配列（配列番号：3）と、ネズミ科5E9モノクローナル抗体の可変軽鎖（配列番号：5）を示す。

30

【図4】ネズミ科5E9モノクローナル抗体の完全長重鎖のアミノ酸配列（配列番号：4）と、ネズミ科5E9モノクローナル抗体の可変重鎖（配列番号：6）を示す。

【図5】ヒト化hu5E9.v1抗体の完全長軽鎖のアミノ酸配列（配列番号：13）と、ヒト化hu5E9.v1抗体の可変軽鎖（配列番号：15）を示す。

【図6】ヒト化hu5E9.v1抗体の完全長重鎖のアミノ酸配列（配列番号：14）と、ヒト化hu5E9.v1抗体の可変重鎖（配列番号：16）を示す。

【図7】ヒト化hu5E9.v2抗体の可変重鎖のアミノ酸配列（配列番号：17）を示す。

【図8】PBS（PBS）、生きた細胞の表面上のTAT419ポリペプチドに結合しないvc-MMAE毒素コンジュゲートコントロール抗体（Ctrl-vc-MMAE）、およびvc-MMAE毒素コンジュゲートネズミ科5E9モノクローナル抗体（5E9-vc-MMAE）の様々な濃度による、UACC257X2.2細胞のインビトロ殺傷を示す。

40

【図9】ヌードマウスにおけるUACC257X2.2異種移植片に対する、hu5E9.v1-vc-MMAE（hu5E9.v1-MMAE）、ベヒクル単独（ベヒクル）、又はTAT419ポリペプチドに結合しないMMAE-コンジュゲートコントロール抗体（Ctrl-vc-MMAE）の様々な濃度を用いた処置のインビボの治療上の有効性を示す。

【発明を実施するための形態】

50

【0023】

(本発明の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される「T A Tポリペプチド」及び「T A T」という用語は、直後に数値表示がある場合には種々のポリペプチドを指し、完全な表示（つまり、T A T／数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」という用語がここでは実際の数的表示として提供されている「T A T／数字ポリペプチド」及び「T A T／数字」という用語には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片（ここでさらに定義される）を包含する。ここに記載されているT A Tポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離して10
もよく、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「T A Tポリペプチド」という用語は、ここに記載の各個々のT A T／数字ポリペプチドを指す。「T A Tポリペプチド」を指すこの明細書の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時に集合的に指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、T A T結合オリゴペプチドの形成、T A T結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドに關している。「T A Tポリペプチド」という用語は、また、ここに記載のT A T／数字ポリペプチドの変異体を含む。ある実施態様では、T A T 4 1 9 ポリペプチド配列は配列番号：2に示す。

【0024】

「天然配列T A Tポリペプチド」には、天然由来のT A Tポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列T A Tポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列T A Tポリペプチド」という用語には、特に、特定のT A Tポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列T A Tポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン（示されているならば）は、図において太字及び下線で示した。添付図に「N」又は「X」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。20
しかし、添付図に開示したT A Tポリペプチドは、図面においてアミノ酸位置1としてここに表示されたメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をT A Tポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。30

【0025】

T A Tポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「E C D」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないT A Tポリペプチドの形態を意味する。通常、T A TポリペプチドE C Dは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のT A Tポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインの何れかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。場合によっては、従って、T A Tポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界の何れかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。40

【0026】

ここに開示する種々のT A Tポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付図に示されうる。しかし、シグナルペプチドのC末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC末端境界の何れかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC末端境界は、そのような50

型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうることに留意される（例えば、Nielsen等, Prot. Eng.10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【0027】

「TATポリペプチド変異体」とはTATポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠くTATポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しないTATポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長TATポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なTATポリペプチドを意味する。このようなTATポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN末端又はC末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたTATポリペプチドが含まれる。通常、TATポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くTATポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTATポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、TAT変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、TAT変異体ポリペプチドは、天然TATポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然TATポリペプチド配列に比較して2、3、4、5、6、7、8、9、又は10以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【0028】

ここで同定したTATポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のTATポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが米国特許第7160985号（出典明記によってここに援用される）に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社

によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU 5 1 0 0 8 7で登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2 プログラムは、UNIX (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX (登録商標) V4. 0 Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2 プログラムによって設定され変動しない。

【0029】

アミノ酸配列比較にALIGN-2 が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性 (あるいは、与えられたアミノ酸配列Bへの、それとの、又はそれに対する或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。

【0030】

「TAT変異体ポリヌクレオチド」又は「TAT変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、TATポリペプチド、好ましくは活性TATポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列TATポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTATポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列 (完全長TATポリペプチドの完全なコード化配列の一部分のみを表す核酸によってコードされた) と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、TAT変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列TATポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTATポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0031】

通常、TAT変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、9

10

20

30

40

50

10、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

【0032】

ここで同定されるTATコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のTAT核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが米国特許第7160985号(出典明記によってここに援用される)に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、そのソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0033】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一である一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0034】

他の実施態様では、TAT変異体ポリヌクレオチドとは、TATポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長TATポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。TAT変異体ポリペプチドは、TAT変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

TATポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」なる用語は、(添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される)本発明の完全長TATポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を指す。ATCC寄託核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」なる用語は、(添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される)ATCCに寄託されたベクター中に挿入されているcDNAのTATポリペプチドコード部分を指す。

【0035】

ここに開示される種々のTATポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には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、ポリペプチドは、(1)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15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(2)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SDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、TATポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0036】

「単離された」TATポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、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、単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0037】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0038】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995)を参照のこと。

【0039】

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温を用いる、例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42℃で、50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコー

ル／0.1%のポリビニルピロリドン／50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファ、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム；又は(3)42℃で、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液中で終夜ハイブリダイゼーション、42℃で、0.2×SSC(塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム)中にて10分間の洗浄、ついで55℃で、EDTAを含む0.1×SSCからなる10分間の高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37℃での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中にて約37-50℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【0040】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したTATポリペプチド又は抗TAT抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8-50のアミノ酸残基(好ましくは、約10-20の残基)を有する。

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるTATの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するTATポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生TATが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力以外の、天然又は天然発生TATによって引き起こされる生物機能(阻害又は刺激)を意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生TATが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力を意味する。

【0041】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然TATポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。同じように、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然TATポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然TATポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子等が含まれる。TATポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、TATポリペプチドと候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子を接触させ、そして通常はTATポリペプチドに関連している一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

【0042】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え(小さく)させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子の治療量を投与された後に

、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び／又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、T A Tポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；及び／又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の軽減；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗T A T抗体又はT A T結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び／又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び／又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

10

【0043】

疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、有効性は、例えば、病気の進行までの時間（T T P）の算定及び／又は反応速度（R R）を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がりを確認するためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。C Tスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸のX線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（T R U S）及び経直腸的針生検（T R N B）

20

【0044】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

【0045】

癌の治療、症状の緩和又は診断のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

30

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0046】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性p H緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、T W E E N（登録商標）、ポリエチレングリコール（P E G）、及びP L U R O N I C S（登録商標）を含む。

40

【0047】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコ

50

ーンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4275149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばT A Tポリペプチド、それらに対する抗体又はT A T結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

【0048】

ここで定義されている「小」分子又は「小」有機分子とは、約500ダルトン未満の分子10
子量である。

ここに開示するポリペプチド、抗体、T A T結合オリゴペプチド、T A T結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【0049】

「治療の有効量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、T A T結合オリゴペプチド、T A T結合有機分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。20
。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の成長を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞障害性であり得る。

【0050】

抗T A T抗体、T A Tポリペプチド、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子の「増殖阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗T A T抗体、T A Tポリペプチド、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子の「成長阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。30

抗T A T抗体、T A Tポリペプチド、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子の「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗T A T抗体、T A Tポリペプチド、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子の「細胞障害性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗T A Tモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ(polyepitopic)特異性を持つ抗T A T抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗T A T抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗T A T抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」(I g)という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え40
可能に用いられる。

【0051】

「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を意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への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、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%以上の、最も好ましくは99重量%以上の抗体まで、(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15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程度まで、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還元又は非還元条件下でのS D S - P A G Eによる均一性まで精製される。単50

離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0052】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、 α 及び γ 鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、 μ 及び ϵ アイソタイプに対しては4つの C_H ドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 V_L と V_H は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

【0053】

任意の脊椎動物種からのL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を割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる重鎖を有する。さらに γ 及び α のクラスは、 C_H 配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。 V ドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、 V 領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな β -シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 β -シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences 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は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

【0054】

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を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、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は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成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、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0055】

ここで、モノクローナル抗体は、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又は相同性があり、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又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

「インタクトな」抗体は、抗原-結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、インタクトな抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0056】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、及びFv断片;ダイアボディ(diabodies);直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2;Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $F(ab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'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 C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0057】

Fc断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるFcレセプター(FcR)によって認識される部位である。

「Fv」は、完全な抗原-認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRの

みを含んでなるF_vの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0058】

「sF_v」又は「scF_v」とも略称される「単鎖F_v」は、単一のポリペプチド鎖内に結合したV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sF_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ンカーをさらに含み、それはsF_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。sF_vの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

10

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V_HとV_Lドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsF_v断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sF_v断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開93/11161号; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0059】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、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抗体特異性、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。

20

30

【0060】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトIgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原(すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(K_d)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上に定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

40

【0061】

「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

50

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。

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。

【0062】

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的实施態様を記載する。

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(^{125}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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 ^{125}I 抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Presta等、(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 γ 計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か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°CのBIAcoreTM-2000又はBIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってKd又はKd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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~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 μl /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°C、およそ25 μl /分の流速で0.

10

20

30

40

50

0.5% 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。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ 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

【0063】

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ス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 µg/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 µl/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。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 µl/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、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ 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。一実施態様における本発明の「 K_d 」又は「 K_d 値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(^{125}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)、抗体のFab型(バージョン)とその抗原分子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)にて一晩コートして、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℃)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(^{125}I)抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(Presta等、(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を一晩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1時間インキュベートする。そして、溶

20

30

40

50

液を取り除き、プレートに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 μ l/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount γ 計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か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 $^{\circ}$ CのBIAcoreTM-2000又はBIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってKd又はKd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 μ g/ml($\sim 0.2 \mu$ M)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおおよそ10になるように5 μ 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 $^{\circ}$ C、おおよそ25 μ 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(Kd)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 $^{\circ}$ C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。

【0064】

一実施態様では、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 $^{\circ}$ CのBIAcoreTM-2000又はBIAcoreTM-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 μ g/ml($\sim 0.2 \mu$ M)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおおよそ10になるように5 μ 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。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 $^{\circ}$ C、おおよそ25 μ 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(Kd)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 $^{\circ}$ C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。

【0065】

ここで用いる「実質的に減弱した」、又は「実質的に異なる」という表現は、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／対照抗体に関連する他のもの)の差異に、前記値(例えばKd値、HAMA応答)によって測定される生物学的性質の上で統計学的に有意な差異を認める程度に、2つの数値の差が有意に大きいことを意味する。前記2つの値の差異は、参照／対照抗体の値の好ましくは約10%以上、好ましくは約20%以上、好ましくは約30%以上、好ましくは約40%以上、好ましくは約50%以上である。

「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又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。本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるVL又はVHフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。既存のアミノ酸変化が存在する場合、好ましくは5つのみ、好ましくは4つ以下、又は3つ以下の既存のアミノ酸変化が存在する。既存のアミノ酸変化がVH中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置71H、73Hおよび78Hの内の3つ、2つ又は1つのみである、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、71A、73Tおよび／または78Aであってよい。一実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0066】

本発明の抗体は、第二の抗体が結合するエピトープと同じエピトープへの結合について競合できる。標準的なインビトロ抗体競合結合分析において、同じ濃度で、一つのモノクローナル抗体が、他の同抗体の結合を40%以上ブロックする場合、これらモノクローナル抗体は「同じエピトープ」を共有すると考えられる。

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、VLについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループκIである。一実施態様では、VHについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループIIである。

【0067】

「VHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。

「VLサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖κサブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。

【0068】

「非修飾ヒトフレームワーク」は、アクセプターヒトフレームワーク、例えばアクセプターヒトフレームワーク中の非ヒトアミノ酸置換(一又は複数)に対して欠如しているヒトフレームワークと同じアミノ酸配列を有するヒトフレームワークである。

本明細書の目的に関して「変更された高頻度可変領域」という場合、その中に一又は複数(例えば1から約16)のアミノ酸置換を含有する高頻度可変領域を意味する。

【0069】

本願明細書の目的に関して「非修飾高頻度可変領域」という場合、それが得られた非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有する高頻度可変領域、すなわち一又は複数のアミノ酸置換

がないものである。

本願明細書において、用いられる「高頻度可変領域」、「HVR」、「HV」又は「CDR」という用語は、配列中の高頻度に可変であるおよび／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(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)の3つと、VL(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)の3つからなる計6つの高頻度可変領域を含んでいる。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 10
及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。「接触」高頻度可変領域は、入手可能な複雑な結晶構造の分析に基づくものである。これら高頻度可変領域各々の残基を以下に示す。特に断らない限り、Kabatのナンバリングを利用する。高頻度可変領域の位置は、通常、アミノ酸24-34(CDR-L1)、アミノ酸49-56(CDR-L2)、アミノ酸89-97(CDR-L3)、アミノ酸26-35A(CDR-H1)、アミノ酸49-65(CDR-H2)、及びアミノ酸93-102(CDR-H3)である。

【0070】

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：VLのアミノ酸24-36(L1)、及びアミノ酸46-56(L2)。可変ドメイン残基には、これらの定義の各々にあるように上掲のKabat等に従って番号を付けた。 20

本願明細書に定義される「フレームワーク」又は「FR」残基は、高頻度可変領域残基以外の、それらの可変ドメイン残基である。

【0071】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するもの、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。ヒト抗体のこのような定義から、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、VHドメインとVL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。CDR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。 30

「ブロッキング(ブロック)抗体」又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか、減弱するものである。好適なブロッキング抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にないしは完全に阻害する。 40

【0072】

「TAT結合オリゴペプチド」はここで記載される様なTATポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。TAT結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。TAT結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、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、 50

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又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なTATポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。TAT結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【0073】

「TAT結合有機分子」とは、ここに記載されるようなTATポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。TAT結合有機分子は既知の方法（例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。TAT結合有機分子は通常、約2000ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なTATポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照）。

【0074】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする診断及び／又は治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示細胞分取器（FACS）分析又は放射免疫沈降（RIA）によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合の約10%よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合によって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、

あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、あるいはそれ以上の Kd を持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

【0075】

「TATポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「増殖阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なTATポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。TATポリペプチドは、癌細胞の表面上に発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞によって産生され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい成長阻害抗TAT抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、20%より多く、好ましくは約20%から約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でTAT発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は約0.5 nMから200 nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約100 mg/kg 体重の抗TAT抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

【0076】

「アポトーシスを誘発する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び／又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)等により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、TATポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(PS)転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核／クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、未処理細胞の約2-50倍、好ましくは約5-50倍、最も好ましくは約10-50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである。

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)；食食作用；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。

【0077】

「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 γ RIIIのみを発現するのに対し、単球はFc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immuno

10

20

30

40

50

l 9:457-92 (1991) の 4 6 4 頁の表 3 に要約されている。対象の分子の A D C C 活性をアッセイするために、米国特許第 5 5 0 0 3 6 2 号又は同第 5 8 2 1 3 3 7 号に記載されているようなインビトロ A D C C 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 (P B M C) 及びナチュラルキラー細胞 (N K 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 A D C C 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。

【 0 0 7 8 】

「F c レセプター」又は「F c R」は、抗体の F c 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 F c R は天然配列ヒト F c R である。さらに好適な F c R は、I g G 抗体 (ガンマレセプター) と結合するもので、F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I 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。F c γ R I I レセプターには、F c γ R I I A (「活性型レセプター」) 及び F c γ R I I B (「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 F c γ R I I A 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 ; I T A M) を含んでいる。阻害型レセプター F c γ R I I B 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 ; I T I M) を含んでいる (Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997) を参照)。F c R s 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 F c R s はここでの「F c R」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性 I g G s が胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプター F c R n (Guyer 等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim 等, J. Immunol. 24:249 (1994)) も含まれる。

【 0 0 7 9 】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数の F c R s 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 F c γ R I I I を発現し、A D C C エフェクター機能を実行することが望ましい。A D C C を媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞 (P B M C)、ナチュラルキラー (N K) 細胞、単球、細胞障害性 T 細胞及び好中球が含まれるが、P B M C と N K 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。

「補体依存性細胞障害」もしくは「C D C」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 (C l q) の第 1 補体が、同族抗原と結合した (適切なサブクラスの) 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、C D C 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 8 0 】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ様悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌 (squamous cell cancer) (例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫 (squamous carcinoma) を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃 (gastric) 又は腹部 (stomach) 癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓 (kidney) 又は腎 (renal) 癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、多発性骨髄腫及び B 細胞リンパ腫、脳、並びに頭部及び頸部の癌、及び関連した転移が含まれる。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴

10

20

30

40

50

う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

【0081】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、T A Tポリペプチドを発現するもの、好ましくは、同じ組織型の正常細胞と比較してT A Tポリペプチドを過剰発現する細胞である。T A Tポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましくは、その細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、脾臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害（A D C C）又は補体依存性障害（C D C）によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清（すなわち、補体の無い）を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が細胞死を誘導するか否かを確認するために、ヨウ化プロピジウム（P I）、トリパンブルー（Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995)）又は7 A A Dの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、B T 4 7 4細胞でのP I取り込みアッセイで、P I取り込みを誘導するものである。

【0082】

「T A T発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたT A Tポリペプチドを発現する。「T A T発現癌」は、細胞表面上に存在するT A Tポリペプチドを有する、又はT A Tポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「T A T発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのT A Tポリペプチドを生成し、抗T A T抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的効果を有する。他の実施態様では、任意には「T A T発現癌」は、抗T A T抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのT A Tポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌T A Tポリペプチドの産生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。T A Tポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのT A Tポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。T A Tポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるT A Tタンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる（例えば、T A Tポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えD N A技術を用いて調製することができる単離されたT A Tポリペプチドに対して調製した抗T A T抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；F A C S分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、T A Tコード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（F I S H；1998年10月公開の国際公開98/45479を参照せよ）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術、例えばリアルタイム定量P C R（R T - P C R）を介して、細胞のT A Tポリペプチドコード化核酸又はm R N Aのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、T A Tポリペプチド過剰発現を研究してもよい（同じく、例えば、1990年6月12日に発行の米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開の国際公開91/05264；1995年3月28日に発行の米国特許第5401638号；Sias等, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出

可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

【0083】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G-1、I g G-2、I g G-3、又はI g G-4サブタイプ、I g A（I g A-1及びI g A-2を含む）、I g E、I g D又はI g Mなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

【0084】

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、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。

【0085】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロスホスファミド(CYTOXAN(登録商標))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(altretamine)、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(triethylenethiophosphoramidate)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(acetogenins)（特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone)）； δ -9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))； β -ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)(HYCAMTIN(登録商標))、C P T-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン(acetylcamptothecin)、スコポレクチン(scopolactin)、及び9-アミノカンプトテシン(9-aminocamptothecin)を含む)；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；C C-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；ポドフィリン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(cryptophycin)(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(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)（合成類似体、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エレトロピン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、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、ノベンビチン(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(trofosfamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne) 抗生物質等の抗生物質（例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシガンマ 1 I 及びカリケアマイシンオメガ I 1、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシン A(dynemicin A) を含むダイネミシン(dynemicin)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediyne) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルビシン(モルフォリノードキシソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン C などのマイトマイシン(mitomycins)、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、クエラマイシン(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)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；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)のようなピリミジン類似体；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)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；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(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(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)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；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；ロニダイニン(lonidainine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモール(mopidanmol)；ニトラエリン(nitraerine)；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(losoxantrone)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(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(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリン A(verracurin A)、ロリデン A(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ピンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；チオテバ；タキソイド、例えばタキソール(登録商標)パクリタキセル、(Bristol-Myers

10

20

30

40

50

Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANETM クレモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形状のパクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及びタキソテア(登録商標)ドキシタキセル、(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；GEMZAR(登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビンブラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P-16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボリン；NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン；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)；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)(XELODA(登録商標))；上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに、上記のうちの2以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニソロンの併用治療の略記号であるCHOP、及び5-F Uとロイコボリン(leucovovin)と組み合わせられるオキサリプラチン(ELOXATINTM)による治療投薬計画の略記号であるFOLFOXが含まれる。

【0086】

また、癌の成長を促進しうるホルモンの影響を調節、低減、阻止(ブロック)又は阻害するように作用し、たびたび全身性、又は全身治療の形態にある抗ホルモン剤もこの定義に含まれる。これらはホルモン類自体でもよい。例として、抗卵胞ホルモン類及び、選択的なエストロゲンレセプターモジュレータ類(S E R M)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェン)、EVISTA(登録商標)ラロキシフェン、ドロロキシフェン(droloxifene)、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)、LY117018、オナプリストン及びFARESTON(登録商標)トレミフェン、抗プロゲステロン類、エストロゲンレセプター下方制御因子(E R D)、卵巣を抑制するか又は一時停止させるように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン(L H R H)アゴニスト、例えば、LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)酢酸ロイプロリド、ゴセレリンアセテート、プセレリンアセテート及びトリプトレリン(tripterelin)、他の抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びビカルタミド、及び、副腎のエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬、例として、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタン、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ボロゾール、FEMARA(登録商標)レトロゾール及びARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールなどがある。加えて、化学療法剤のこのような定義には、ビスホスホネート、例えばクロドロン酸(例えば、BONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロロン酸、NE-58095、ZOMETA(登録商標)ゾレドロロン酸／ゾレドロネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロネート、AREDIA(登録商標)パミドロロン酸、SKELID(登録商標)チルドロン酸又はACTONEL(登録商標)、リセドロロン酸、並びにトロキサチタビン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシチン類似体)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの、例として、例えばP K C- α 、R a f、H-R a s及び上皮性成長因子レセプター(E G F-R)、ワクチン、例えばTHERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、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、LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1インヒビター、ABARELIX(登録商標) r m R H、ラパチニブジトシラート(E r b B-2及びE G F R二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター、GW572016とも称される)、及び、上記の何れかの薬学的に受容可能な塩類、酸又は誘導体が含まれる。

【0087】

ここで用いられる際の「増殖阻害性剤」は、細胞、特にT A T発現癌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、増殖阻害

10

20

30

40

50

性剤は、S期でT A T発現細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害性剤の例は、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G 1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、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類、及びトポイソメラーゼ I I 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G 1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・プーラン ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、ブリストル-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。

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビ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- α -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。

【0088】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- β 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- α 及びTGF- β 等のトランスフォーミング成長因子（TGFs）；インシュリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘発因子；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（CSFs）、例えばマクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；及び顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（ILs）、例えばIL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF- α 及びTNF- β ；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び／又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【0089】

II. 本発明の組成物及び方法

A. 抗T A T抗体

一実施態様では、本発明は、ここで治療及び／又は診断薬としての用途が見出され得る抗T A T抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、SOCl₂、又はR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=NRを用いて結合させることができる。

10

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 µg又は5 µg（それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5から1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7から14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0090】

20

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

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上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。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。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合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させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

30

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（融合のパートナーとも呼ばれる）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、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニ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ポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(HAT培地)。

【0091】

好ましい融合のパートナーである骨髓腫細胞は、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発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択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、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーグ・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、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。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等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

40

50

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。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(R I A)又は酵素結合免疫吸着検定(E L I S A)によって測定する。

【0092】

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

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、その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は、例えば、D-M E M又はR P M I - 1 6 4 0培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー(例えばプロテインA又はプロテインG-セファロースを用いる)又はイオン交換クロマトグラフィー、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、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

モノクローナル抗体をコードするD N Aは、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなD N Aの好ましい供給源となる。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、Sker ra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【0093】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(n M範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

抗体をコードするD N Aは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(C_H及びC_L)の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4, 816, 567号; Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0094】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-TAT抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギ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CDR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)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのCDR領域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領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、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、最適には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 [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)]。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、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」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者 [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷の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対応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幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0095】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びHAMMA反応(ヒト抗-マウス抗体)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ヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「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ー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Vドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体のために受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽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等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高結合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、好ましい方法では、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、FR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、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0096】

ヒト化抗TAT抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤(類)と結合していてもよい抗体断片、例えばFabであってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷IgG1抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm)); 同5545807号; 及び国際公開第97/17852号を参照されたい。

【0097】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

【0098】

4. 抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも、抗体断片を用いることに利点がある。より小さな大きさの断片によって迅速なクリアランスが可能となり、固形腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を産生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、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, 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産生することができる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab

'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(a b')₂断片を形成することができる(Carter等, 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。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むF a b及びF(a b')₂が、米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Fv断片(s c F v)である。国際公開93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びs F vは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。s F v融合タンパク質は、s F vのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0099】

5. 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抗体である。例示的な二重特異性抗体は、T A Tタンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とT A T結合部位とが結合しうる。あるいは、抗T A Tアームは、T A T-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、F c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I (C D 3 2)及びF c γ R I I I (C D 1 6)等のI g G (F c γ R)に対するF c レセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばC D 3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はT A T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る。これらの抗体はT A T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-α、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。

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗-E r b B 2/抗-F c γ R I I I 抗体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗-E r b B 2/抗-F c γ R I 抗体が開示されている。二重特異性抗-E r b B 2/F c α 抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5821337号は、二重特異性抗-E r b B 2/抗-C D 3 抗体を教示するものである。

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。完全長二重特異性抗体の伝統的な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、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, 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。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTraunecker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0100】

異なったアプローチ法では、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I g 重鎖定常ドメインである。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トランスフェクトする。これにより、組立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所望の二重特異性抗体の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、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、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。

この手法の好ましい実施態様では、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、国際公開第94/04690号に開示されている。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等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

10

【0101】

米国特許第5731168号に記載された他の手法によれば、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。

20

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

30

【0102】

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等, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')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、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F(ab')₂-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(ab')₂-チオールに再変換し、他のF(ab')₂-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。

40

最近の進歩により、大腸菌からのF(ab')₂-SH断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各F(ab')₂断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びErbb2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0103】

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技術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成されている。

50

Kostelny等, 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 ' 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化し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成に対して使用することができる。Hollinger等, 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には十分に短いリンカーにより V_L に 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、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J.Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

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等 J.Immunol. 147:60(1991)。

【0104】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。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ため [米国特許第4676980号] 及びHIV感染の治療のために [国際公開第91/00360; 国際公開第92/200373; 欧州特許第03089号] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

20

【0105】

7. 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(IgM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Fc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Fc領域と、Fc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から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 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ を有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2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: $VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc$ 領域鎖; 又は $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 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CLドメインを更に有する。

30

40

【0106】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性(ADCC)及び/又は補体依存細胞障害性(CDC)を向上させることは望ま

50

しい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0107】

9. イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、増殖阻害性剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。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・アメリカナ(Phytolaca 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)、サパオナリア・オフィシナリス(saponaire officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelolin)、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。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、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Re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(SPDP)、イミノチオラン(IT)、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HCL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)ヘキサレンジアミン等)、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(MX-DTPA)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。

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、トリコセン(trichotheine)及びCC1065、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。

【0108】

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗TAT抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイ

10

20

30

40

50

タンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チューブ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4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533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。

【0109】

メイタンシノイドー抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート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0425235B1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C242に結合するDM1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、インビロ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A7、又はHER-2/neu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TA.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。TA.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SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-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。A7-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。

【0110】

抗TATポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(イムノコンジュゲート)

抗TAT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TAT抗体を化学的に結合させることにより調製される。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想されているが、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5208020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5208020号又は欧州特許第0425235B1号、Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び2004年10月8日出願の米国特許出願番号第10/960602号(ここで参照することにより開示内容を本明細書に包含する)に開示されているもの等を含む、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SMCCを含む抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日出願の米国特許出願番号第10/960602号に開示されているようにして調整することができる。結合基には、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。更なる結合基をここに開示及び例示する。

【0111】

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(SPP)、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、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ミデート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(SPP)(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。好ましい実施態様において、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。

【0112】

アウリスタチン及びドロスタチン

一部の実施態様では、免疫複合体は、ドラスタチン又はドラスタチンのペプチド類似体及び誘導体である、アウリスタチン(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む。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管の動態、GTP加水分解、核分裂、及び細胞分裂を妨害することが判明しており(Woyke等、(2001) Antimicrob. Agents and Chemother 45(12):3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌活性(Pettit等、(1998) Antimicrob. Agents Chemother 42:2961-2965)を有する。ドラスタチン又はアウリスタチンの薬剤成分は、ペプチド成分のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端で抗体に付着させることができる(WO02/088172)。

例示的なアウリスタチンの実施態様には、Senter等、Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623、(2004年3月28日)に開示された、N末端にリンクしたモノメチルアウリスタチン薬剤成分DE及びDF(即ちMMAE及びMMAF)が含まれる。前記文献の開示内容の全体を、参照により本明細書に包含する。

一般的に、ペプチドに基づく薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することにより調整することができる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知の液相合成法(E. Schroder及びK. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press参照)に従って調整することができる。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第5635483号、同第5780588号、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、Pettit等、(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863、及びDoronina (2003

) Nat Biotechnol 21(7):778-784に記載の方法に従って調製することができる。

【0113】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗TAT抗体が含まれる。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、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル- γ_1^I 、PSAG及び θ^I_1 (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QFAである。カリケアマイシン及びQFA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。

【0114】

他の細胞障害剤

本発明の抗TAT抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び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LL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(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活性断片、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。

【0115】

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TAT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、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使われる場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば ^{99m}Tc 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。

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 ^{99m}Tc 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{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(

10

20

30

40

50

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」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0116】

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、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ミダート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)。

【0117】

本発明の化合物として、(例えば米国イリノイ州ロックフォードのPierce Biotechnology, Inc. より)市販のクロスリンカー試薬、即ちBMP S、EMC S、GMB S、HBV S、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMC S、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB(サクシニミジルー(4-ビニルスルホン)安息香酸)を用いて調製したADCを特に考慮するが、これに限定されない。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照のこと。

別法として、抗TAT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、循環から未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。

【0118】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗TAT抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジリエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【0119】

B. TAT結合オリゴペプチド

本発明のTAT結合オリゴペプチドはここで記載される様なTATポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。TAT結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。TAT結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、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又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なTATポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。TAT結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号; Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照)。

【0120】

この点において、バクテリオファージ(ファージ)ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である(Scott, J.K.及びSmith G. P. (1990) Science 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体(又はランダムクローンcDNA)の大きなライブラリーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド(Cwirla, S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378)又はタンパク質(Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) Nature, 352: 624; Marks, J.D.等 (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363)ライブラリーのディスプレ

イは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている (Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号、同第 5 4 0 3 4 8 4 号、同第 5 5 7 1 6 8 9 号、及び同第 5 6 6 3 1 4 3 号。

【0121】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、λファージディスプレイシステム (WO 9 5 / 3 4 6 8 3 ; 米国特許第 5 6 2 7 0 2 4 号)、T 4 ファージディスプレイシステム (Ren等 Gene, 215:439 (1998); Zhu等Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang等, Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren等, Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5:1833 (1996); Efimov等, Virus Genes, 10:173 (1995)及びT 7 ファージディスプレイシステム (Smith及びScott, Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993); 米国特許第 5 7 6 6 9 0 5 号) も知られている。

【0122】

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり (WO 9 8 / 1 4 2 7 7) 及びファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用 (WO 9 8 / 2 0 1 6 9 ; WO 9 8 / 2 0 1 5 9) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO 9 8 / 2 0 0 3 6) を分析及び制御するために使用されている。WO 9 7 / 3 5 1 9 6 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 9 7 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) タンパク質 A の親和性タグとしての使用も報告されている (Li等, (1998) Mol Biotech., 9:187)。WO 9 7 / 4 7 3 1 4 は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はWO 9 7 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5 4 9 8 5 3 8 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、及びWO 9 8 / 1 5 8 3 3 に記載されている。

ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニングの方法は、米国特許第 5 7 2 3 2 8 6 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、同第 5 5 8 0 7 1 7 号、同第 5 4 2 7 9 0 8 号、同第 5 4 9 8 5 3 0 号、同第 5 7 7 0 4 3 4 号、同第 5 7 3 4 0 1 8 号、同第 5 6 9 8 4 2 6 号、同第 5 7 6 3 1 9 2 号、及び同第 5 7 2 3 3 2 3 号に記載される。

【0123】

C. T A T 結合有機分子

T A T 結合有機分子とは、ここに記載されるような T A T ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。T A T 結合有機分子は既知の方法 (例えば P C T 公開第 WO 0 0 / 0 0 8 2 3 及び WO 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照) を用いて同定され、化学的に合成されうる。T A T 結合有機分子は通常、約 2 0 0 0 ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約 1 5 0 0、7 5 0、5 0 0、2 5 0 又は 2 0 0 ダルトンの大きさであり、ここに記載される様な T A T ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技

術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばPCT公開第WO00/00823及びWO00/39585号参照）。TAT結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

10

【0124】

D. 所望する特性を有する抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド及びTAT結合有機分子のスクリーニング

TATポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び有機分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は有機分子をさらに選択することができる。

本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はTAT遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでTATポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びTAT形質移入細胞は、数日間（例えば、2-7）、種々の濃度の本発明の抗TATモノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はMTTで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、DNAへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンタで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、TATポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、ある実施態様では約0.5から30 µg/mlの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約25-100%、より好ましくは約30-100%、そしてさらにより好ましくは約50-100%又は70-100%のTAT発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30 µg/ml又は0.5 nMから200 nMの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後1-10日で確かめられる。約1 µg/kgから約100 mg/kg体重での抗TAT抗体の投与が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

20

30

40

【0125】

細胞死を誘発する抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンプルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。PI取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。TATポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗TAT抗体（例えば約10 µg/ml）、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35 mmのストレーナキャップ付き12×75チューブ(チューブ当たり1 ml、処理

50

グループ当たり3チューブ)に等分する。次いで、チューブへPI ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)を与える。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメータとFACSCONVERT(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。PI取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、細胞死誘発抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子として選択することができる。

関心のある抗体が結合したTATポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗TAT抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、TATポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【0126】

E. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/01145を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開88/07378及び米国特許第4975278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及びβガラクトシダーゼ；βラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なβラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗TAT抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neuberger等, Nature 312:604-608[1984])。

【0127】

F. 完全長T A Tポリペプチド

本発明は、本出願でT A Tポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のT A Tポリペプチドをコードするc D N A（部分及び完全長）が同定され単離された。

下記の実施例に開示するように、種々のc D N AクローンがA T C Cに寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したT A Tポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

10

【0128】

G. 抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド変異体

ここに記載した抗T A T抗体及び完全長天然配列T A Tポリペプチドに加えて、抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド変異体は、コード化D N Aに適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び／又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗T A T抗体の翻訳後プロセス又はT A Tポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。

20

ここに記載した抗T A T抗体及びT A Tポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第5364934号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

30

【0129】

抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド断片がここで提供されている。そのような断片は、例えば完全長天然抗体又はタンパク質と比較した時に、N末端又はC末端で切断しているか、又は内部残基を欠いている可能性がある。ある断片は、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの所望される生物学的活性にとって必修ではないアミノ酸残基を欠く。

40

抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素でD N Aを消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成することが含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードするD N A断片を単離し増幅することが含まれる。D N A断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、P C Rの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、抗T A T抗体及びT A Tポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗T

50

A T抗体又はT A Tポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【0130】

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表6に示す。このような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以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0131】

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	10
Asp (D)	Glu; Asn	Glu	
Cys (C)	Ser, Ala	Ser	
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn	
Glu (E)	Asp, Gln	Asp	
Gly (G)	Pro; Ala	Ala	20
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg	
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Leu	ノルロイシン	
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	30
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu	
Pro (P)	Ala	Ala	
Ser (S)	Thr	Thr	
Thr (T)	Val; Ser	Ser	
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr	40
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe	
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu	

【0132】

抗TAT抗体又はTATポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、（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）標的部位の電荷又は分子疎水性、又は（c）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において有意に異

なる置換基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グループ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1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。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された（非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキランニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、抗TAT抗体又はTATポリペプチド変異体DNAを作成することもできる。

【0133】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

抗TAT抗体又はTATポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化的安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗TAT抗体又はTATポリペプチドの安定性（特に、抗体がFv断片のような抗体断片）を向上させるために、それにシステイン結合（複数でも）を加えてもよい。

【0134】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）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、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成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生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位（例えば、6-7部位）を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抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、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。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキ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。あるいは、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ヒトTATポリペプチドとの接点を同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、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、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ことができる。

抗T A T抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、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、そして抗-T A T抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘発による、天然ソースからの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）又は調製が含まれる。

【0135】

H. 抗T A T抗体及びT A Tポリペプチドの修飾

抗T A T抗体及びT A Tポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドを、抗T A T抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリン又はトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)], N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0136】

本発明の範囲内に含まれる抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び／又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び／又は天然配列抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。更には、この語句には、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的な変化が含まれる。

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化とは、典型的にはN-結合又はO-結合のいずれかである。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付与を指す。トリペプチドは、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O-結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖をヒドロキシアミノ酸へ付与することを指す。

抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について

）。抗TAT抗体又はTATポリペプチドアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、場合によっては改変され得る。

【0137】

抗TAT抗体又はTATポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行された国際公開87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

10

抗TAT抗体又はTATポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

抗TAT抗体又はTATポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって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-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル）に、コロイド状薬物送達系（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）又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

20

また、本発明の抗TAT抗体又はTATポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した抗TAT抗体又はTATポリペプチドを含むキメラ分子が形成される方法で修飾されてもよい。

30

【0138】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗TAT抗体又はTATポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗TAT抗体又はTATポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗TAT抗体又はTATポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗TAT抗体又はTATポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺

40

50

伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗TAT抗体又はTATポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えて抗TAT抗体又はTATポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH₂及びCH₃、又はヒンジ、CH₁、CH₂及びCH₃領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

10

【0139】

I. 抗TAT抗体及びTATポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗TAT抗体及びTATポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより抗TAT抗体及びTATポリペプチドを産生させる方法に関する。勿論、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて抗TAT抗体及びTATポリペプチドを調製することができると考えられている。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい [例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動を使用することによってインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（フォスター シティ, カリフォルニア）を用いて、製造者の指示によって実施してもよい。抗TAT抗体又はTATポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて所望する抗TAT抗体又はTATポリペプチドを生成させてもよい。

20

【0140】

1. 抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAの単離

抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAは、抗TAT抗体又はTATポリペプチドmRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒト抗TAT抗体又はTATポリペプチドDNAは、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。また抗TAT抗体又はTATポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法（例えば、自動核酸合成）により得ることもできる。

30

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等）によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は、PCR法を使用するものである [Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

40

【0141】

cDNAライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるような十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³

50

²P 標識 A T P のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrook ら、に示されている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、GenBank らの公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され利用可能となっている他の周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内の又は完全長配列に渡っての（アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook 等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して、選択された c D N A 又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

【0142】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、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ために適当に変性された常套の栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、p H 等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及び上掲の Sambrook 等に見出すことができる。

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、C a C l₂、C a P O₄、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook 等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw 等, Gene, 23:315(1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の国際公開 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen 等, J. Bact., 130:946 (1977) 及び Hsiao 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、D N A を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown 等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) 及び Mansour 等, Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

【0143】

ここに記載のベクターに D N A をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌 K 12 株 MM 294 (A T C C 31446) ; 大腸菌 X 1776 (A T C C 31537) ; 大腸菌株 W 3110 (A T C C 27325) 及び K 5772 (A T C C 53635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (E. coli)、エンテロバクター、エルビニア (Erwinia)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (Salmonella Typhimurium)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブ

チルス(*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 deg P ompT kan^rを有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 deg P ompT rbs7 ilvG kan^rを有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性deg P欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0144】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤（例えば、毒素）と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合に、細菌で産生させることができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号（Carter等）、米国特許第5789199号（Joly等）、及び翻訳開始部位（TIR）及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第5840523号（Simmons等）を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテインA又はGカラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにして行うことができる。

【0145】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗TAT抗体又はTATポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シズサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開の欧州特許第139383号)；クリュイベロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS 683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリス(*K. fragilis*) (ATCC 12424)、クリュイベロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16045)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ(*K. wickerhamii*) (ATCC 24178)、クリュイベロミセス・ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56500)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイベロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクリュイベロミセス・マルキシアナス(*K. marxianus*)；ヤロウィア(*Yarrowia*) (欧州特許第402226号)；ピシア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号; Sreekrishna等, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号)；アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマ

イセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第394538号) ; 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリボクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357) ; 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotrophic)酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピシア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロブシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【0146】

グリコシル化抗TAT抗体又はTATポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエS2及びヨトウ(*spodoptera*) Sf9等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*) (幼虫(caterpillar))、ネッタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフェクション用のウィルス株、例えばオートグラファ・カルフォルニカ(*Autographa californica*) NPVのL-1変異株、カイコNPVのBm-5株が公に入手でき、このようなウィルスは、本発明に係るウィルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40(COS-7, ATCC CRL1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株; ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された293細胞, Graham等, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R(CHO, Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞(CV1 ATCC CCL70); アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト頸管腫瘍細胞(HELA, ATCC CCL2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞(Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝臓癌細胞(Hep G2)である。

宿主細胞は、抗TAT抗体又はTATポリペプチド生成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、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【0147】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用い

て適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

T A Tは直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗T A T抗体又はT A Tポリペプチド-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p pあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクリュイベロミセス(*Kluyveromyces*) α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5, 010, 182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0148】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミドp B R 3 2 2に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V又はB P V)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べる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)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しており、例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、D H F Rあるいはチミジンキナーゼのように、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型D H F Rを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたD H F R活性に欠陥のあるC H O株化細胞である。酵母菌中の使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドY R p 7に存在するt r p 1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingsman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。t r p 1遺伝子は、例えば、A T C C番号44076あるいはP E P 4 - 1のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【0149】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系[Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)]; 欧州特許第36, 776号]、及びハイブリッドプロモーター、例えばt a cプロモ

ーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドをコードする D N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。

【0150】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、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、及び熱衝撃プロモーターから得られる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制御される。

より高等の真核生物による抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドをコードする D N A 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増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強する D N A のシス作動要素である。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、複製開始点の後期側の S V 4 0 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、複製開始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。エンハンサーは、抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドをコードする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。

組換え脊椎動物細胞培養での抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第117060号; 及び欧州特許第117058号に記載されている。

【0151】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドを生成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;又は米国特許再発行第30985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、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)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(マイクログラム範囲の最終濃度で通常は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同等の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まれてもよい。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以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0152】

5. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列TATポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はTAT DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0153】

6. 抗TAT抗体及びTATポリペプチドの精製

抗TAT抗体及びTATポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗TAT抗体及びTATポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

抗TAT抗体及びTATポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及び抗TAT抗体及びTATポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用い

られる生成方法及び特に生成される特定の抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドの性質に依存する。

【0154】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等、Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。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、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。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシル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プロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc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 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 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 $\gamma 3$ に推奨されている(Guss等、EMBO J. 5: 15671-575 [1986])。アフィニティリ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(商標)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、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、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などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約2.5-4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0-0.25M塩)で実施される。

【0155】

J. 製薬製剤

本発明に係る抗T A T抗体、T A T結合オリゴペプチド、T A T結合有機分子及び／又はT A Tポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は有機分子を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th 版, Osol, A. 編. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；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-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)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、又はリジン等のアミノ酸；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

；E D T A等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；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などの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Z n-タンパク質錯体）；及び／又はトウィーン(TWEEN)（登録商標）、プルロニクス(PLURONICS)（登録商標）、又はポリエチレングリコール（P E G）等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5－2 0 0 m g／m lの間、好ましくは1 0－1 0 0 m g／m lの間の濃度の抗体で構成される。

【0 1 5 6】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗T A T抗体、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子に加えて、1つの製剤に、例えば、T A Tポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗T A T抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、更に化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗-ホルモン剤、及び／又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々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）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

。徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。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））、ポリアクチド（米国特許第3 7 7 3 9 1 9号）、L-グルタミン酸及びγ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、LUPRON DEPOT(登録商標)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユプロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

インビ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、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0 1 5 7】

K. 抗T A T抗体、T A T結合オリゴペプチド又はT A T結合有機分子を用いる診断及び治療

癌におけるT A T発現を定量するために、種々の診断アッセイが利用可能である。一実施態様では、T A Tポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学（I H C）によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をI H Cアッセイへ供してもよいし、次のようなT A Tタンパク質染色強度基準と合致させてもよい：

スコア0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の1 0 %未満で観察される。

スコア1+ - わずかに／弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の1 0 %を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア2+ - 弱いあるいは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の1 0 %を越えて観察される。

スコア3+ - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の1 0 %を越えて観察される。

T A Tポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、T A Tが過剰発現していないことを特徴としうるものであるのに対し、2+又は3+スコアの腫瘍はT A Tが過剰発現していることを特徴としうる。

【0158】

別に、又は付加的に、FISHアッセイ、例えばINFORM（登録商標）(Ventana, Arizonaから販売)又はPATHVISION（登録商標）(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍におけるTAT過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

TAT過剰発現又は増幅は、インビボ診断アッセイを使用して評価することができ、例えば検出される分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体又は蛍光標識)が付けられた分子(例えば抗体、オリゴペプチド又は有機分子)を投与し、標識の局在化について患者を外部スキャンニングする。

上に記載したように、本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、TATポリペプチドを発現している癌の診断及び染色にとって有用である(例えば、ラジオイメージングで)。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からTAT発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、また、例えば、ELISA又はウエスタンブロットにおいて、インビトロでTATポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からTATポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【0159】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるTAT-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び／又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パリクタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した一又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を投与することができる。特に、パリクタキセル及び改変誘導体との組合せ治療が考えられる(例えば、欧州特許第0600517号を参照のこと)。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は治療の有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(PDR)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【0160】

特定の一実施態様では、細胞障害剤に結合した抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する毒素コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、TATタンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施態様では、細胞障害剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞障害剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ及びDNAエンドヌクレアーゼを含む。

抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子又はその免疫コンジュゲートは、公知の方法、例えばボラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹

10

20

30

40

50

腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子の投与と組合せてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の医薬製剤を使用する同時投与、及び好ましくは両方(又は全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を働かせる時間があるいずれかの順での連続投与が含まれる。このような組合せ治療により、結果として相乗的治療効果が生じることが好ましい。

【0161】

また、特定の癌に関連した他の腫瘍抗原に対する抗体の投与と共に、抗TAT抗体又は抗体類、オリゴペプチド又は有機分子の投与を組合せることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗TAT抗体(又は抗体類)、オリゴペプチド又は有機分子と一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害性剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン類(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキセタキセル)及び／又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。

抗体、オリゴペプチド有機分子は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェン等の抗-エストロゲン化合物；抗-プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第616812号を参照)；又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子(及び場合によってはここに記載した他の薬剤)を患者に投与してもよい。

【0162】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療摂生に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び／又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重1kg当たり約1μgから50mg(例えば0.1-15mg/kg/用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約4mg/kgの初期負荷量、続いて1週間に約2mg/kgの維持用量の抗TAT抗体を投与することからなってもよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1μg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知

の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【0163】

抗体タンパク質の患者への投与の他に、本出願は遺伝子治療による抗体の投与を考察する。抗体をコードする核酸の投与は「抗体を治療的有效量で投与する」という表現に含まれる。例えば、遺伝子治療を用いた細胞内抗体の産生に関する、1996年3月14日に公開された国際公開第96/07321号を参照のこと。

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第4892538号及び第5283187号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0164】

現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス）、及び脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである）での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等、Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第93/25673号及びそこに引用された参考文献も参照。

本発明の抗TAT抗体は、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫コンジュゲート、及びそれらの機能的断片が含まれる。融合抗体において、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗体はFc領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なFc領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ADCC)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞障害性を誘発し得る。また、副作用及び治療による合併症を最小にするようにエフェクター機能を除去又は低減することが望ましい場合には、所定の他のFc領域が使用される。

一実施態様では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗TAT抗体の生物学的特徴を有する抗体、特にインビボ腫瘍ターゲティング及び任意の細胞増殖阻害又は細胞障害特性を含むものが考察される。

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【0165】

本抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物におけるTAT-発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌には、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、結腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌腫(prostate adenocarcinoma)、腎細胞癌腫、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌腫、及び胸膜中皮腫が含まれる。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてTATポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビボ又はインビトロで細胞のTATポリペプチドに結合して、TAT-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸

の抗T A T抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有するネイキッド抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗T A T抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は増殖阻害性剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体が好ましい。

【0166】

本発明は、本発明の抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗T A T抗体を含有し得る。さらなる実施態様においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む増殖阻害性剤又は細胞障害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機分子を組合せて含有することもできる。また本発明は、本発明の抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する製剤も提供する。一実施態様では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

本発明の他の態様は、抗T A T抗体をコードする単離された核酸分子である。H及びL鎖、特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、天然配列抗体及び変異体をコードする鎖、該抗体の修飾体及びヒト化形態を含む。

本発明は、抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療的有效量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるT A Tポリペプチド-発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、T A Tポリペプチド-発現細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

本発明は少なくとも一つの抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットは、例えばT A T細胞殺傷アッセイ、細胞からのT A Tポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、T A Tの単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有することができる。インビトロにおけるT A Tの検出及び定量化、例えばE L I S A又はウェスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【0167】

L. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、抗T A T発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(B W F I)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、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的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。

【0168】

種々の目的、例えばT A T発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのT A Tポリペプチドの精

製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。T A Tポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むことが可能である。インビトロにおけるT A Tポリペプチドの検出及び定量化、例えばE L I S A又はウエスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも1つの本発明の抗T A T抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

10

【0169】

M. T A Tポリペプチド及びT A T-ポリペプチドコード核酸の用途

T A Tポリペプチドをコードする核酸配列(又はそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAプローブの生成において種々の用途を有している。また、T A Tコード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるT A Tポリペプチドの調製に有用であり、これらT A Tポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗T A T抗体の調製において用途を見出し得る。

完全長天然配列T A T遺伝子又はその一部は、完全長T A T c DNAの単離又はここに開示した天然T A T配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のc DNA(例えば、T A Tの天然発生変異体又は他の種からのT A Tをコードするもの)の単離のために、c DNAライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約20~約50塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列T A Tのプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から判定され得る。例えば、スクリーニング法は、T A T遺伝子のコード化領域を周知のDNA配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、³²P又は³⁵S等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明のT A T遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトc DNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意のE S T配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

20

30

【0170】

T A Tコード核酸の他の有用な断片には、標的T A T mRNA(センス)又はT A T DNA(アンチセンス)配列と結合できる一本鎖核酸配列(RNA又はDNAのいずれか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、T A T DNAのコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするc DNA配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)及びvan der Krol等(BioTechniques 6:958, 1988)に記載されている。

40

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A Tタンパク質の

50

発現を阻止するのに用いられ、それらT A Tタンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖—ホスホジエステル骨格（又は他の糖結合、国際公開91/06629に記載のもの等）を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが（つまり、酵素分解に耐えうるが）、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【0171】

アンチセンス結合の好適な遺伝子内部位には、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始／開始コドン（5'-AUG／5'-ATG）又は終結／停止コドン（5'-UAA、5'-UAG及び5'-UGA／5'-TAA、5'-TAG及び5'-TGA）を含む領域が含まれる。これらの領域は翻訳開始又は終結コドンから何れかの方向（つまり5'又は3'）に約25から約50の近接ヌクレオチドを包含するmRNA又は遺伝子の一部を意味する。アンチセンス結合のための他の好適な領域には、イントロン；エキソン；イントロン-エキソン接合部；翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域であるオープンリーディングフレーム（ORF）又は「コード領域」；5'-5'トリホスフェート結合を介してmRNAの5'-最末端残基に結合したN7-メチル化グアノシン残基を含み、5'キャップ構造自体と同様にキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドを含むmRNAの5'キャップ；翻訳開始コドンから5'方向のmRNAの部分で、mRNA又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳開始コドンと5'キャップ部位の間のヌクレオチドを含む5'の未翻訳領域（5'UTR）；及び翻訳終結コドンから3'方向のmRNAの部分で、mRNA又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの3'末端と翻訳停止コドンの間のヌクレオチドを含む、3'未翻訳領域（3'UTR）が含まれる。

T A Tタンパク質の発現を阻害するのに有用な好適なアンチセンス化合物の特定の例には、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには骨格にリン原子を保持しているものと骨格にリン原子を有していないものが含まれる。この明細書の目的のために、また当該分野でしばしば引用されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドはまたオリゴヌクレオシドであると考えることができる。好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えばホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネートで、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むもの、ホスフィネート、ホスホルアミデートで、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むもの、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェートで通常の3'-5'結合を持つもの、これらの2'-5'結合類似体、及び一又は複数のヌクレオチド間結合が3'から3'、5'から5'又は2'から2'結合である逆転された極性を持つものが含まれる。逆転した極性を持つ好適なオリゴヌクレオチドは単一の3'から3'結合を最も3'側のヌクレオチド間結合、つまり、非塩基性(abasic)でありうる単一の逆転ヌクレオシド残基（核酸塩基がないか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する）を含む。様々な塩、混合された塩及び遊離の酸形態がまた含まれる。リン含有結合の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許3687808；4469863；4476301；5023243；5177196；5188897；5264423；5276019；5278302；5286717；5321131；5399676；5405939；5453496；5455233；5466677；5476925；5519126；5536821；5541306；5550111；5563253；5571799；5587361；5194599；5565555；5527899；5721218；5672697及び5625050が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0172】

リン原子をそこに含まない好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格は短鎖アルキル又はシク

ロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は一又は複数の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有するもの；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；及び混合N、O、S及びCH₂成分部分を有する他のものが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許5034506；5166315；5185444；5214134；5216141；5235033；5264562；5264564；5405938；5434257；5466677；5470967；5489677；5541307；5561225；5596086；5602240；5610289；5602240；5608046；5610289；5618704；5623070；5663312；5633360；5677437；5792608；5646269及び5677439が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

10

他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、糖とヌクレオシド間結合の双方、つまりヌクレオチド単位の骨格が新規な基と置換される。ベース単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を持つことが示されているオリゴヌクレオチド擬態体はペプチド核酸（PNA）と呼ばれる。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。PNA化合物の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許5539082；5714331；及び5719262が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。PNA化合物の更なる教示はNielsen等、Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

20

好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオネート骨格及び／又はヘテロ原子骨格、特に-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られる]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-、及び上で参照した米国特許第5489677号に記載された-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[ここで天然ホスホジエステル骨格は-O-P-O-CH₂-と表される]及び上で参照された米国特許第5602240号のアミド骨格を含む。また好ましいものは上で参照した米国特許第5034506号のモルホリノ骨格構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

30

【0173】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一又は複数の置換糖部分を含みうる。好適なオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む：OH；F；O-アルキル、S-アルキル、又はN-アルキル；O-アルケニル、S-アルケニル又はN-アルケニル；O-アルキニル、S-アルキニル又はN-アルキニル；又はO-アルキル-O-アルキルを含み、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は非置換C₁～C₁₀アルキル又はC₂～C₁₀アルケニル及びアルキニルでありうる。特に好ましいものはO[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及びO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂であり、ここでn及びmは1から約10である。他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む：C₁～C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラリル、O-アルカリル又はO-アラリル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオ

40

50

チドの薬物動態学的性質を改善する基、オリゴヌクレオチドの薬理的性質を改善する基、及び同様な性質を持つ他の置換基。好適な修飾は2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている2'-O-CH₂CH₂OCH₃) (Martin等, Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504)、つまりアルコキシアルコキシ基を含む。更に好適な修飾は、以下の実施例に記載されているように2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、つまり2'-DMAOEとしても知られているO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られている)、つまり2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)を含む。

更に好適な修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'又は4'炭素原子に結合され二環糖部分を形成する固定核酸(Locked Nucleic Acids: LNAs)を含む。結合は好ましくはnが1又は2である2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン(-CH₂-)_n基である。LNAs及びその製造方法は国際公開98/39352及び国際公開99/14226に記載されている。

他の好適な修飾は2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-アリル(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-アリル(2'-O-CH₂-CH=CH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾はアラビノ(上)位置又はリボ(下)位置においてでありうる。好適な2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾はまたオリゴヌクレオチドの他の位置、特に3'末端ヌクレオチドの糖の3'位又は2'-5'結合オリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位になすことができる。オリゴヌクレオチドはまたペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬態体を有しうる。そのような修飾糖構造の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; 5792747; 及び5700920が含まれ、その各々は出典明示により全体がここに取り込まれる。

【0174】

オリゴヌクレオチドにはまた核酸塩基(当該分野ではしばしば単に「塩基」と称される)の修飾又は置換が含まれうる。ここで使用される場合、「未修飾の」又は「天然の」核酸塩基にはプリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)及びピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-プロピル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロポニル(-C≡C-CH₃又はCH₂-C≡CH)ウラシル及びシトシン及び他のピリミジン塩基のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン類及びグアニン類、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル類及びシトシン類、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが含まれる。更なる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン類、例えばフェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(

H-ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-2-オン)が含まれる。修飾核酸塩基にはまたプリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンが含まれる。更なる核酸塩基には米国特許第3687808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858-859頁, Kroschwitz, J.I.編 John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、及びEnglisch等, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613に開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のある種のもは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及びO-6置換プリンで、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含むものが含まれる。5-メチルシトシン置換は0.6-1.2℃だけ核酸二重安定性を増大させることが知られており (Sanghvi等, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278)、より詳細には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、好適な塩基置換である。修飾核酸塩基の製造を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許3687808;並びに米国特許4845205;5130302;5134066;5175273;5367066;5432272;5457187;5459255;5484908;5502177;5525711;5552540;5587469;5594121;5596091;5614617;5645985;5830653;5763588;6005096;5681941及び5750692が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0175】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを亢進する一又は複数の部分又はコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合させる。本発明の化合物は第1級又は第2級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合したコンジュゲート基を含みうる。本発明のコンジュゲート基には、介入物(インターカレーター)、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬理的性質を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、カチオン脂質、リン脂質、カチオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノ、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が含まれる。この発明の文脈における薬理学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を亢進し、及び/又はRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを補強する基が含まれる。この発明の文脈における薬物動態学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込み、分散、代謝又は排出を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には限定されるものではないが、脂質分子、例えばコレステロール部分(Letsinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸(Manoharan等, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1063)、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharan等, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660-306-309; Manoharan等, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser等, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基(Saison-Behmoaras等, EMBOL., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov等, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等, Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート(Manoharan等, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea等, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖(Manoharan等, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、又はアダマンタン酢酸(Manoharan等, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分(Mishra等, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニル-

オキシコレステロール部分が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた活性な薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロsporin、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗菌剤又は抗生物質にコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲート及びその製造方法は米国特許出願第09/334130号(1999年6月15日出願)及び米国特許4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5241136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928及び5688941に記載され、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0176】

与えられた化合物の全ての位置を一様に修飾する必要はなく、実際、一を超える上述の修飾を単一化合物中に又はオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオシドにさえ導入することができる。本発明はまたキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈における「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、それぞれが少なくとも一のモノマー単位、つまりオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドからなる2以上の化学的に区別される領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的にはオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞性取り込み、及び／又は標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾されている少なくとも一の領域を含む。オリゴヌクレオチドの更なる領域はRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドを切断可能な酵素の基質となりうる。例を挙げると、RNAアーゼHはRNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。故に、RNAアーゼHの活性化はRNA標的の開裂を生じ、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効果を大きく向上させる。従って、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をしばしば得ることができる。本発明のキメラアンチセンス化合物は上述の二以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド及び／又はオリゴヌクレオチド擬態体の複合構造体として形成されてもよい。好適なキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性を付与するために3'末端に少なくとも一の2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)とRNAアーゼH活性を付与するために少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ領域を含む。このような化合物はまた当該分野においてハイブリッド又はギャプマー(gapmers)とも呼ばれている。好適なギャプマーは少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ少なくとも一の領域で分離した3'末端と5'末端2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)の領域を持ち、好ましくはホスホロチオネート骨格結合を含む。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 及び5700

9 2 2 が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

本発明において使用されるアンチセンス化合物は固相合成のよく知られた技術によって簡便かつ常套的に製造することができる。そのような合成のための装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, Calif.)を含む幾つかのメーカーによって販売されている。当該分野で知られているそのような合成のための任意の他の手段を付加的に又は別に使用してもよい。オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオネート及びアルキル化誘導体を調製するために類似の技術を使用することはよく知られている。本発明の化合物は、また、取り込み、分散及び／又は吸収を補助するための他の分子、分子構造又は化合物混合物、例えばリポソーム、レセプター標的分子、経口、直腸、局所適用又は他の製剤と、混合、カプセル化、コンジュゲート又はその他、組み合わせられてもよい。そのような取り込み、分散及び／又は吸収を補助する製剤の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5108921；5354844；5416016；5459127；5521291；5543158；5547932；5583020；5591721；4426330；4534899；5013556；5108921；5213804；5227170；5264221；5356633；5395619；5416016；5417978；5462854；5469854；5512295；5527528；5534259；5543152；5556948；5580575；及び5595756が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

【0177】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2 (M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター (国際公開90/13641参照)を含む。

【0178】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【0179】

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、通常は少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16

10

20

30

40

50

、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

10

また、プローブをPCR技術に用いて、密接に関連したTATコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、TATをコードするヌクレオチド配列は、そのTATをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

20

【0180】

TATのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、TATがレセプターである場合）、TATは、結合相互作用に関わっている他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに使用することができる。このような方法により、レセプター／リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターTATは関連するリガンドの単離に使用できる。スクリーニングアッセイは、天然TAT又はTATのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計してよい。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

30

また、TAT又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施態様では、TATをコードするcDNAは、TATをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、TATをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4736866号や第4870009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのTAT導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたTATをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は

40

50

T A TをコードするD N Aの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0181】

あるいは、T A Tの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたT A Tをコードする変更ゲノムD N Aと、T A Tをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、T A Tをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するT A T「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、T A Tをコードするc D N Aは、確立された技術に従い、T A TをコードするゲノムD N Aのクローニングに使用できる。T A TをコードするゲノムD N Aの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングD N A (5' と 3' 末端の両方) を数キロベース含む [例えば、相同組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターを胚幹細胞株に (例えばエレクトロポレーションによって) 導入し、導入されたD N Aが内在性D N Aと相同的に組換えられた細胞を選択する [例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物 (例えばマウス又はラット) の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する [例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたD N Aを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたD N Aを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、T A Tポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

また、T A Tポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続の効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なD N A又はm R N Aの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスR N A及びD N Aは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている (Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0182】

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、D E A E-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス (典型的にはレトロウイルス) ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである (Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受け

るタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び／又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

ここに記載したT A Tポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、目下のところ新規な染色体マーカーの同定の必要である。本発明の各T A T核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のT A Tポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、本発明のT A Tポリペプチドは、その他の組織と比較して1つの組織において、好ましくは同じ組織型の正常組織と比較して疾患性組織において特異的に発現する。T A T核酸分子には、P C R、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0183】

この発明は、T A Tポリペプチド（アゴニスト）を模倣、又はT A Tポリペプチド（アンタゴニスト）の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたT A Tポリペプチドと結合又は複合化する、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば、細胞からのT A Tポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分子薬剤候補の同定に適したものにする。

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、そして細胞ベースアッセイを含む、当該分野で良く特徴付けられている種々の形式で行うことができる。

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているT A Tポリペプチドと、これら両成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるT A Tポリペプチド又は薬候補が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をT A Tポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきT A Tポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。

【0184】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のT A Tポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーのカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、C

hevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA,89:5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fiels及びSong, Nature(London),340,:245-246(1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌G A L 4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はD N A結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がG A L 4のD N A結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。G A L 1-l a c Zリポーター遺伝子のG A L 4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したG A L 4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

10

【0185】

ここで同定されたT A Tポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

20

アンタゴニストを検定するために、T A Tポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、T A Tポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がT A Tポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、T A Tポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合T A Tポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。T A Tポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したT A Tポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパニング及びF A C Sソーティングにより同定できる。Coligan等, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化R N AがT A Tポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このR N Aから生成されたc D N Aライブラリがプールに分配され、C O S細胞又は他のT A Tポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したT A Tポリペプチドへ曝露する。T A Tポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、対話型サブプール化及び再スクリーニング法を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

30

40

【0186】

レセプター同定の代替的方法として、標識したT A Tポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をP A G Eで分離し、X線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に

50

分離し、タンパク質マイクロシーケンシングを施してよい。マイクロシーケンシングから得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識TATポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとTATポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってTATポリペプチドの作用を競合的に障害するTATポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なTATポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNAコンストラクトであり、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、三重螺旋形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟TATポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋-Lee等, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney等, Science, 241: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりTATポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリダイゼーションしてmRNA分子のTATポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス-Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、TATポリペプチドの産生を障害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0187】

潜在的アンタゴニストは、TATポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりTATポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的開裂により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、国際公開 97/33551 (1997年9月18日公開)を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスティン(Hoogsteen)塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸張を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のPCT公報、国際公開 97/33551を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のもの

により及び／又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0188】

単離されたT A Tポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にT A Tポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたT A Tポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗T A T抗体を生成するために用いることが可能である。

ここで同定されるT A Tポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

10

T A Tポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は増殖阻害剤のようなその機能を高める薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

20

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【0189】

実施例に挙げた市販の試薬は、特に明記しない限りは、製造業者の指示に従って用いた。A T C C受託番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

30

【0190】

実施例1: Gene Express (登録商標)を用いた組織発現プロファイリング

他のヒト腫瘍及び／又は正常ヒト組織に比べて対象となる特定のヒト腫瘍組織において発現が顕著に且つ検出可能に上方制御されるポリペプチド(及びそれをコードする核酸)を同定するために、遺伝子発現情報を含む専有データベース(Gene Express (登録商標)、Gene Logic Inc.、米国メリーランド州ゲイサースバーグ)を分析した。具体的に言うと、Gene Express (登録商標)データベースの分析は、Gene Logic Inc. (米国メリーランド州ゲイサースバーグ)から入手できるGene Express (登録商標)データベースで使用するソフトウェア、またはGene Express (登録商標)データベースで使用する、ジェネンテック社で作成され、開発された専有ソフトウェアを用いて行った。分析のポジティブヒットの評価は、例えば、正常基本組織及び／又は正常増殖性組織における組織特異性、腫瘍特異性及び発現レベルなどを含むいくつかの基準に基づく。このmRNAの発現分析を用いて、T A T 419ポリペプチドをコードするmRNAが、ヒトメラノーマ癌組織において、対応する正常なヒト皮膚組織に比べて、顕著に、再現可能に、且つ検出可能に過剰発現することが決定された。

40

【0191】

実施例2: インサイトハイブリダイゼーション

50

インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と局在化、特定のmRNA合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコールの最適化バージョンに従って、PCR生成³²P-標識リボプローブを用いて実施した。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK (20 g/ml) で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリダイゼーションした。^(32P)UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55℃で終夜ハイブリダイゼーションした。スライドをKodak NTB2核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露光した。

10

【0192】

³²P-リボプローブ合成

6. 0 µl (125 mCi) の³²P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mmol) をスピード真空乾燥させた。乾燥³²P-UTPを含む各チューブに以下の成分を添加した: 2. 0 µl の5×転写バッファー、1. 0 µl のDTT (100 mM)、2. 0 µl のNTP混合物 (2. 5 mM: 各10 µl の10 mM GTP、CTP及びATP + 10 µl のH₂O)、1. 0 µl のUTP (50 µM)、1. 0 µl のRNasin、1. 0 µl のDNAテンプレート (1 µg)、1. 0 µl のH₂O、1. 0 µl のRNAポリメラーゼ (PCR産物についてT3 = AS、T7 = S、通常)。

20

チューブを37℃で1時間インキュベートした。1. 0 µl のRQ1 DNaseを添加し、ついで37℃で15分間インキュベートした。90 µl のTE (10 mM トリス pH 7. 6 / 1 mM のEDTA pH 8. 0) を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50限外濾過ユニットに充填し、プログラム10を用いてスピンスさせた (6分間)。濾過ユニットを第2のチューブに変換し、プログラム2を用いて遠心した (3分間)。最終回収遠心の後、100 µl のTEを添加した。1 µl の最終生成物をDE81紙にピペットし6 ml のBIOFLUOR IIで計数した。

プローブをTBE/尿素ゲル上で実行した。1-3 µl のプローブ又は5 µl のRNA Mrk IIIを3 µl のローディングバッファーに添加した。95℃の加熱ブロック上で3分間加熱した後、プローブを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルを流し、試料を充填し、180-250ボルトで45分間実行した。ゲルをサランラップでラップし、-70℃の冷凍機内で補強スクリーンを持つXARフィルムに1時間から終夜露光させた。

30

【0193】

³²P-ハイブリダイゼーション

A. 凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを55℃のインキュベータに5分間配置して凝縮を減らした。スライドを蒸気フード内において4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、0. 5×SSCで5分間室温で洗浄した (25 ml 20×SSC + 975 ml SQ H₂O)。0. 5 µg/mlのプロテイナーゼK中で、37℃で10分間の脱タンパクの後 (250 mlの予備加熱RNase無しRNaseバッファー中に10 mg/mlストック12. 5 µl)、切片を0. 5×SSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。

40

B. パラフィン包埋切片の前処理

スライドを脱パラフィンし、SQ H₂O中に配置し、各々2×SSCに室温で5分間、2回洗い流した。切片を20 µg/mlのプロテイナーゼK (250 mlのRNase無しRNaseバッファー中に10 mg/mlを500 µl; 37℃、15分間) -ヒト胚、又は8×プロテイナーゼK (250 mlのRNaseバッファー中に100 µl、3

50

7℃、30分間)ーホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5×SSCでの洗い流し及び脱水は上記のように実施した。

C. プレハイブリダイゼーション

スライドをBoxバッファー(4×SSC、50%ホルムアミド)ー飽和濾紙を列にしたプラスチックボックスに並べた。

D. ハイブリダイゼーション

スライド当たり1.0×10⁶cpmのプロープ及び1.0μlのtRNA(50mg/mlストック)を95℃で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48μlのハイブリダイゼーションバッファーを添加した。ボルテックスの後、50μlの³²P混合物をスライド上のプレハイブリダイゼーション50μlに添加した。スライドを55℃で終夜インキュベートした。

10

E. 洗浄

洗浄は、2×10分間、2×SSC、EDTAで室温で実施し(400mlの20×SSC+16mlの0.25MEDTA、Vf=4L)、次いでRNaseA処理を37℃で30分間行った(250mlRNaseAバッファー中に10mg/mlを500μl=20μg/ml)。スライドを2×10分間、2×SSC、EDTAで室温において洗浄した。ストリンジェントな洗浄条件は次の通りである:55℃で2時間、0.1×SSC、EDTA(20mlの20×SSC+16mlのEDTA、Vf=4L)。

F. オリゴヌクレオチド

ここに開示した様々なDNA配列についてインサイト分析を実施した。これらの分析に用いたオリゴヌクレオチドは添付図に示した核酸(又はその相補鎖)に相補的であるように得られた。

20

G. 結果

TAT419に関して、試験した主な正常組織において弱い発現が観察されるか、又は観察可能な発現が見られなかった。これに対して、試験した主なヒトメラノーマ細胞および組織において、強い又は量的に再現性のあるTAT419発現が観察された。

【0194】

実施例3:癌性腫瘍におけるTATポリペプチドの発現上方制御を検出するためのマイクロアレイ分析

多くの場合何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、正常な相対物と比較して疾患組織に異なって発現する遺伝子の同定に有用である。核酸マイクロアレイを使用することによって、試験及びコントロール組織試料由来の試験及びコントロールmRNA試料を、cDNAプロープ生成のために逆転写し、標識する。次いでcDNAプロープを、固体支持体に固定化された核酸のアレイにハイブリダイズさせる。アレイの各部位の配列と位置がわかるようにアレイを構築する。例えば、特定の疾患状態において発現されることが知られている選択された遺伝子を、固体支持体にアレイすることができ、標識されたプロープと特定のアレイ部位とのハイブリッド形成は、そのプロープが由来する試料がその遺伝子を発現することを示す。試験(疾患組織)試料由来のプロープのハイブリッド形成シグナルが、コントロール(正常組織)試料由来のハイブリッド形成シグナルよりも大きい場合に、疾患組織に過剰発現する遺伝子又は複数の遺伝子が同定される。この結果の意味するところは、疾患組織に過剰発現するタンパク質が疾患状態の存在の診断マーカーとしてのみでなく、疾患状態の治療の治療標的としても有用だということである。

30

40

核酸ハイブリッド形成の方法論及びマイクロアレイ技術は当分野でよく知られている。本発明の例における、ハイブリッド形成及びプロープのための核酸の特異的調整、スライド、及びハイブリッド形成条件はすべて、2001年3月30日出願のPCT/US01/10482に詳述されており、出典明記によりこの明細書に援用する。

【0195】

本実施例では、異なる種類の組織由来の癌性腫瘍及び/又は非癌性ヒト組織に関連する遺伝子発現の上方制御について、様々なヒト組織から採取した癌性腫瘍を研究することにより、特定の癌性腫瘍に過剰発現するポリペプチドの同定を試みた。一部の実験では、(

50

多くの場合同一患者由来の) 同じ種類の組織の癌性ヒト腫瘍組織及び非癌性ヒト腫瘍組織を採取し、T A Tポリペプチドの発現について分析した。加えて、様々な異なるヒト腫瘍の任意のものから癌性ヒト腫瘍組織を採取し、肝臓、腎臓及び肺を含む上皮起源の非癌性ヒト組織をプールすることにより調製した「汎用性」上皮コントロール試料と比較した。プールした上皮組織から単離したm R N Aは、種々の異なる上皮組織由来の発現遺伝子産物の混合物を示し、よって上皮由来の腫瘍における遺伝子発現レベルを定量的に比較するための良好なネガティブコントロールとした。プールしたコントロール試料を用いたマイクロアレイハイブリッド形成実験は、2色分析に線形プロットを生成した。次いで、2色分析において生成された線の勾配を使用して、各実験の(試験: コントロール検出)比を標準化した。次いで様々な実験から導いた標準化比を比較して、遺伝子発現のクラスタリ

10

【0196】

本実験では、本明細書に開示するT A Tポリペプチドーコード化核酸配列由来の核酸プローブをマイクロアレイの形成に使用し、様々な腫瘍組織由来のR N Aをそれに対するハイブリッド形成に使用した。実験比に対する正規化した比に基づく値を「カットオフ比」と呼ぶ。このカットオフ比を超える値だけを有意な値とした。比の有意性は、各実験に関連するノイズ又はばらつきの量に基づいて推定されたが、対応する正常な組織及び／又はプールされた正常な上皮の汎用コントロールと比べ、腫瘍試料に相対的に過剰発現した候補遺伝子の同定には、一般に1.8〜2倍以上のカットオフ比を用いた。腫瘍試料の方に過剰発現したとして、このようにして同定される遺伝子の比は、2〜40倍以上であった。比較として行なわれた、同じR N Aがそれぞれの色に標識され、それ自体に対してハイブリダイズされているコントロール実験では、バックグラウンド以上のシグナルを有するほぼ全ての遺伝子について観察された比は1.8倍より有意に小さかった。これにより、1.8倍の比を超える実験上のノイズは極端に低いこと、及び1.8倍という比の変化又はこれより大きな比が観察される場合、分析及び比較される試料間において、実際に、検出可能且つ再現可能な発現の差異があると予想されることが示唆される。

20

【0197】

これらの実験のデータは、T A T 4 1 9ポリペプチドは、正常な対応するヒト組織ないし細胞及び／又はプールした正常上皮コントロール組織と比較して、ヒトメラノーマ腫瘍組織及び由来する細胞株において、有意に、検出可能且つ再現可能に過剰発現されることを示した。上記のように、これらデータは、本発明のT A T 4 1 9ポリペプチドは、ヒトの一又は複数の癌性腫瘍の存在についての診断用マーカーとして有用なだけでなく、T A T 4 1 9ポリペプチドを過剰発現するそれら癌性腫瘍の治療のための治療標的として役立つことを示す。

30

【0198】

実施例4: T A T 4 1 9ポリペプチドに結合する抗体の調製

この実施例は、T A T 4 1 9を特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

40

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。使用することができる免疫原には、精製T A T、T A Tを含む融合タンパク質、及び細胞表面上に組換えT A Tを発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が過度の実験を行うことなくなすことができる。

B a l b / c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したT A T免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をM P L-T D Mアジュバント(R i b i I m m u n o c h e m i c a l R e s e a r c h, H a m i l t o n, M T)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗T A T抗

50

体の検出のためのE L I S Aアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、T A Tの静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を（35%ポリエチレングリコールを用いて）、A T C Cから番号C R L 1 5 9 7で入手可能なP 3 X 6 3 A g U. 1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、H A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、T A Tに対する反応性についてのE L I S Aでスクリーニングされる。T A Tに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のB a l b / cマウスに腹腔内注入し、抗T A Tモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラボトルで生育させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【0199】

上記の技術を使用して、それぞれがT A T 4 1 9ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する別々の異なるハイブリドーマ細胞株を生成した。これらのハイブリドーマ株によって生産されるモノクローナル抗体は、周知かつ慣例的に用いられる技術、例えばウエスタンブロット、E L I S A分析、T A T 4 1 9ポリペプチドを発現している細胞のF A C S分類分析（細胞表面上にT A T 4 1 9ポリペプチドを発現するように形質移入された細胞、及びT A T 4 1 9ポリペプチドを発現する特定のヒトメラノーマ腫瘍細胞株の両方）及び／又は免疫組織化学分析を用いて、T A T 4 1 9ポリペプチドに結合することが示されている点において機能的である。

【0200】

実施例5：抗T A T 4 1 9ネズミ科モノクローナル抗体5 E 9の軽鎖及び重鎖（及び可変軽鎖及び可変重鎖）の分子クローニング

上記のように生成した抗T A T 4 1 9ネズミ科モノクローナル抗体の一つをここでは5 E 9と称する。この実施例は、ネズミ科抗T A T 4 1 9モノクローナル抗体5 E 9の可変領域をコードするc D N A分子の調製を示す。フォワードP C Rプライマーは、ネズミ科モノクローナル抗体5 E 9のV_L及びV_H領域のヌクレオチド配列の始まりをコードするm R N Aに対して特異的となるように設定した。フォワードプライマーは、最初の8～9のN末端アミノ酸に起こりうるコドンの多くがP C Rプライマーにハイブリダイズするように設定した。

抗T A T 4 1 9ネズミ科モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞は、上記のオリゴヌクレオチドプライマーと共に抗体m R N Aの供給源として用いた。Chomczynski and Sacchi 1987 Anal. Biochem.162:156に記載される手順を用いて、全R N Aを1×10⁸細胞から単離した。可変軽鎖（V_L）及び可変重鎖（V_H）ドメインは、上記の変性N末端プライマーと、種間で保存性の高い定常軽鎖（C L）及び定常重鎖ドメイン1（C H 1）内の領域にアニールするように設定したリバースプライマーとを用いたP T - P C Rにて増幅した。

【0201】

フォワードプライマーはV_LおよびV_H領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、L CおよびH Cリバースプライマーは、消化して、種間で保存性の高い定常軽鎖（C L）および定常重鎖ドメイン1（C H 1）内の領域にアニールさせた。挿入物のポリヌクレオチド配列は慣例的な配列決定法を用いて決定した。ネズミ科5 E 9モノクローナル抗体の完全長軽鎖（配列番号：3）及び完全長重鎖（配列番号：4）の配列をそれぞ

れ図3及び4に示す。ネズミ科5E9モノクローナル抗体のV_L（配列番号：5）及びV_H（配列番号：6）の配列をそれぞれ図3及び4に示す。これらアミノ酸配列の更なる特徴は、ネズミ科抗TAT419 5E9モノクローナル抗体の様々なCDR領域について以下のアミノ酸配列を示した。CDR-L1（KSSQSLLDSDGKTYLN、配列番号：7）、CDR-L2（LVSKLDS、配列番号：8）、CDR-L3（WQGTHFPYT；配列番号：9）、CDR-H1（GYTFTSYWMQ；配列番号：10）、CDR-H2（TIYPGDGDTSYAQKFKG；配列番号：11）、及びCDR-H3（WGYAYDIDN；配列番号：12）。

次いで、抗体軽鎖及び重鎖の増幅したV_L及びV_HのcDNAをpRK哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングした。(Shields et al 2000 J. Biol. Chem.276:659-604)。増幅した可変軽鎖V_L cDNAは、EcoRV及びKpnIの部位を用いてヒトκ定常ドメインを含むpRK哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングした(pRK.LPG3.HumanKappa；Genentech, South San Francisco, CA)。増幅した可変重鎖V_H cDNAは、BsiWI及びApaIの部位を用いて、完全長ヒトIgG1定常ドメインをコードするpRK哺乳動物細胞発現ベクター(pRK.LPG4.HumanHC；Genentech)に挿入した。

【0202】

実施例6：免疫組織化学分析

TAT419に対する抗体を上述のように調製し、以下のように免疫組織化学分析に用いた。まず組織切片をアセトン／エタノール（凍結又はパラフィン包埋）中で5分間固定した。次いで切片をPBSで洗浄し、その後アビジン及びビオチン（Vector Kit）でそれぞれ10分間遮断した後、PBSで洗浄した。次いで切片を10%の血清で20分間遮断し、その後ブロッキングにより過剰量を取り除いた。その後切片に10μg/mlの濃度で1時間にわたり一次抗体を添加し、その後PBSで洗浄した。次いでビオチン標識した二次抗体（抗一次抗体）を切片に添加して30分置き、その後切片をPBSで洗浄した。次に切片をVector ABCキットの試薬に30分間曝し、その後PBSで洗浄した。さらに切片をジアミノベンジジン（Pierce）に5分間曝し、その後PBSで洗浄した。次いでMayer'sのヘマトキシリンを用いて切片を対比染色し、カバーガラスで覆って可視化した。また、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989及びAusubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley及びSons (1997)に記載のようにして、免疫組織化学分析を行うこともできる。

これらの分析の結果、この分析に用いたモノクローナル抗体は、試験したすべての個々の原発性ヒトメラノーマ癌試料のおよそ90%に観察可能なTAT419発現が見られた。このうち、およそ65%は中程度（2+）から高い（3+）TAT419ポリペプチド発現を示した。

【0203】

実施例7：ネズミ科モノクローナル抗体のヒト化

この実施例はネズミ科抗体5E9をTAT419に対してヒト化する方法の適用性を示す。

TAT419の細胞外ドメインが大腸菌（非グリコシル化）で及びCHOで（グリコシル化）イムノアドヘシン（Fc融合）として発現され、定法で精製された。抗体5E9を発現するネズミ科ハイブリドーマは、大腸菌由来の組換えTAT419細胞外ドメインでマウスを免疫して得られ、ELISAによりTAT419コートプレートへの結合能により同定した。

【0204】

ネズミ科5E9可変ドメインのクローニング

全RNAを標準的な方法を用いて5E9を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖（V_L）及び可変重鎖（V_H）ドメインは、重鎖及び軽鎖に対する変性プライマーを用いたRT-PCRにより増幅した。フォワードプライマーはV_LおよびV_H領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、LCおよびHCリバースプライマーは、消化して、種間で保存性の高い定常軽鎖（C_L）および定常重鎖ドメイン1（C_H1）内の

領域にアニールさせた。挿入物のポリヌクレオチド配列は慣例的な配列決定法を用いて決定した。

【0205】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワークへの直接高頻度可変領域移植

この作業に用いたファジミドは一価性 Fab-g 3 ディスプレイベクターであって、単一 phoA プロモーターの制御下の2つのオープンリーディングフレームからなる。第一オープンリーディングフレームは、stII シグナル配列とそれに融合したアクセプター軽鎖のVL及びCH1ドメインからなり、第二オープンリーディングフレームは、stII シグナル配列とそれに融合したアクセプター重鎖のVH及びCH1ドメインと、それに続くマイナーファージコートタンパク質P3からなる。

ネズミ科5E9のVL及びVHドメインを、ヒトVLκI(huKI)及び、ヒトVHサブグループIII(huIII)のコンセンサス配列と配列比較した。CDR移植片を作製するために、5E9の高頻度可変領域を、huKI及びhuIIIコンセンサスアクセプターフレームワークに移植し、「5E9-移植片」、直接的CDR移植片を生成した。VLドメインでは、以下の領域：24-34(L1)、50-56(L2)および89-97(L3)を、ヒトコンセンサスアクセプターに移植した。VHドメインでは、26-35(H1)、49-65(H2)及び93-102(H3)を移植した。MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))は抗体及び抗原の複合体結晶構造を解析し、重鎖の位置49及び93がコンタクト領域の一部であることを見いだしたので、抗体をヒト化する場合に、これらの位置をCDR-H2及びCDR-H3の定義に含めることは合理的であるようだ。

「5E9移植片」は、各高頻度可変領域について別個のオリゴヌクレオチドを用いて、LC及びHC発現ベクターのキュンケル突然変異誘発によってIgGとして生成した。親和性又は安定性を増加させるアミノ酸の改変もまたキュンケル突然変異誘発を用いて行なった。正しいクローンはDNA配列決定法によって識別した。

【0206】

高頻度可変領域のランダム化

ネズミ科の高頻度可変領域配列に対するバイアスを維持するソフトランダム化法を用いて、5E9移植片の各々の高頻度可変領域に、配列多様性を別々に導入した。これは、Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)に最初に記載されたポイズン(poisoned)オリゴヌクレオチド合成方策を用いて達成された。変異させる高頻度可変領域内の所定の位置について、野生型のアミノ酸をコードするコドン、各々の位置について平均50%の変異率となるように70-10-10-10のヌクレオチド混合物でポイズン化した。

ソフトランダム化オリゴヌクレオチドは、ネズミ科高頻度可変領域配列にならって作製され、直接高頻度可変領域移植によって定められる同じ領域を包含した。VHドメインのH2の初めのアミノ酸位(位置49)は、コドンRGCを用いてA、G、S又はTに配列多様性を限定した。

野生型CDR移植配列の再選択を避けるために、停止コドン(TAA)をキュンケル突然変異誘発によって5E9移植片の各CDRの中央に導入し、異なるCDR内に停止コドンが導入された6つの異なる鋳型を得た。ランダム化されたオリゴヌクレオチドを用いて、多様性を導入すると同時に対応する鋳型内の停止コドンを修復した。

【0207】

ファージライブラリの生成

上述の各々の高頻度可変領域に多様性を導入するように設定したランダム化オリゴヌクレオチドプールを、660ng オリゴヌクレオチド、50mM トリスpH7.5、10mM MgCl₂、1mM ATP、20mM DTT及び、5Uポリヌクレオチドキナーゼを含む20μlの反応溶液中で、37℃で1時間かけて別々にリン酸化した。

単一のCDR内に多様性を導入するための各リン酸化オリゴヌクレオチドプールを、対応する停止コドンを含有する20μgのキュンケル鋳型と混合した。反応は、鋳型に対す

るオリゴヌクレオチドの比が3となるように、終容量500 μ lの50mM トリスpH 7.5、10mM $MgCl_2$ 中で行った。混合物は、90℃で4分間、50℃で5分間アニーリングし、その後氷上で冷ました。次いで、アニールした鋳型(250 μ l)を、1 μ lの100mM ATP、10 μ lの25mM dNTP(dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを各々25mM)、15 μ lの100mM DTT、25 μ lの10 $\times$ TMバッファ(0.5M トリス pH7.5、0.1M $MgCl_2$)、2400UのT4リガーゼ、及び30UのT7ポリメラーゼを添加して充填し、室温に3時間置いた。Sidhu等, Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)に記載されるように、充填された生成物を精製し、SSS20細胞に電気穿孔して、M13/KO7ヘルパーファージ存在下にて増殖させた。ライブラリサイズは、1~2 $\times$ 10⁹の別々のクローンとした。開始ライブラリからのランダムなクローンを配列決定し、ライブラリの質を評価した。

10

【0208】

ファージ選別

ファージ選別のために、CHO由来TAT419細胞外ドメイン(2 μ g/ml)をPBSにてMaxisorpマイクロタイタープレート(Nunc)上に4℃で終夜をかけて固定した。プレートはカゼインブロッカー(Pierce)を用いて少なくとも1時間ブロックした。ファージを培養液上清から回収し、0.5%BSA及び0.05%Tween 20を含有するPBS(PBSBT)に懸濁した。ファージ選別後、マイクロタイターウェルは、0.05%Tween 20を含有するPBS(PBSBT)にて広範に洗浄し、結合したファージを、ウェルを100mM HClにて30分間インキュベートすることによって溶出した。ファージは、1M トリスpH8にて中和して、XL1-ブルー細胞及びM13/KO7ヘルパーファージを用いて増幅させ、2YT、50 μ g/mlカルバネシリン中で37℃で終夜生育させた。標的含有ウェルから溶出したファージの力価を、非標的含有ウェルから回収したファージの力価と比較して、濃縮を評価した。

20

【0209】

Fab及びIgG産生

親和性測定のためにFabタンパク質を発現させるため、停止コドン、ファージディスプレイベクターの重鎖とg3の間に導入した。クローンを大腸菌34B8細胞内に形質転換して、完全C.R.A.P.培地中で30℃で生育させた(Presta等 Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。細胞を遠心分離によって回収して、PBS、100 μ M PMSF、100 μ M ベンズアミジン、2.5mM EDTAに懸濁して、マイクロフルイダイザーを用いて破壊した。FabはプロテインGアフィニティクロマトグラフィーにて精製した。

30

スクリーニングの目的のために、IgG変異体は最初に293細胞中で産生した。VLおよびVH(25 μ g)をコードするベクターは、FuGeneシステムを使用して293細胞にトランスフェクトした。500 μ lのFuGeneはFBSを含まないDMEM培地の4.5mlと混合し、室温で5分間インキュベートした。各鎖(25 μ g)をこの混合物に添加し、室温で20分間インキュベートし、ついで5本のT150フラスコへ移し5%CO₂中で37℃で一晩トランスフェクトした。翌日、トランスフェクション混合物を含む培地を除去し、0.1ml/L 微量元素(A0934)と10mg/L インスリン(A0940)を含むPS04培地 23mlと置換する。細胞は更に5日間インキュベートし、その後培地は5分間、1000rpmにて回収し、0.22 μ mの低タンパク質結合フィルターを用いて無菌濾過した。試料は、125mlの培地毎に2.5mlの0.1% PMSFを添加した後に、4℃で貯蔵することが可能であった。IgGはプロテインG親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。

40

【0210】

親和性決定

親和性の決定はスキッチャード分析及びBIAcoreTM-2000又はA100を用いた表面プラズモン共鳴により行った。

【0211】

Biacore 2000

50

TAT419細胞外ドメイン（グリコシル化）は固定化され（CM5センサーチップ上で10mM酢酸ナトリウム、pH4.8中、約100-400RU）、5E9抗体変異体が検体として働いた（PBST中で4から1000nMの2倍の段階希釈物を使用して、流量30μL/分で注入）。各試料は4分間の会合及び10分間の解離で分析した。各々の注入後、チップは10mMグリシンpH1.7を使って再生させた。

【0212】

結果及び検討

ヒト化に使用したヒトアクセプターフレームワークはコンセンサスヒトカップIのVLドメイン、及びコンセンサスヒトサブグループIIIのVHドメインに基づく。5E9のVL及びVHドメインは、ヒトカップI及びサブグループIIIドメインと整列させ、それぞれの相補性決定領域（CDR）が同定され、ヒトアクセプターフレームワークに移植して、IgG抗体（5E9-グラフト）として発現されうるCDRグラフトを生成した。

5E9-グラフトの各CDRに別々に多様性を導入し、CHO由来のTAT419細胞外ドメインに対してパニングしたFabディスプレイライブラリを生成した。第2ラウンドの後に、6つすべてのライブラリに濃縮が観察された。ラウンド6の後、DNA配列分析のために各ライブラリからクローンをピックアップし、6つのCDR各々で標的とした配列変化を確認した。ライブラリから同定された配列変化は、結合が改善された変異体となる変化を表しているかもしれないし、又は単にTAT419細胞外ドメイン結合に対して影響しない位置でのアミノ酸変化を示すかもしれない。

様々な選択クローンがFabとして発現され、BiacoreによってTAT419細胞外ドメインへの結合について特徴付けられた。すべてのクローンが細胞の表面上のTAT419に結合し、ほとんどのクローンが5E9-グラフトと比較して顕著に改善した親和性を持って結合した。

図5に示す完全長軽鎖アミノ酸配列（配列番号：13）、図6に示す完全長重鎖アミノ酸配列（配列番号：14）、図5に示すVLアミノ酸配列（配列番号：15）、及び図6に示すVHアミノ酸配列（配列番号：16）を有する、ここでhu5E9.v1と称するヒト化抗TAT419抗体は、ネズミ科5E9よりも高い親和性で細胞の表面上のTAT419に結合することが示され、更なる開発のためのリード候補として選択した。hu5E9.v1の様々なCDR配列は以下の通りである。CDR-L1（KSSQSLLSDSGKTYLN、配列番号：7）、CDR-L2（LVSKLDS、配列番号：8）、CDR-L3（WQGTHTFPYT、配列番号：9）、CDR-H1（GYTFTSYWMQ、配列番号：10）、CDR-H2（TIYPGDGTSYAQKFKG、配列番号：11）、及びCDR-H3（WGYAYDIDN、配列番号：12）。

また、hu5E9.v1と同じVL配列（配列番号：15）と図7に示すVHアミノ酸配列（配列番号：17）とを有する、ここでhu5E9.v2と称する第二のヒト化抗TAT419抗体も同定された。

【0213】

実施例8：結合分析とTAT419エピトープマッピング

ファルマシア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、室温で、様々な抗TAT419抗体の結合親和性を測定することができる（例としてMorton et al, (1998) Methods in Enzymology 295: 268-294）。様々な抗TAT419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。0.025M N-ヒドロキシスクシンイミド及び0.1M 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20mlを5ml/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。10mM酢酸ナトリウム、pH4.5中に10mg/mlの抗TAT419抗体を含む溶液5~10mlを5ml/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、20mlの1Mエタノールアミン（pH8.5）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。動態学的な測定値のために、ランニングバッファにて2倍に段階希釈した様々な抗TAT419抗体を、フローセルに対して30ml/分の流量で3分間注入し、結合した材料を20分間解離

させた。20 ml 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、固定した抗体を持たないフローセル 1 を対照セルとして用いた。フローセル 1 に対する物質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)。

【0214】

様々なモノクローナル抗体に結合した TAT419 エピトープを、標準的な競合的結合分析により決定した(Fendly等 Cancer Research 50:1550-1558(1990))。交差阻害研究は、蛍光を定量化する PANDExTM スクリーン機を用いて、TAT419 を発現するよう

10

に操作したインタクト細胞上で直接蛍光検定することにより、抗体で実施される。それぞれのモノクローナル抗体は、確立した方法(Wofsyら Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi(eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980))を用いて、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)とコンジュゲートした。TAT419 発現細胞の集密的な(コンフルエントな)単層を、トリプシン処理し、1 回洗浄し、0.5% ウシ血清アルブミン(BSA)及び 0.1% NaN₃ を含有する冷却 PBS 中に、 1.75×10^6 細胞/ml で再懸濁した。終濃度 1% のラテックス粒子(IDC, Portland, OR)を PANDExTM プレート膜の目詰まりを減少させるために追加した。懸濁液中の細胞、20 μ l、及び 20 μ l の精製モノクローナル抗体(100 μ g/ml から 0.1 μ g/ml)を PANDExTM プレートのウェルに加え、30 分間氷上でインキュベートした。FITC 標識モノクローナル抗体の所定希釈物 20 μ L を各ウェルに加え、30 分間インキュベートし、洗浄し、蛍光を PANDExTM スクリーン機にて定量した。モノクローナル抗体は、それぞれが第二のモノクローナル抗体と同等にその結合をブロックした場合にのみエピトープを共有するとみなした。この実験では、ここで 5E9 及び 3C3 と称するネズミ科モノクローナル抗体を、細胞表面発現 TAT419 ポリペプチド上の異なるエピトープに割り当てた。このアッセイを使用して、当業者は、上記のエピトープと同じエピトープと結合する他のモノクローナル抗体を同定することができる。

20

また、結合分析を行って、エピトープのおよその位置を同定した。様々な TAT419 由来のペプチド変異体が 293 細胞に発現された。ここに記載の様々なネズミ科抗 TAT419 モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。これら分析の結果は、5E9 ネズミ科抗 TAT419 抗体は完全長 TAT419 ポリペプチドを発現する 293 細胞を認識して、結合したのに対して、第二の異なるネズミ科抗 TAT419 モノクローナル抗体はその N 末端部分が欠失している TAT419 ポリペプチドを発現する 293 細胞を認識せず結合もしなかったことを示した。このことは、2 つの異なる別々のエピトープが同定されたことを示唆する。

30

【0215】

より具体的には、ここで試験したあるネズミ科抗 TAT419 モノクローナル抗体は、ここで配列番号：2 として示す TAT419 配列の 27 番目と 64 番目の間に位置するエピトープ(又は複数のエピトープ)に結合することが示された。さらに、他のネズミ科抗 TAT419 モノクローナル抗体(ネズミ科 5E9 モノクローナル抗体、及びその様々なヒト化バージョンを含む)は、ここで配列番号：2 として示す TAT419 ポリペプチド配列の 65 番目と 101 番目の間に位置するエピトープ(又は複数のエピトープ)に結合することが示された。

40

【0216】

実施例 9：TAT419 ポリペプチドを発現する細胞によって内部移行される抗 TAT419 抗体

抗 TAT419 抗体の細胞内部移行を、その表面上に TAT419 を発現する細胞によって調査した。TAT419 に結合される抗体の運命を調査するために、TAT419 発現メラノーマ細胞株の試料を、様々な抗 TAT419 抗体と共に氷上で 1 時間インキュベートし、次いで第二抗体による染色のために固定した。第二抗体は、試験した 5E9 ネズ

50

ミ科モノクローナル抗体及び他の抗TAT419ネズミ科モノクローナル抗体のためには抗ネズミ科Cy3、又は、ネズミ科モノクローナル抗体のキメラバージョンのためには抗ヒトCy3のいずれかとした。逆重畳（デコンボリューション）顕微鏡を用いたTAT419発現細胞に、ネズミ科モノクローナル抗体によってプラズマメンブランの有意な染色が観察された。これは抗体－細胞表面タンパク質複合体が形成されたことを示す。

続く方法については、Polson et al., Blood 110(2):616-23 (2007)の618頁の「Internalization studies」を参照のこと。逆重畳顕微鏡（拡大率60倍）を用いて可視化した場合、免疫蛍光法は細胞表面染色と内部移行を示した。TAT419を発現しないコントロール細胞はプラズマメンブラン染色を示さなかった。これらの所見を、1時間氷上に置いた後に37℃に2時間置いた細胞と比較した。TAT419発現細胞とネズミ科5E9及び3C3抗TAT419抗体を用いた場合に顕著なプラズマメンブラン染色と細胞内部染色が観察された。これは、抗体－細胞表面タンパク質複合体の細胞への輸送を示す。終夜インキュベートした後に、更なる抗体／TAT419複合体の取り込みが観察された。

4℃で1時間インキュベートして5E9によるプラズマメンブラン染色を行い、次いで、細胞を固定して、二次抗体「Cy3マウス」にて処理した。37℃で2時間又は終夜インキュベートし、その後固定し、二次抗体にて処理した後に、内部移行が観察された。

8ウェルのチャンバースライド(Nalge Nunc Intl.)に細胞を播き（およそ100,000細胞／ウェル）、37℃／5%CO₂で24～48時間インキュベートした。成長培地に、2～5μg/mlの抗TAT419抗体を添加し、プロテアーゼインヒビター（50μg/mlロイペプチド及び5μg/mlペプスタチン）と共に終夜又は2時間培養した。これらのプロテアーゼインヒビターは、一次抗体の分解を妨げ、リソソーム中での抗体の検出を可能とする。生体標識（live labelling）のために、細胞を抗体と共に室温で45分間インキュベートした。次いで、すべての細胞を洗浄し、3%ホルムアルデヒドに10分かけて固定し、0.05%サポリンにて5～10分かけて透過処理し、非特異的抗体結合部位をPBS＋1%BSAにて室温で20分かけてブロックした。次いで、細胞をAlexa-488 (Molecular Probes)にて標識した二次抗体と共に37℃で1時間インキュベートし、洗浄し、次いでチャンバーインサートを取り除いて、ガラススライドを細胞に曝した。スライドは、VectaShieldにDAPIをアプライして核を標識することによりマウントし(Vector Laboratories)、次いで、カバーガラス下に置き、透明な爪光沢剤にて封入した。

これらの分析の結果は、ここに記載の様々な抗TAT419抗体（ネズミ科5E9モノクローナル抗体、その様々なヒト化バージョンを含む）が生きている細胞の表面上のTAT419ポリペプチドに結合し、細胞内にすぐさま内部移行し、細胞に抗体を添加して20時間以内には細胞のリソソームに位置することを示した。よって、ここに記載の抗TAT419抗体は、TAT419ポリペプチドを発現する腫瘍に対する毒素コンジュゲート腫瘍治療の優れた候補である。

【0217】

実施例10：TAT419に結合する、毒素をコンジュゲートした抗体の調整

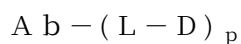
細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療において腫瘍細胞を殺すか又は阻害するための薬剤の局所運搬に抗体－薬剤コンジュゲート（ADC）、つまり免疫複合体を用いると(Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos及びEpenetos (1999) Anti cancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz及びSpringer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となり、この非コンジ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 (Mar. 15, 1986):pp603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pincheraら (ed.s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果が求められる。ADCを設定して精製するために、モノクローナル抗体(mAb)の選択性並びに薬剤結合特性及び薬剤放出特性に注目した。ポリ

クローナル抗体及びモノクローナル抗体は共に、この方策に有用であるとして報告されている(Rowland等、(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は含まれる(Rowland等、(1986)、上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリヤ毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) *J. 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等、(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)などの小分子毒素が含まれる。

10

【0218】

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：



を有する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。

20

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(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「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。

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(af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。

30

【0219】

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末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、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、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アルヒドラジド基は、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。

40

50

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。

【0220】

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ン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; 米国特許第 5 3 6 2 8 5 2 号)。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。

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。

【0221】

毒素を精製した抗体に連結することによって抗体-薬剤コンジュゲートを生産するための技術には周知のものがあり、当分野で慣例的に用いられる。例えば、毒素DM1への精製されたモノクローナル抗体のコンジュゲートは、以下の通りに達成されうる。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、反応混合物を、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-SPP-Py(337.0 mg、解放可能な2-チオピリジン基を有する)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、16.1モル)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×90.0 cm、1.77 L)に流す。流速は5.0 mL/分、65の分画(各々20.0 mL)を回収する。分画をプールし、分析した。この分析において、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する。

【0222】

また、例示として、毒素DM1への精製されたモノクローナル抗体のコンジュゲートは、以下の通りに達成されうる。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。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時間攪拌した後に、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。次いで、抗体-SMCCを、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を含むジメチルアセトアミド溶液(1.7等量、5 SMCC/抗体と推定)にて反応させる。反応は、16.5時間、室温、アルゴン下にて攪拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、pH 6.5の1×PBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5×4.9cm)に濾過する。次いで、DM1/抗体の比(p)を252nmと280nmの吸光度にて測定する。

さらに、選択した抗体の遊離システインを、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10mMの濃度になるまで溶解して、およそ1.6mg/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時間反応させることによって達成される。過剰なBM(PEO)4は、30mM クエン酸塩、pH 6と150mM NaClバッファによるゲル濾過にて除去した。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でゲル濾過又は透析を行って反応していない薬剤を取り除く。PBS中の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コンジュゲートに供給する。

【0223】

典型的に、細胞毒性剤は、抗体の多数になりうるリジン残基により抗体にコンジュゲートされている。対象の抗体に存在するか、又は対象の抗体中に操作したチオール基によるコンジュゲートもまた達成されている。例えば、システイン残基は遺伝子工学技術によってタンパク質内に導入されて、リガンドの共有結合的付着部位を形成している(Better等(1994) J. Biol. Chem. 13:9644 9650; Bernhard等(1994) Bioconjugate Chem. 5:126 132; Greenwood等(1994) Therapeutic Immunology 1:247 255; Tu等(1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862 4867; Kanno等(2000) J. of Biotechnology, 76:207 214; Chmura等(2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15): 8480 8484; 米国特許第6248564号)。一旦遊離システイン残基が対象の抗体の中に存在すると、毒素はその部位に連結されうる。例えば、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、マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンF(MMAF)、すなわちMC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE又はMC-val-cit-PAB-MMAF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、冷やしたシステイン誘導体化抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水(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、毒素コンジュゲート抗体を精製して、PBS中のG25樹脂による溶出によって脱塩して、無菌条件下で0.2mのフィルターにて濾過して、保存のために凍結した。

【0224】

さらに、本発明の抗TAT419抗体は、以下の技術を用いてアウリスタチン及びドロスタチン毒素(例えばMMAE及びMMAF)にコンジュゲートされうる。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

100 mM ジチオトレイトール(DTT)で処理した。37℃でおよそ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、1 mM DTPAを含むPBSにて溶出した。溶液の280 nmの吸光度とDTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて412 nmの吸光度の測定によるチオール濃度から、還元した抗体濃度を決定することによって、チオール/A b値を調べる。PBSに溶解した還元型抗体を氷上で冷やす。

薬剤リンカー試薬である(1)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、(2)MC-MMAF、(3)MC-val-cit-PAB-MMAE又は(4)MC-val-cit-PAB-MMAF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、冷やした還元型抗体を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、コンジュゲートした抗体を精製して、PBS中のG25樹脂による溶出によって脱塩して、無菌条件下で0.2 mのフィルターにて濾過して、保存のために凍結した。

【0225】

ここに記載の毒素コンジュゲート抗TAT419抗体は、記載したように調製し、標準的なFACS分析を用いて試験し、毒素へのコンジュゲートが、TAT419発現細胞の表面上のTAT419ポリペプチドに結合する抗体の能力に影響したか否かを決定した。これらの分析の結果は、抗体の毒素へのコンジュゲートにより、TAT419ポリペプチドへの結合の欠失は観察されなかったことを示した。

【0226】

実施例11：インビトロでの腫瘍細胞死滅アッセイ

対象のTAT419ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を、標準的な発現ベクター及びクローニング技術を使用して得てよい。あるいは、対象のTAT419ポリペプチドを発現する多くの腫瘍細胞株は、例えばATCCから公的に入手可能であり、標準的なELISA又はFACS分析法を使用して常套的に同定することができる。ついで抗TAT419ポリペプチドモノクローナル抗体（及びその毒素コンジュゲート誘導体）をアッセイに用いて、TAT419ポリペプチド発現細胞を死滅させるインビトロでの抗体の能力を定量してよい。

例えば、対象のTAT419ポリペプチドを発現する細胞を上述のようにして得て、96ウェルの皿に蒔く。一分析例では、抗体/毒素コンジュゲート（又はネイキッド抗体）を4日間の細胞インキュベーションの間、含ませる。第二の別の分析例では、細胞を抗体/毒素コンジュゲート（又はネイキッド抗体）と共に1時間インキュベートし、ついで洗浄して、4日間、抗体/毒素コンジュゲートの不存在下でインキュベートする。さらに他の別の分析例では、細胞表面上にTAT419ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作した細胞（及びTAT419ポリペプチドを発現しないコントロール細胞）を、毒素コンジュゲート抗TAT419抗体にて処理し、比較した。ついで、細胞生存率を、PromegaのCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（カタログ番号G7571）を使用して測定する。未処理細胞をネガティブコントロールとした。

【0227】

第一の実験では、特に本発明に関し、特定の抗TAT419抗体（ネズミ科5E9ネズミ科モノクローナル及びhu5E9.v1及びhu5E9.v2ヒト化バージョンを含む）の、様々な濃度のADC MC-vc-PAB-MMAE毒素コンジュゲートを、TAT419ポリペプチド発現メラノーマ細胞株、526mel、537mel、888mel、928mel、1300mel、A375、A2058、COLO829、G361、Hs-294-T、Malme3m、SK23、SKmel5、SKmel5-RC、SKmel28、WM-266-4、UACC257、及びUACC257-NCI60に結合し、死滅させる能力について試験した。より具体的には、TAT419発現細胞を、PBS（ネガティブコントロール）、TAT419ポリペプチドに結合しないコントロール抗体のMC-vc-PAB-MMAE毒素コンジュゲート（ネガティブコントロール

）、又は抗TAT419-MC-vc-PAB-MMAE毒素コンジュゲート抗体のいずれかにてインビトロで処理した。これらの分析の結果は、試験したすべての毒素コンジュゲート抗TAT419抗体（5E9、hu5E9.v1及びhu5E9.v2を含む）は、細胞表面上にTAT419ポリペプチドを発現する細胞のTAT419標的特異的細胞死滅を有意に誘導することができるのに対して、いずれのネガティブコントロールにも特異的な細胞死滅は観察されなかったことを示した。

この試験の結果の例示として、UACC257X2.2細胞（その細胞表面上にTAT419ポリペプチドを発現する）を、様々な濃度のPBS、TAT419ポリペプチドに結合しないコントロール抗体のMC-vc-PAB-MMAE毒素コンジュゲート（Ctrl-vc-MMAE）、及び上記の5E9-MC-vc-PAB-MMAE毒素コンジュゲート抗体（5E9-vc-MMAE）のいずれかにてインビトロで処理した。これらの分析のデータを図8に示し、5E9-vc-MMAE毒素コンジュゲート抗体がその細胞の表面のTAT419を発現する細胞を死滅することができることを示す。細胞表面上に異なる量のTAT419ポリペプチドを発現する異なる細胞株により得られた比較データは、細胞死滅の効果は細胞表面上でのTAT419の発現量に比例していることを示す。

10

これらのデータは、これらのアッセイに用いた様々な抗TAT419抗体（5E9、hu5E9.v1及びhu5E9.v2を含む）は、細胞表面上のTAT419ポリペプチドへ結合し、抗体が結合した細胞の死を誘導することができることを示す。

【0228】

20

実施例12：インビボでの腫瘍細胞死滅アッセイ 腹腔内ヒト異種移植片腫瘍モデル

抗体-薬剤コンジュゲートのインビボ効力は、移植ヒト腫瘍（異種移植片という）を持つNCRヌードマウスの処置により測定することができる。これらの試験は、腫瘍試料を移植することによってマウスに播種したヒト腫瘍及びヒトメラノーマ細胞株を用いた。この試験では、メラノーマ腫瘍（およそ100～200mm³）を持つ、1群あたり10匹のマウスに、3mg/kgの用量を尾静脈からIV処置し、3週間目に再度処置した。腫瘍の測定は試験期間中に行い、腫瘍試料を採取し、「Ta q M a n (登録商標)」分析並びに組織学的試験のためにホルマリン固定又はsnap凍結した。

ヒトメラノーマ細胞株とヌードマウスでの連続継代された腫瘍及びヒトメラノーマ細胞株を皮下に移植し、試験中成長を測定した。腫瘍が適当なサイズに達したら、マウスの処置群に抗体-薬剤コンジュゲートを投薬する。ベヒクルコントロール又はコントロール抗体と比較した異種移植片腫瘍増殖の遅延は、効果の特徴である。概して、これらの結果は、インビボ腫瘍増殖モデルにおける抗TAT419薬剤コンジュゲートの特異性と有効性を示す。腫瘍体積は、注入後0、2、7、10、13、17、20、24及び27日後に各マウスで測定し、腫瘍体積の低減における各処置の効果を測定した。さらに、処置後およそ30日にわたって毎日%動物生存率を測定した。

30

これらのインビボ分析の結果は、ベヒクル単独又は非TAT419特異的毒素コンジュゲート抗体にて処置したマウスは処置後の腫瘍増殖の観察可能な低減をほとんど示さなかったことを示す。この結果は、TAT419ポリペプチドに結合しない抗体は、たとえ毒素とコンジュゲートしていても、特異的な（又は非特異的な）治療効果を示さないことを示す。それに対して、vc-MMAE-コンジュゲート抗TAT419抗体（5E9、hu5E9.v1及びhu5E9.v2を含む）にて処置した場合、試験群のほとんどの動物は処置後に腫瘍増殖の有意かつ明らかな再生可能な低減を示した。これは、抗TAT419抗体薬剤コンジュゲートは、TAT419ポリペプチドを発現する腫瘍を有する動物に特異的なインビボ治療効果を示すことを示す。

40

より具体的には、図9は、hu5E9.v1ヒト化抗体のvc-MMAEコンジュゲートのインビボ治療効果を分析した実験から得られたデータを示す。UACC257X2.2ヒトメラノーマ細胞株（細胞表面上にTAT419ポリペプチドを発現する細胞）由来の異種移植片を上記のようにヌードマウス内で増殖させ、次いで、上記のように、ベヒクル単独、TAT419ポリペプチドに結合しないMMAE-コンジュゲートコントロール

50

抗体、又は様々な量の h u 5 E 9 . v 1 - v c - M M A E にてマウスを処置した。これらの分析のデータは、h u 5 E 9 . v 1 - v c - M M A E 毒素コンジュゲート抗体がその細胞の表面の T A T 4 1 9 を発現する細胞を死滅することができることを示す。他のデータも、他の毒素コンジュゲート抗 T A T 4 1 9 抗体（5 E 9 及び h u 5 E 9 . v 2 を含む）が、標的特異性及び用量依存様式で、多くの異なる T A T 4 1 9 発現メラノーマ細胞株由来のヌードマウス内の異種移植片腫瘍の増殖を抑制することができたことを示した。

このデータは、明らかに、抗 T A T 4 1 9 抗体-薬剤コンジュゲートが、T A T 4 1 9 ポリペプチドを発現する腫瘍の治療のために特異的、有意且つ再生可能なインビボ治療効果を示すことを示す。

【0229】

10

上記の明細書は、当業者が本発明を実施するために十分であると考えられる。寄託した実施物は、本発明のある態様の一つの例示を意図し、機能的に等価なあらゆる構築物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された構築物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の態様の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に請求の範囲が制限されるものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、先の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

【図 1】

GCATCTGGTTTGTTCAGATCCGAGAGGCTCTGAACTGCGGAGCGGCCACCGACGCTTCTGGA
GCAGGTAGCAGC**ATGC**AGCCGCTCCAAAGTCTGTGCGGACGCGCCCTGGTTGCGCTGGTTCTTG
CCTGCGGCTGTGCGGATCTGGGAGAGGAGAGGCTTCCCGCTGACAGGGCCACTCCGCT
TTTGCAAAACCGCAGAGATAATGACGCCACCCACTAAGACCTTATGGCCCAAGGGTTCCAAAGCC
AGTCTGGCGCGCTGGTGGCACCTGCGGAGGTGCCTAAAGGAGACAGGACGGCAGGATCTCCGC
CACGCACCATCTCCCTCCCGCTGCCAAGGACCCATCGAGATCAAGGAGACTTCAATACAT
CAACACGGTTGTGCTGCTGCTGTGCTGCTGGGATCATCGGAACTCCACACTTCTGAGA
ATTATCTACAAGAACAGTGCATGCGAAACGGTCCCAATATCTTGATCGCCAGCTTGGCTCTGG
GAGACCTGCTGCACATCGTCATTGACATCCCTATCAATGTCTACAAGCTGCTGGCAGAGGACTG
GCCATTTGGAGCTGAGATGTGAAGCTGGTGCCTTTCATACAGAAAGCCTCCGTGGGAATCACT
GTGCTGAGTCTATGTGCTCTGAGTATTGACAGATATCGAGCTGTGCTTCTTGAGTAGAATTA
AAGGAATTGGGGTTCCAAATGGACAGCAGTAGAAATGTTTGGATTGGGTGGTCTCTGTTGGT
TCTGGCTGTCCCTGAAGCCATAGGTTTTGATATAATTACGATGGACTACAAGGAAGTTATCTG
CGAATCTGCTTCTCATCCCGTTCAGAAGACAGCTTTCATGCAGTTTACAAGACAGCAAAAG
ATTGGTGGCTGTTCAAGTTTCTATTCTGCTTGGCATGGCCATCACTGCATTTTTTATACACT
AATGACCTGTGAAATGTTGAGAAAGAAAGTGGCATGCGAGATTGCTTTAAATGATCACCTAAAG
CAGAGACGGGAAGTGGCCAAACCGTCTTTTGCCTGGTCTTGTCTTTGCCCTGCTGGCTTC
CCCTTCACCTCAGCAGGATTCTGAAGCTCACTCTTTATAATCAGAATGATCCCAATAGATGTGA
ACTTTTGAGCTTTCTGTTGGTATTGGACTATATTGGTATCAACATGGCTTCACTGAATTCCTGC
ATTAACCCAAATTGCTCTGTATTGGTGGAGCAAAAGATTCAAAACTGCTTTAAGTATGCTTAT
GCTGCTGGTCCAGTCATTTGAAGAAAACAGTCTTGGAGGAAAGCAGTCTGCTTAAAGTT
CAAAGCTAATGATCAGGATATGACAACTTCCGTTCCAGTAATAAATACAGCTCATCT**CGAAAG**
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号:1)

FIG. 1

【図 2】

MQPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNASLAR
SLAPAEVPGDRTAGSPRTISPPPCQGPPIEIKETFKYINTVVSCLVFLVGLIIGNSTLLRIYK
NKMNRGNPNILIASLALGDLHLHIVIDIPINVYKLLAEDWPFGAEMCKLVFFIQKASVGITVLSL
CALSIDRYRAVASWSRIKIGVPKWTAVEIVLIWVVSVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRLCL
LHPVQKTAFMQFYKTKADWWLFSFYFCLFLAITAFFYTLTCEMLRKKSGMQIALNDHLKORRE
VAKTVFCLVLVFLCWLPLHLRLKLTLYNQNDPNRCCELLSFLLVLDYIGINMASLNSCINPI
ALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSFEKQSLEEKQSLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS
(配列番号:2)

シグナル配列

アミノ酸 1-26

膜貫通ドメイン

アミノ酸 101-121, 137-157, 177-197, 216-236, 275-295, 323-343, 362-382

N-グリコシル化部位

アミノ酸 59-62, 119-122

cAMP- および cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 302-305

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 424-430

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 57-62, 115-120, 170-175, 306-311, 371-376

7回膜貫通レセプターホモロジー

アミノ酸 118-386

FIG. 2

【図 3】

ネズミ科5E9の完全長軽鎖

DVVMQTPTLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGYYCQGTGTHFYTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSE
QLTSGGASVVCLNNFYPKDINVWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSSMSSTLTTLTKDEYE
RHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNREK (配列番号:3)

ネズミ科5E9のVL

DVVMQTPTLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGYYCQGTGTHFYTFGGGKLEIK (配列番号:5)

FIG. 3

【図 4】

ネズミ科5E9の完全長重鎖

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLTLDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWGGTFTVTSSASTKGPSVYP
LAPVCGDFTTGSSTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST
WPSQITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSL
SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF
KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTN
NGKTELNYKNTEFVLDSGSYFMYSKLRVERKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKFSRTPGK
(配列番号:4)

ネズミ科5E9のVH

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLTLDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWG (配列番号:6)

FIG. 4

【図 5】

hu5E9.v1の完全長軽鎖

DIQMTPSPSSLSASVGDRTVITCKSSQSLLSDSGKTYLNWLQKPKGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGTGTHFYTFGGGKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:13)

hu5E9.v1のVL

DIQMTPSPSSLSASVGDRTVITCKSSQSLLSDSGKTYLNWLQKPKGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGTGTHFYTFGGGKVEIK (配列番号:15)

FIG. 5

【図 6】

hu5E9.v1の完全長重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLTLDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWGGTTLVTSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(配列番号:14)

hu5E9.v1のVH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLTLDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWG (配列番号:16)

FIG. 6

【図 7】

hu5E9.v2のVH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMQWVRQAPGQGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRVITRTDSTSTAYLELSSLRSEDYAVYYCARWGYAYDIDNWG (配列番号:17)

FIG. 7

【図 8】

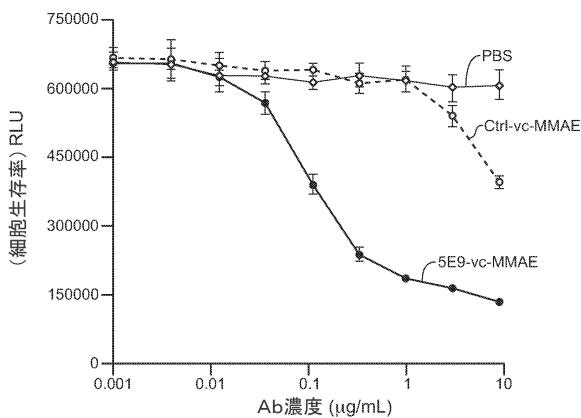


FIG. 8

【図 9】

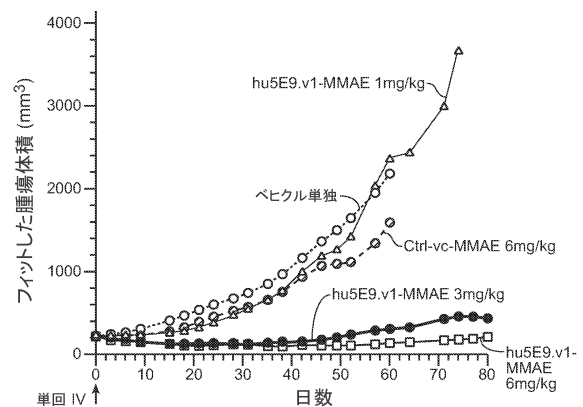


FIG. 9

【配列表】

0005988436000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		T
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		A 6 1 P 17/00		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		A
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		M
		G 0 1 N 33/53		Y
		G 0 1 N 33/48		P

- (72)発明者 アスンディ, ジョティー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ファイアスタイン, ロン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ケリー, ロバート エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 マカッチャン, クリスタ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, キャロル アベニュー 1512

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特表2006-515751 (JP, A)
米国特許出願公開第2006/0094676 (US, A1)
Virchows Arch., 2001, Vol.438, No.5, pp.485-491
American Journal of Pathology, 2001, Vol.159, No.10, pp.1353-1362

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 16/00-16/46
C12N 5/00-5/28
C12Q 1/00-1/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq
WPIDS/WPIX (STN)