

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-500009

(P2006-500009A)

(43) 公表日 平成18年1月5日(2006. 1. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395	E 4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395	L 4 B O 6 4
C O 7 K 14/435 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 5
C O 7 K 16/32 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-520117 (P2004-520117)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成15年7月8日 (2003. 7. 8)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月11日 (2005. 3. 11)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021606		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02004/004662		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成16年1月15日 (2004. 1. 15)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/394, 998	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成14年7月9日 (2002. 7. 9)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義教
		(72) 発明者	フィリップス, ハイデ, エス.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 943
			03, パロ アルト, ウォルナット
			ドライブ 1511
		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) 【要約】

本発明は、哺乳動物の腫瘍の診断と治療のために有用な物質の組成物と、同目的のためにそのような組成物を使用する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列;

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列; 又は、

(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単離された核酸。

10

【請求項 2】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列;

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列; 又は、

(g) (a) (b) (c) (d) (e) 又は (f) の相補鎖
を有する単離された核酸。

20

【請求項 3】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列;

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列;

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列; 又は、

(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。

30

【請求項 4】

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

【請求項 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。

【請求項 6】

請求項 1 の核酸を有する発現ベクター。

40

50

【請求項 7】

前記核酸が、ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール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。

【請求項 8】

請求項 7 の発現ベクターを有する宿主細胞。

【請求項 9】

C H O 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。

【請求項 10】

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。

10

【請求項 11】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列；又は、

20

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列
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。

【請求項 12】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

30

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列；又は、

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列に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。

【請求項 13】

異種ポリペプチドに融合した請求項 11 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド。

【請求項 14】

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

40

【請求項 15】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；

50

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列; 又は、

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列
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。

【請求項 16】

(a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列;

(b) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列;

(c) 関連するシグナルペプチドを持つ、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列;

(d) 関連するシグナルペプチドを欠いた、図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列;

(e) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列; 又は、

(f) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列の完全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列
を有するポリペプチドに結合する、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

モノクローナル抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 18】

抗体断片である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 19】

キメラ又はヒト化抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 20】

成長阻害剤にコンジュゲートしている、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 21】

細胞毒性剤にコンジュゲートしている、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 22】

細胞毒性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素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。

【請求項 23】

細胞毒性剤が毒素である、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 24】

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 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。

【請求項 26】

細菌中で産生される、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 27】

CHO 細胞中で産生される、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 28】

結合する細胞に死を誘発する、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 29】

検出可能に標識される、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 30】

変更された新生児 Fc レセプター (FcRn) 結合親和性を有する変異体 Fc 領域を含んでなる請求項 15 に記載の抗体であって、そのポリペプチドが、Fc 領域のアミノ酸位

10

20

30

40

50

置 2 3 8、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 6 5、2 7 2、2 8 6、2 8 8、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 0 9、3 1 1、3 1 2、3 1 7、3 4 0、3 5 6、3 6 0、3 6 2、3 7 6、3 7 8、3 8 0、3 8 2、3 8 6、3 8 8、4 0 0、4 1 3、4 1 5、4 2 4、4 3 3、4 3 4、4 3 5、4 3 6、4 3 9 又は 4 4 7 の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここで F c 領域の残基の番号付けは K a b a t の E U インデックスのものである抗体。

【請求項 3 1】

増加した F c R n 結合性を示す、請求項 3 0 に記載の抗体。

【請求項 3 2】

増加した F c R n 結合性を示し、F c 領域のアミノ酸位置 2 3 8、2 5 6、2 6 5、2 7 2、2 8 6、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 1 1、3 1 2、3 1 7、3 4 0、3 5 6、3 6 0、3 6 2、3 7 6、3 7 8、3 8 0、3 8 2、4 1 3、4 2 4 又は 4 3 4 の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここで F c 領域の残基の番号付けは K a b a t の E U インデックスのものである、請求項 3 1 に記載の抗体。 10

【請求項 3 3】

前記アミノ酸修飾が、3 0 5、3 0 7、3 1 1、3 1 2、3 1 7、3 6 0、3 6 2、3 8 0、3 8 2、4 2 4 又は 4 3 4 の任意の一又は複数におけるものであり、ここで F c 領域の残基の番号付けは K a b a t の E U インデックスのものである、請求項 3 2 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

請求項 1 5 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。 20

【請求項 3 5】

ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合する、請求項 3 4 の核酸を有する発現ベクター。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 の発現ベクターを有する宿主細胞。

【請求項 3 7】

C H O 細胞、大腸菌細胞、又は酵母細胞である、請求項 3 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 8】

抗体の発現に適した条件下で請求項 3 6 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生産方法。 30

【請求項 3 9】

- (a) 請求項 1 1 に記載のポリペプチド；
- (b) 請求項 1 3 に記載のキメラポリペプチド；又は、
- (c) 請求項 1 5 に記載の抗体

を担体と共に含有する組成物。

【請求項 4 0】

前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

- (a) 容器；及び
- (b) 前記容器に収容された請求項 3 9 に記載の組成物

を含んでなる製造品。 40

【請求項 4 2】

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 4 1 に記載の製造品。

【請求項 4 3】

- (a) 図 2 (配列番号 2) 又は図 4 (配列番号 4) に示したアミノ酸配列；又は、
- (b) 図 1 (配列番号 1) 又は図 3 (配列番号 3) に示したヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列

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を発現する癌細胞を殺す方法であって、

前記癌細胞を前記癌細胞上で前記ポリペプチドに結合する抗体に接触させることにより前記癌細胞を殺す方法。

【請求項４４】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記抗体が抗体断片である、請求項４３に記載の方法。

【請求項４６】

前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項４３に記載の方法。

10

【請求項４７】

前記抗体が成長阻害剤にコンジュゲートしている、請求項４３に記載の方法。

【請求項４８】

前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートしている、請求項４３に記載の方法。

【請求項４９】

細胞毒性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群から選択される、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

細胞毒性剤が毒素である、請求項４８に記載の方法。

【請求項５１】

20

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項５０に記載の方法。

【請求項５２】

毒素がメイタンシノイドである、請求項５０に記載の方法。

【請求項５３】

前記抗体が細菌中で産生される、請求項４３に記載の方法。

【請求項５４】

前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項４３に記載の方法。

【請求項５５】

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４３に記載の方法。

30

【請求項５６】

前記抗体が、変更された新生児Ｆｃレセプター（ＦｃＲ_n）結合親和性を有する変異体Ｆｃ領域を含んでなり、そのポリペプチドが、Ｆｃ領域のアミノ酸位置２３８、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２６５、２７２、２８６、２８８、３０３、３０５、３０７、３０９、３１１、３１２、３１７、３４０、３５６、３６０、３６２、３７６、３７８、３８０、３８２、３８６、３８８、４００、４１３、４１５、４２４、４３３、４３４、４３５、４３６、４３９又は４４７の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでＦｃ領域の残基の番号付けはＫａｂａｔのＥＵインデックスのものである、請求項４３に記載の方法。

【請求項５７】

40

前記抗体が、増加したＦｃＲ_n結合性を示す、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

前記抗体が、増加したＦｃＲ_n結合性を示し、Ｆｃ領域のアミノ酸位置２３８、２５６、２６５、２７２、２８６、３０３、３０５、３０７、３１１、３１２、３１７、３４０、３５６、３６０、３６２、３７６、３７８、３８０、３８２、４１３、４２４又は４３４の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでＦｃ領域の残基の番号付けはＫａｂａｔのＥＵインデックスのものである、請求項５６に記載の方法。

【請求項５９】

前記アミノ酸修飾が、３０５、３０７、３１１、３１２、３１７、３６０、３６２、３８０、３８２、４２４又は４３４の任意の一又は複数におけるものであり、ここでＦｃ領

50

域の残基の番号付けはK a b a tのE Uインデックスのものである、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

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、白血病細胞、及び神経膠腫細胞からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項61】

前記癌細胞が神経膠腫細胞である、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

前記癌細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記ポリペプチドを過剰発現する、請求項43に記載の方法。 10

【請求項63】

(a) 図2 (配列番号2) 又は図4 (配列番号4) に示したアミノ酸配列；又は、
(b) 図1 (配列番号1) 又は図3 (配列番号3) に示したヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列
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を発現する細胞、を含む腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、
前記哺乳動物に、前記ポリペプチドに結合する抗体の治療的有効量を投与することにより前記哺乳動物を効果的に治療する方法。

【請求項64】

20

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記抗体が抗体断片である、請求項63に記載の方法。

【請求項66】

前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項63に記載の方法。

【請求項67】

前記抗体が成長阻害剤にコンジュゲートしている、請求項63に記載の方法。

【請求項68】

前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートしている、請求項63に記載の方法。

【請求項69】

30

細胞毒性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群から選択される、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

細胞毒性剤が毒素である、請求項68に記載の方法。

【請求項71】

毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

毒素がメイタンシノイドである、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

40

前記抗体が細菌中で産生される、請求項63に記載の方法。

【請求項74】

前記抗体がCHO細胞中で産生される、請求項63に記載の方法。

【請求項75】

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63に記載の方法。

【請求項76】

前記抗体が、変更された新生児Fcレセプター (FcRn) 結合親和性を有する変異体Fc領域を含んでなり、ポリペプチドが、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、37 50

8、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項63に記載の方法。

【請求項77】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示す、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項76に記載の方法。 10

【請求項79】

前記アミノ酸修飾が、305、307、311、312、317、360、362、380、382、424又は434の任意の一又は複数におけるものであり、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

前記腫瘍が、乳房腫瘍、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、子宮頸部腫瘍、又は神経膠腫である、請求項63に記載の方法。 20

【請求項81】

前記腫瘍が神経膠腫である、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

(a) 図2 (配列番号2) 又は図4 (配列番号4) に示したアミノ酸配列；又は、
(b) 図1 (配列番号1) 又は図3 (配列番号3) に示したヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列
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を含むことが疑われる試料中における前記ポリペプチドの存在を決定する方法であって、

前記ポリペプチドに結合する抗体に前記試料を曝し、前記試料中における前記ポリペプチドへの前記抗体の結合を決定することを含む方法。 30

【請求項83】

前記試料が前記ポリペプチドの発現が疑われる細胞を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

前記細胞が癌細胞である、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

前記抗体が検出可能に標識される、請求項82に記載の方法。

【請求項86】

前記抗体が、変更された新生児Fcレセプター (FcRn) 結合親和性を有する変異体Fc領域を含んでなり、ポリペプチドが、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項82に記載の方法。 40

【請求項87】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示す、請求項86に記載の方法。

【請求項88】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340 50

、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項86に記載の方法。

【請求項89】

前記アミノ酸修飾が、305、307、311、312、317、360、362、380、382、424又は434の任意の一又は複数におけるものであり、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法において、

10

(a) 図2 (配列番号2) 又は図4 (配列番号4) に示したアミノ酸配列；又は、

(b) 図1 (配列番号1) 又は図3 (配列番号3) に示したヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列

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をコードする遺伝子の発現レベルを、前記哺乳動物から取得した組織細胞の試験試料中と、同一の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ポリペプチドが高いレベルで発現していることが、試験試料が取得された哺乳動物中に腫瘍が存在することを示す方法。

【請求項91】

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階が、インサイツハイブリダイゼーション又はRT-PCR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90に記載の方法。

20

【請求項92】

前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階が、免疫組織化学分析で抗体を使用することを含む、請求項90に記載の方法。

【請求項93】

哺乳動物内における腫瘍の存在を診断する方法において、

(a) 図2 (配列番号2) 又は図4 (配列番号4) に示したアミノ酸配列；又は、

(b) 図1 (配列番号1) 又は図3 (配列番号3) に示したヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列

30

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抗体に、前記哺乳動物から取得した組織細胞の試験試料を接触させることと、

試験試料中における前記抗体と前記ポリペプチドとの複合体の生成を検出することを含み、複合体の生成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。

【請求項94】

前記抗体が検出可能に標識される、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

前記抗体が、変更された新生児Fcレセプター (FcRn) 結合親和性を有する変異体Fc領域を含んでなり、ポリペプチドが、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項93に記載の方法。

40

【請求項96】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示す、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記抗体が、増加したFcRn結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340

50

、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

前記アミノ酸修飾が、305、307、311、312、317、360、362、380、382、424又は434の任意の一又は複数におけるものであり、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

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93に記載の方法。 10

【請求項100】

中性pHでのFcRnへの結合性と比較して、酸性pHで増加したFcRn結合特性を更に有する請求項30、56、76、86又は95に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

〔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、該物質の組成物の使用方法を目的とする。 20

【0002】

〔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二の主要な死亡原因である（Boring等，CA Cancer 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過剰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。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した。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、HERCEPTIN（ハーセプチン）（登録商標）及びRITUXAN（リツキサン）（登録商標）（双方とも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、HERCEPTIN（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター2（HER2）プロトオンコジー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。RITUXAN（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。 30 40

哺乳動物の癌治療におけるこのような進歩にも関わらず、それぞれ哺乳動物中の腫瘍の存在を検出することができる更なる診断薬及び腫瘍性細胞成長を効果的に阻害する治療薬は大いに必要とされている。従って、正常細胞上と比較して癌細胞上に過剰発現する細胞表面ポリペプチドを同定すること、並びに、該ポリペプチド、及びそのコード核酸を使用して哺乳動物の癌の診断的検出及び治療的処置に有用な物質の組成物を製造することが本発明の目的である。 50

【0003】

[発明の概要]

A. 実施態様

本明細書では、本出願人は、正常な非癌細胞の一又は複数の型の表面と比較して、癌細胞の一又は複数の型の表面でより多く発現される種々の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）の同定を初めて記載する。このようなポリペプチドはここでは腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド（Tumor-associated Antigenic Target polypeptides）（「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期待される。

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含む単離された核酸分子を提供する。 10

【0004】

ある種の態様では、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、あるい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その他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%又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 20

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コード化配列で、シグナルペプチドを含む又は含まないもの、あるい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その他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%又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 30

【0005】

更なる態様では、本発明は、（a）ここで開示されるATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの何れかの完全長コード化領域によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードする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%又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。これに関し、「完全長コード化配列」とは、ATCCに寄託されたベクターに挿入されるcDNAのTATポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を指す（添付図ではしばしば開始コドンと終止コドンの間に示される）。 40

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な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がここに開示されている。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。

【0006】

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 50

を伴う又は伴わないもの、又はここで開示される完全長T A Tポリペプチドアミノ酸配列の任意のその他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、診断プローブ、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T A T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T A Tポリペプチド抗体への結合部位を有するポリペプチドを場合によってはコードする完全長T A T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。T A Tポリペプチド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T A T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T A Tポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片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ことが知られている。そのようなT A T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T A Tポリペプチド断片、好ましくは抗T A T抗体への結合部位を有するT A Tポリペプチド断片である。

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。

【0007】

ある種の態様では、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によってコードされているアミノ酸配列、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の任意のその他具体的に定まった断片に対して、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。

更なる態様では、本発明は、ここに開示されてA T C Cに寄託されたヒトタンパク質c D N Aの何れかによりコードされ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%、又は99%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。

【0008】

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。

10

【0009】

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更に提供され、該方法は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。

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、エプトー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。

20

【0010】

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、ヒト抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。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成長阻害剤又は細胞毒性剤、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CHO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る。

30

更なる実施態様では、本発明は、Fc領域を含む親ポリペプチドの変異体であって、ヒトエフェクター細胞の存在下でより効果的に抗体依存性細胞障害（ADCC）を媒介するか、又は親ポリペプチドより良好な親和性でFcγレセプター（FcγR）に結合し、Fc領域で少なくとも一のアミノ酸修飾を含むものを提供する。このポリペプチド変異体は、例えば抗体又はイムノアドヘシンを含み得る。親ポリペプチドのFc領域は、好適にはヒトFc領域、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域を含む。

【0011】

好適な実施態様では、本発明は、変更された新生児Fcレセプター（FcRn）結合親和性を有する変異体Fc領域を含んでなるポリペプチドであって、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含むものを提供する。ここでFc領域の残基の番号付けはKabataのEUインデックスのものである（Kabata等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)参照）。減少したFcRn結合性を有するそのようなポリペプチド変異体は、Fc領域のアミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388

40

50

、400、415、433、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み得、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである。上述のポリペプチド変異体はあるいは、増加したFcRn結合性を示し得、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み得、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatのEUインデックスのものである。

【0012】

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CHO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任意の抗体の製造方法が更に提供され、該方法は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。

10

また更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わせた、ここに記載のTATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、又はここに記載の抗TAT抗体を含有する組成物に関する。場合によっては、この担体は薬学的に許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TATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、又はここに記載の抗TAT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。

20

本発明の他の実施態様は、TATポリペプチド、キメラTATポリペプチド、又は抗TAT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TATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、又はここに記載の抗TATポリペプチド抗体の使用に関する。

【0014】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様は、TATポリペプチドを発現する細胞を殺す方法に関し、該方法は、細胞を、TATポリペプチドと結合する抗体と接触させることを含み、それにより細胞の死をもたらす。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成長阻害剤又は細胞毒性剤、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CHO細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

30

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物においてTATポリペプチドを発現する腫瘍を治療的に処置する方法に関し、該方法は、TAT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成長阻害剤又は細胞毒性剤、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得る。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはCHO細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

40

【0015】

本発明の更に別の実施態様は、TATポリペプチドを含むと思われる試料中のTATポ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TATポリペプチドと結合する抗体に曝して、試料中のTATポリペプチドへの抗体の結合を定量することを含み、そ

50

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）同じ組織源の既知の正常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ポリペプチドの発現レベルが高い場合、試験試料が得られた哺乳動物における腫瘍の存在を示す。

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、哺乳動物における腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられる抗体は、検出可能に標識され、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。

本発明の更なる実施態様は、本明細書を読めば当業者には明らかとなるであろう。

【0016】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、T A T 4 4 3 4 c D N Aのヌクレオチド配列（配列番号1）を示し、ここで配列番号1は「D N A 9 8 5 6 6」と命名されたクローンである。

図2は、図1の配列番号1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

図3は、T A T 3 6 3 8 1 c D N Aのヌクレオチド配列（配列番号3）を示し、ここで配列番号3は「D N A 2 2 5 9 1 8」と命名されたクローンである。

図4は、図3の配列番号3のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【0017】

〔好ましい実施態様の詳細な説明〕

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（ここで更に定義される）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、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関する。「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。

【0018】

「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」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。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。

【0019】

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。

【0020】

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が、本発明で考慮される。

【0021】

「T A T ポリペプチド変異体」とはT A T 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T A T 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T A T 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T A T 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T A T ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長T A T 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T A T ポリペプチドを意味する。このようなT A T 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T A T ポリペプチドが含まれる。通常、T A T ポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列T A T 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T A T 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T A T 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T A T 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、T A T 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

、 1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0
 、 2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7 0、2 8 0、2 9 0、3 0 0、3 1 0、3 2 0
 、 3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8 0、3 9 0、4 0 0、4 1 0、4 2 0
 、 4 3 0、4 4 0、4 5 0、4 6 0、4 7 0、4 8 0、4 9 0、5 0 0、5 1 0、5 2 0
 、 5 3 0、5 4 0、5 5 0、5 6 0、5 7 0、5 8 0、5 9 0、6 0 0 アミノ酸長、又は
 それ以上である。

【0022】

ここで同定した T A T 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、如何なる同類置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の T A T 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 B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、又は M e g a l i g n (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、A L I G N - 2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用することによって得られる。A L I G N - 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、2 0 5 5 9 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 で登録されている。A L I G N - 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、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N - 2 プログラムは、U N I X (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 U N I X (登録商標) V 4 . 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、A L I G N - 2 プログラムによって設定され変動しない。

【0023】

アミノ酸配列比較に A L I G N - 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 に、それと、又はそれに対してある程度の %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 1 0 0 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム A L I G N - 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。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 及び 3 は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「T A T」と称されるアミノ酸配列に対する %アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「T A T」は対象の仮想 T A T ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「T A T」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮想アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての %アミノ酸配列同一性値は、A L I G N - 2 コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

【0024】

「T A T 変異体ポリヌクレオチド」又は「T A T 変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、T A T ポリペプチド、好ましくは活性 T A T ポリペプチドをコードする核酸

分子であって、ここに開示する完全長天然配列 T A T 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 T A T 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 T A T 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 T A T ポリペプチド配列の他の任意の断片（完全長 T A T 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）をコードする核酸配列と、少なくとも約 80 % の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、T A T 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 T A T 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 T A T 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 T A T 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 T A T 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。

【0025】

通常、T A T 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、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、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。

【0026】

ここで同定される T A T 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 T A T 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 B L A S T、B L A S T-2、A L I G N 又は Meg A L I G N (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、A L I G N-2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較コンピュータプログラム A L I G N-2 を使用することによって得られる。A L I G N-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 T X U 5 1 0 0 8 7 の下で登録されている。A L I G N-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、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N-2 プログラムは、U N I X (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 U N I X (登録商標) V 4.0 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、A L I G N-2 プログラムによって設定され変動しない。

【0027】

核酸配列比較にA L I G N - 2 が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Cの、与えられたアミノ酸配列D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Dに、それと、又はそれに対してある程度の%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A L I G N - 2 のC及びDの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ヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチドである。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。%核酸配列同一性の計算の例として、「T A T - D N A」が対象となる仮説的T A Tコード化核酸配列を表し、「比較D N A」が対象となる「T A T - D N A」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表していて、表4及び5が「比較D N A」と称される核酸配列の「T A T - D N A」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにA L I G N - 2 コンピュータプログラムを用いて得られる。

【0028】

他の実施態様では、T A T変異体ポリヌクレオチドとは、T A T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T A T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。T A T変異体ポリペプチドは、T A T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。

【0029】

ここに開示される種々の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十分な程度まで、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S D S - P A G E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、T A T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。

【0030】

「単離された」T A T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。

【0031】

「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D N A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。

【0032】

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。

【0033】

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。

【0034】

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)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において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を用いるもの；(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、例えば、42℃において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ー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)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42℃での10%の硫酸デキストランと、42℃における0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)での洗浄、55℃における50%ホルムアミドでの洗浄、ついで55℃におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる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。

【0035】

「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を含む溶液中の37℃での終夜インキュベーション、ついで1×SSC中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はわかるであろう。

【0036】

「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T A Tポリペプチド又は抗T A T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になり独特である。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。

【0037】

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T A Tの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するT A T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T A T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T A T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T A T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。

【0038】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然T A T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し、阻害し、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T A T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T A T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。T A T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、T A T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T A T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。

【0039】

「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T A T抗体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緩和；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／又は細胞毒性であり得る。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。

【0040】

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確かめ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査することでおこなうことができる。胸のX線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの

10

20

30

40

50

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）が含まれる。

【0041】

より局所的な癌である膀胱癌に関しては、疾患の進行を確かめる方法には、膀胱鏡検査による尿細胞評価、尿中に存在する血液のモニタリング、超音波断層撮影又は静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（C T）及び磁気共鳴映像法（M R I）による尿路上皮性癌の視覚化が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のC T、胸部X線、又は骨格の放射性核種イメージングによって評価することができる。

「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。

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。

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。

【0042】

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、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（P E G）、及びPLURONICS（登録商標）を含む。

【0043】

「固相」とは、本発明の抗体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、孔調整ガラス）、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ンで形成されたものを含む。ある実施態様では、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。

「リボソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばT A Tポリペプチド、又はそれに対する抗体）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。リボソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配置に類似した2層構造に配列される。

【0044】

ここで定義されている「小」分子とは、約500ダルトン未満の分子量である。

ここに開示するポリペプチド又は抗体、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。

「治療的有效量」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。「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/又は細胞毒性であり得る。

【0045】

抗TAT抗体又はTATポリペプチドの「成長阻害量」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TAT抗体又はTATポリペプチドの「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。

10

抗TAT抗体又はTATポリペプチドの「細胞毒性量」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TAT抗体、TATポリペプチド、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子の「細胞毒性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

本明細書及び特許請求の範囲を通して、免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、Kabatt等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載のEUインデックスのものであり、出典を明示してここに取り込む。「KabattのEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。

【0046】

20

「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TAT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TAT抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗TAT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TAT抗体の断片(下記を参照)を包含する。「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

「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SDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離された抗体には、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。

30

【0047】

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

40

50

し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン ($C_H 1$) 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 Tris tram G. Parslow (編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71 頁及び 6 章を参照のこと。

【0048】

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 10
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。Ig A、Ig D、Ig E、Ig G 及び Ig M 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。更に 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：Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1 及び Ig A 2 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 15-3 20
0 アミノ酸のフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。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。

【0049】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基 (例えば、 V_L においては、およそ残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 及び 89-97 (L3)、及び V_H においては、およそ 1-35 (H1)、50-65 (H2) 及び 95-102 (H3) ; Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunolo 30
gical Interest, 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 及び／又は「高度可変ループ」からの残基 (例えば、 V_L においては、およそ残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 及び 91-96 (L3)、及び V_H においては、およそ 26-32 (H1)、53-55 (H2) 及び 96-101 (H3) ; Chothia 及び Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) を含んでなる。

【0050】

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。更に、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 (197 40
50

5)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。

【0051】

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。

10

「無傷」の抗体は、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、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0052】

20

「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 (群) 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。

30

【0053】

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。

40

「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Fv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。

【0054】

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内

50

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、 sFv ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それは sFv が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。 sFv 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。

「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 sFv 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」 sFv 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; 国際公開第 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。

10

【0055】

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。更に、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更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。更なる詳細は、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

【0056】

「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 (Kd) 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。

30

【0057】

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」抗体は、その抗体がその抗原を発現している細胞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、抗体の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標式細胞分取器 (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の結合の約 10% よりも低い。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「特異的に結合する」又は「特異的である」抗体とは、他の如何なる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ものを意味する。

40

【0058】

「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、又は「成長阻害」

50

抗体は、適切なT A Tポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞に結合し、その測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。好ましい成長阻害抗T A T抗体は、試験された抗体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%、そして更に好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でT A T発現腫瘍細胞の成長を阻害する。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T A T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。 10

【0059】

「アポトーシスを誘発する」抗体は、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、T A T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。 20

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；抗体依存性細胞障害（ADCC）；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。 30

【0060】

「抗体依存性細胞障害」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毒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 RIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー細胞（NK細胞）が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。 40

【0061】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。更に好適なFcRは、IgG抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、Fc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RI 50

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。

【0062】

「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、細胞毒性 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) の第一補体が、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。

【0063】

「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又は記述する。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。

用語「神経膠腫」は、脳、脊髄、松果腺、脳下垂体後葉及び網膜の間質組織を形成する種々のタイプの細胞の一つに由来する何らかの新生物を指す。神経膠腫には例えば、これらに限定されるものではないが、神経膠星状細胞腫、脳幹神経膠腫、巨大細胞神経膠腫、高悪性度及び低悪性度神経膠腫、混合性神経膠腫、鼻神経膠腫、視神経膠腫、脊髄神経膠腫、毛細血管拡張性神経膠腫、神経膠粘液腫 (gliomyxomas)、神経膠神経腫、神経膠肉腫、乏突起神経膠腫、膠芽細胞腫、及び髄膜腫が含まれる。

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。

【0064】

「細胞死を誘導する」抗体は、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。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、抗体依存性細胞障害（ADCC）又は補体依存性細胞障害（CDC）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。抗体が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンプルー（Moore等 Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) 又は7AAD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は、BT474細胞でのPI取り込みアッセイで、PI取り込みを誘導するものである。

10

【0065】

「TAT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TATポリペプチドを発現する。「TAT発現癌」は、細胞表面上に存在するTATポリペプチドを有する細胞を含む癌である。「TAT発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのTATポリペプチドを生成し、抗TAT抗体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。TAT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TATポリペプチドを有するものである。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。TAT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TAT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、TAT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DNA技術を用いて調製することができる単離されたTATポリペプチドに対して調製した抗TAT抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；FACS分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、TAT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；（FISH；1998年10月に公開の国際公開第98/45479を参照）、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（PCR）技術、例えばリアルタイム定量PCR（RT-PCR）を介して、細胞のTATポリペプチドコード化核酸又はmRNA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、TAT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日に公開の米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開の国際公開第91/05264；1995年3月28日に公開の米国特許第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、熟練技術者にとって入手可能である。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。

20

30

【0066】

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、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

40

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体を作製するために、抗体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

50

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。

【0067】

ここで用いられる「細胞毒性剤」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 の放射性同位元素）、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド類（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞毒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。

10

【0068】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にTAT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、成長阻害剤は、S期でTAT発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、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II阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）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。

20

30

「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。

【0069】

「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；トロンプオエチン（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（CS

40

50

F s)、例えばマクロファージ-C S F (M-C S F) ; 顆粒球-マクロファージ-C S F (GM-C S F) ; 及び顆粒球-C S F (G-C S F) ; インターロイキン (I L s)、例えば I L - 1、I L - 1 a、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 1、I L - 1 2 ; 腫瘍壊死因子、例えば T N F - α 及び T N F - β ; 及び L I F 及びキットリガンド (K L) 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。

10

【0070】

表 1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */    { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */    { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */    {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */    { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */    { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */    {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */    { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */    {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */    {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */    {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */    { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */    {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */    { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */    { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */    {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */    { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */    {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */    { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

20

30

40

表 1 (続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3       /* value of matching bases */
#define DMIS         0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8       /* penalty for a gap */
#define DINS1        1       /* penalty per base */
#define PINS0        8       /* penalty for a gap */
#define PINS1        4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp     jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];    /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;     /* output file name */
char              *namex[2];  /* seq names: getseqs() */
char              *prog;      /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int               dmax;        /* best diag: nw() */
int               dmax0;       /* final diag */
int               dna;         /* set if dna: main() */
int               endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int               len0, len1;   /* seq lens */
int               ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int               smax;        /* max score: nw() */
int               *xbm;        /* bitmap for matching */
long              offset;      /* current offset in jmp file */
struct            diag         /* holds diagonals */
struct            path         /* holds path for seqs */
pp[2];

char              *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char              *getseq(), *g_calloc();

```

表 1 (続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
*   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int      ac;
    char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";

    nw();
    readjumps();
    print();

    cleanup(0);
}

```

10

20

main

30

40

表 1 (続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/

nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int        *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;              /* score for each type */
    int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register   id;               /* diagonal index */
    register   ij;              /* jmp index */
    register   *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

表 1 (続き)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

10

20

30

表 1 (続き)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256    /* maximum output line */
#define P_SPC    3      /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()
{
    int     lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {    /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {    /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {    /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

10

print 20

30

40

表 1 (続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;           /* matches in core -- for checking */
static      lmax;         /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];        /* jmp index for a path */
static      nc[2];        /* number at start of current line */
static      ni[2];        /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];       /* ptr to current element */
static char *po[2];       /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;           /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表 1 (続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);

            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

40

dumpblock

表 1 (続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
{
    int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
    int      ix;
    {

```

10

20

30

40

nums

putline

表 1 (続き)

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *(po[0]) == '') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '' && *(po[1]) == ''))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

10

stars

20

30

40

表 1 (続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

表 1 (続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE     *fj;

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char      *
getseq(file, len)
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;      /* seq len */
{
    char      line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int       natgc, tlen;
    FILE      *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

cleanup

10

20

getseq

30

40

表 1 (続き)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

...getseq

10

g_alloc

20

30

readjmps

40

表 1 (続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

表 1 (続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
{
    int ix;
    char *mktemp();
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

writejumps

10

【 0 0 7 1 】

20

表 2

TAT XXXXXXXXXXXXXXXX (長さ = 15 アミノ酸)

比較 タンパク質 XXXXXYYYYYYYY (長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷ (TATポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

$5 \div 15 = 33.3\%$

30

表 3

TAT XXXXXXXXXXXX (長さ = 10 アミノ酸)

比較 タンパク質 XXXXXYYYYYYYZZYZ (長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷ (TATポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

$5 \div 10 = 50\%$

40

表 4

TAT-DNA NNNNNNNNNNNNNN (長さ = 14 ヌクレオチド)

比較 DNA NNNNNLLLLLLLLLLL (長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数) ÷ (TAT-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数) =

$6 \div 14 = 42.9\%$

50

表 5

TAT-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLTV	(長さ = 9 ヌクレオチド)
% 核酸配列同一性 =		
(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)÷(TAT-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数) =		
4 ÷ 12 = 33.3%		

10

【0072】

I I. 本発明の組成物及び方法

A. 抗TAT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TAT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。

【0073】

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。

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ないし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ないし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。

【0074】

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))。

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

50

合のパートナーとも呼ばれる)の増殖又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HPR T)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)。

【0075】

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、Salk Institute Cell Distribution Center, サンディエゴ, カリフォルニア, U S A より入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、American Type Culture Collection, マナッサス, バージニア, U S A 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); 及びBrodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

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(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

【0076】

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-MEM又はRPMI-1640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DNA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DNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNA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COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)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DNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992)が含まれる。

【0077】

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 (nM 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DNA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4816567号; 及び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。

【0078】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-TAT抗体は、更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 F_v 、 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 F_v 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4816567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。

【0079】

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。

【0080】

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); Bruggemann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。

【0081】

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)。

【0082】

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。 10

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。F a b、F v及びS c F v抗体断片は、すべて大腸菌で発現さ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、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させて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F v断片(s c F v)である。国際公開第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。F v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。 20 30

【0083】

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毒性剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はT A T結合アーム及び細胞毒性剤(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。 40

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 50

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。

【0084】

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、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ 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 ($C_H 1$) 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3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、3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2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又は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。

【0085】

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。好適な界面は $C_H 3$ ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一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二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。

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。

【0086】

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 $F(a b')_2$ 断片を産生する手順を

10

20

30

40

50

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 a b ' 断片はついでチオニトロベンゾアート (T N B) 誘導体に変換される。F a b ' - T N B 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により F a b ' -チオールに再変換し、他の F a b ' - T N B 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。

最近の進歩により、大腸菌からの F a b ' - S H 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 (a b ')₂ 分子の製造を記述している。各 F a b ' 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 E r b B 2 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毒性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

10

【0087】

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。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。

20

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。Tu tt等 J.Immunol. 147:60 (1991)。

30

【0088】

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 H I V 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。

40

【0089】

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 (I g M クラス以外のもの) であり得 (例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインは F c 領域又はヒンジ領域を有する (又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗

50

体はF c領域と、F c領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する（又はそれらからなる）。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖（好ましくは2つのポリペプチド鎖）を有し、ポリペプチド鎖（類）は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖（類）はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを有し、ここでVD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、FcはF c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更に有する。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。

【0090】

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性細胞障害（ADCC）及び／又は補体依存性細胞障害（CDC）及び／又は抗体にコンジュゲートした細胞毒性剤の移行を向上させることは望ましい。これは、抗体のF c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うる。あるいは又は更に、システイン残基をF c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性細胞障害（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F c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。

ヒトIgG1Fc領域内の特定の残基の修飾が、特定のレセプター、例えばヒトFcRnレセプターへの結合を向上するために示されている。Shields等, J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (2001)。FcRn、新生児Fcレセプターは、主要組織適合性複合体（MHC）に構造的に類似したFcレセプターであり、β2-ミクログロブリンに非共有結合したα-鎖を含んでなる。FcRnは、IgGの移送とクリアランスに関与すると考えられる。Ragavan等, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 12:181-220 (1996)。FcRn複合体は、酸性のpH（約6.0-6.5）でIgGのFc領域に結合し、中性pHでは結合しない特性を有する。FcRnの周知の機能は、胎児成育期におけるIgGの経胎盤移行、新生児の内臓へのIgGの移行、及び、IgGをエンドサイトーシス管（endocytic vesicles）から再循環させることによる循環IgGの半減期の延長である。それぞれの場合において、FcRnは酸性pHでIgGに結合し、その後IgGを異なる区画に運び、中性pHで解放する。

【0091】

一つの実施態様では、本発明は、変更された新生児Fcレセプター（FcRn）結合親和性を有する変異体Fc領域を含んでなるポリペプチドであって、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含むものを提供する。ここでFc領域の残基の番号付けはKabatsのEUインデックスのものである（Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

(1991)参照)。減少したFcRn結合性を有するそのようなポリペプチド変異体は、Fc領域のアミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439又は447の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み得、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatatのEUインデックスのものである。上述のポリペプチド変異体はあるいは、増加したFcRn結合性を示し得、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の任意の一又は複数にアミノ酸修飾を含み得、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatatのEUインデックスのものである。増加したFcRn結合性をもたらし特に好適なこういった修飾は、Fc領域のアミノ酸位置305、311、312、317、360、362、380、382、424又は434の任意の一又は複数において生じ、ここでFc領域の残基の番号付けはKabatatのEUインデックスのものである。Shields等, J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (2001)。

FcRnに対する向上した親和性を有するFc領域変異体は、より長い血清半減期を持つことが予想され、そういった分子は、投与したポリペプチドの長期の半減期が所望される、例えば慢性の疾病又は疾患を治療するためのほ乳類の治療方法において有用であるだろう。逆に、減少したFcRn結合親和性を有するFc領域変異体は、より短い血清半減期を持つことが予想され、そういった分子は、例えばインビボ画像診断や、長期間血流が左循環すると毒性の副作用を持つポリペプチド等のために、短期化された循環時間が有利な哺乳類に投与できる。減少したFcRn結合親和性を有するFc領域変異体は、胎盤を横断する可能性が低いことが予想され、従って妊娠中の女性の疾病又は疾患の治療に利用できる。

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）ヘ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。

【0092】

9. 免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、成長阻害剤、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）などの細胞毒性剤、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）とコンジュゲート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・アメリカーナ（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（sapaonaria officinalis）インヒビター、ゲロニン（gelonin）、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）及びトリコテセン（tricothecene）が含まれる。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、¹²⁵I、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reが含まれる。

抗体及び細胞毒性剤の複合体は、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。国際公開第94/11026号参照。

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（trichothene）及び CC 1065、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。

【0093】

10

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 T A T 抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイ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。

20

【0094】

メイタンシノイド-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5208020号、同5416064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 C 2 4 2 に結合する D M 1 と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等，Cancer Research, 52:127-131 (1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体 A 7、又は H E R - 2 / n e u オンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体 T A . 1 に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。T A . 1 -メイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性はヒト乳癌株化細胞 S K - B R - 3 におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 H E R - 2 表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞毒性度が達成され、該細胞毒性度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A 7 -メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞毒性を示した。

30

40

【0095】

抗 T A T ポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート（免疫コンジュゲート）

抗 T A T 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 T A T 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毒性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞毒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

50

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、及びChari等, *Cancer Research*, 52:127-131 (1992)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。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。

【0096】

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 (SPDP)、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-ピリジルジチオ)ペンタノアート (SPDP) 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 (SPDP) (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。

【0097】

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_1^I (Hinman等, *Cancer Research*, 53:3336-3342 (1993)、Lode等 *Cancer Research*, 58:2925-2928 (1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方とも、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、細胞毒性効果が大きく向上する。

【0098】

他の細胞毒性剤

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、アプリン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 (P A P I、P A P I I 及び P A P - 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。 10

本発明は更に、抗体と、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に記載の技術との間に形成される免疫コンジュゲートを更に考察する。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ルエタノールアミン (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。 20

【0099】

B. 所望する特性を有する抗体のスクリーニング

抗体を生成する技術を、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を更に選択することができる。

本発明の抗TAT抗体の成長阻害効果を、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。抗体処理の後、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ーで定量化した。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%、そして更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。 30 40

【0100】

細胞死を誘発する抗体を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム (P I)、トリパ
ンブルー又は7 A A D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コントロ
ールと比較して求める。P I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。T A Tポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切なモノクロー
ナル抗体 (例えば約10 μ g/ml) 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 $\times$ 75チューブ (チューブ当たり1 ml、処理グループ当
り3チューブ) に等分する。ついで、チューブへP I (10 μ g/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) CellQuestソ
フトウェア (Becton Dickinson) を使用して分析してもよい。P I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体は、細胞死誘発抗体として選
択することができる。

関心のある抗体が結合したT A T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 Man
ual, 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。本発明の抗T A T
抗体のように、試験抗体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、T A T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。

【0101】

C. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法 (A D E P T)

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、国際公開第81/0
1145号を参照) 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
トしていることによって、A D E P Tにおいて使用することができる。例えば国際公開第
88/07378号及び米国特許第4975278号を参照されたい。

A D E P T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ールスルファターゼ；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, Natu
re 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]）。

【0102】

D. 完全長TATポリペプチド

本発明は、本出願でTAT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更に詳細に説明するように、種々のTATポリペプチドをコードするcDNA（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cDNAクローンがATCC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TAT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。

【0103】

E. 抗TAT抗体及びTATポリペプチド変異体

ここに記載した抗TAT抗体及び完全長天然配列TATポリペプチドに加えて、抗TAT抗体及びTATポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗TAT抗体及びTATポリペプチド変異体は、コード化DNA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TAT抗体の翻訳後プロセス又はTAT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。

ここに記載した抗TAT抗体及びTAT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TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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。

【0104】

抗TAT抗体及びTAT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TAT抗体又はTAT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。

抗TAT抗体及びTAT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DNA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。更にその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）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DNA断片を単離し増幅することが含まれる。DNA断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、抗TAT抗体及びTATポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗TAT抗体又はTAT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。

【0105】

特定の実施態様では、対象とする同類置換を、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6に置換例と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類で更に記載するように、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。

【0106】

表 6

元の残基	置換例	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

【0107】

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実質的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;
- （3）酸性：asp, glu;
- （4）塩基性：asn, gln, 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。

10

20

30

40

50

非同類置換は、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、同類置換部位、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、アラニンスキャンニング、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。

10

【0108】

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。更に、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。

20

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。

【0109】

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、アラニンスキャ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。

30

40

抗TAT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-TAT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。

【0110】

F. 抗TAT抗体及びTATポリペプチドの修飾

50

抗TAT抗体及びTAT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TAT抗体又はTATポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTATポリペプチドを、抗TAT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。 10

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ル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。

【0111】

本発明の範囲内に含まれる抗TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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。 20

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。 30

抗TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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、随意的に改変され得る。 40

【0112】

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第87/05330号、及びAplin 50

及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

抗T A T抗体又はT A T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T A T抗体又はT A T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 (P E G)、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。

また、本発明の抗T A T抗体又はT A T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T A T抗体又はT A T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。

【0113】

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T A T抗体又はT A T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T A T抗体又はT A T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T A T抗体又はT A T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T A T抗体又はT A T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 (poly-his) 又はポリ-ヒスチジン-グリシン (poly-his-gly) タグ；f l u H Aタグポリペプチド及びその抗体1 2 C A 5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-m y cタグ及びそれに対する8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7及び9 E 1 0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 (g D) 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)]；K T 3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T 7遺伝子1 0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T A T抗体又はT A T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I g G分子のF c領域であり得る。I g融合体は、好ましくはI g分子内の少なくとも1つの可変領域に換えて抗T A T抗体又はT A T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、I g G分子のヒンジ、C H₂ 及びC H₃、又はヒンジ、C H₁、C H₂ 及びC H₃ 領域を含む。免疫グ

10

20

30

40

50

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。

【0114】

G. 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 シティー, 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。

【0115】

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）により得ることができる。

ライブラリは、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)〕。

【0116】

cDNAライブラリ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、³²P標識ATP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等に示されている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBank等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、cDNAに逆転写されていないmRNA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cDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【0117】

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TAT抗体又はTAT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的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH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、プロトコール、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、CaCl₂、CaPO₄、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日公開の国際公開第89/05859号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4399216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、DNA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。

【0118】

ここに記載のベクターにDNA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K12株MM294 (ATCC 31446)；大腸菌X1776 (ATCC 31537)；大腸菌株W3110 (ATCC 27325)及びK5772 (ATCC 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 degP ompT kan^r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7 (A T C C 5 5, 2 4 4) ; 完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 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 P C R 又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0119】

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 F c 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 (T I R) 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、C H O 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おこなうことができる。

【0120】

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 T A T 抗体又は T A T 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・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・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, CBS683, 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*) (A T C C 1 2 4 2 4)、クリュイベロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (A T C C 1 6 0 4 5)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (A T C C 2 4 1 7 8)、クリュイベロミセス・ワルチイ (*K. waltii*) (A T C C 5 6 5 0 0)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (A T C C 3 6 9 0 6; 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、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Toly pocladium*) (1991 年 1 月 10 日公開の国際公開第 91/00357 号) ; 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, EMB 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 (C 1 化合物資化性、Methylotropic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ (*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ (*Kloeckera*)、ピシア (*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス (*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 Methyloprotophytes, 269 (1982)に記載されている。

【0121】

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イルス株、例えばオートグラフ・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、このようなウイルスは、本発明に係るウイルスとして、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常套的な作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) 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 CCL 10)；チヤイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (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 CCL 70)；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 CCL 2)；イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51)；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。

【0122】

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1つ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。

TAT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TAT抗体又はTAT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、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（*Saccharomyces*）及びクリュイペロミセス（*Kluyveromyces*） α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5010182号に記載されている）、又は酸ホスホターゼリーダー、カンジダ・アルビカンズ（*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第90/13646号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。

10

【0123】

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

20

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

30

【0124】

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（t r p）プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第36776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。

40

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

50

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、窒素代謝に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。

【0125】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。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DNAのシス作用要素である。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SV40エンハンサー（100-270塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製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TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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TAT抗体又はTAT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。

【0126】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗TAT抗体又はTAT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（マイクロモル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。

【0127】

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。

【0128】

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TAT抗体又はTATポリペプチドの性質に依存する。

【0129】

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段階として、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（PMSEF）の存在下で、3

0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、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティ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 γ 1、 γ 2、又は γ 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 γ 3に推奨されている（Guss等, EMBO J. 5: 1567-1575 [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。

【0130】

H. 製薬製剤

本発明に係る抗TAT抗体及び／又はTAT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；EDTA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、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）、又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5-200mg/mlの間、好ましくは10-100mg/mlの間の濃度の抗体で構成される。

【0131】

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TAT抗体に加えて、1つの製剤に、例えば、TAT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、又は更に、この組成物は、更に化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、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 16版, Osol, A.編(1980)に開示されている。 10

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3773919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ープロリドの注射可能な小球)等の分解性乳酸-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。 20

【0132】

I. 抗T A Tポリペプチド抗体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(IHC)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IHC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10%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10%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。 30

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10%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10%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付け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付ける。

【0133】

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T A T過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。 40

T A T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)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T A T抗体には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗T A T抗体は、T A T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)。他の細胞の精製の段階として、混合細胞の集団からT A T発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体は、また、例えば、ELIS 50

A又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでT A Tポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からT A Tポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【0134】

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T A T抗体による治療は、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T A T抗体は、疾患の初期診断時及び再発中におけるT A T-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗T A T抗体は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射線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T A T抗体による治療は、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TAXOTERE（登録商標）（ドセタキセル）、TAXOL（登録商標）（パクリタキセル）、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T A T抗体を投与することができる。特に、パクリ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T A T抗体は治療的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T A T抗体は化学療法剤、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（P D R）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。

10

20

【0135】

特定の一実施態様では、細胞毒性剤に結合した抗T A T抗体を含有する免疫コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、T A T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、細胞毒性剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞毒性剤の例は、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D N Aエンドヌクレアーゼを含む。

30

抗T A T抗体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。抗体の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗T A T抗体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。

【0136】

40

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T A T抗体又は抗体類の投与を組合せることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の抗体による治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗T A T抗体（又は抗体類）と一又は複数の化学療法剤又は成長阻害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シセタキセル）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、Chem

50

otherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。

抗体は、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T A T抗体（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。

【0137】

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。上述した治療損生に加えて、抗体治療の前、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T A T抗体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への応答性、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1 k g当たり約1 μ gないし50 m g（例えば0.1 – 1.5 m g / k g / 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4 m g / k gの初期負荷量、続いて1週間に約2 m g / k gの維持用量の抗T A T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1 μ g / k gから100 m g / k g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。

【0138】

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「抗体を治療的有効量で投与する」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、D E A E -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。

【0139】

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、D O T M A、D O P E、及びD C - C h o l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ー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、細胞毒性を誘発し得る。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。

【0140】

本抗TAT抗体は、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TAT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裸の抗体は、細胞毒性剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞毒性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、細胞毒性特性を抗TAT抗体に付与することができる。この細胞毒性剤又は成長阻害剤は、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。

【0141】

本発明は、本発明の抗TAT抗体と担体を含む組成物を提供する。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TAT抗体を含むし得る。更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成長阻害剤又は細胞毒性剤とこれらの抗体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TAT抗体と担体を含む製剤も提供する。一実施態様において、製剤は製薬的に許容可能な担体を含む治療用製剤である。

本発明の他の態様は、抗TAT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TAT抗体を治療的有效量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるTAT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、TAT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TAT抗体を含むキット又は製造品も提供する。抗T

10

20

30

40

50

A T 抗体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。

【0142】

J. 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、癌患者に抗体組成物を投与する際の注意書きを更に含む。製造品は更に、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。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業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。

【0143】

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 又はウェスタンブロットのための抗体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。

【0144】

K. 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 R N A 及び D N A 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 D N A 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 D N A（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 D N A 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 D N A 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、 ^{32}P 又は ^{35}S 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 D N A、ゲノムD N A又はm R N A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。

【0145】

10

T A Tコード核酸の他の有用な断片には、標的T A T m R N A（センス）又はT A T D N A（アンチセンス）配列と結合できる一本鎖核酸配列（R N A又はD N A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 D N A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 D N A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。

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、国際公開第91/06629号に記載のもの等）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。

20

【0146】

30

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、国際公開第90/10048号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。更にまた、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、C a P O₄-媒介D N A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-M u L Vから誘導されるもの、N 2（M-M u L Vから誘導されたレトロウイルス）、又はD C T 5 A、D C T 5 B及びD C T 5 Cと命名されたダブルコピーベクター（国際公開第90/13641号参照）を含む。

40

【0147】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第91/04753号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

50

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、国際公開第90/10448号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。

【0148】

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, 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。

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。

【0149】

FcRnをコードする遺伝子は、例えば、染色体アーム19q(19番長腕)にマッピングされている。更に、染色体アーム19qの変性は、神経膠腫の予後に影響することが示されている。より具体的には、本発明は、神経膠腫における増加したレベルのFcRnを実例で示す。このFcRnのアップレギュレーションによって、神経膠腫はIgGを内在化し(神経膠腫の細胞外空間が酸性であるため)、従って、免疫監視を逃れる。

神経膠腫は、細胞形態学、悪性度、遺伝変種について不均一である。正常な脳と比較して神経膠腫では多くの変性が述べられている。本発明による発見で初めて、正常な脳でのレベルを有意に上回るレベルで大多数の神経膠腫により発現される特異的抗原が同定された。細胞外pHが酸性であることが示されている神経膠腫は、血液脳関門の機能停止も起こし、従って、血液脳関門によって極少ないIgGしか持たない正常な脳とは異なり、血清IgGに曝される。細胞外pHが酸性であることを考慮すると、神経膠腫は、FcRnの増加した発現に起因して、内在化IgGによる正常な免疫性を逃していると考えられる。

染色体19qの領域に欠損がある神経膠腫を有する患者の予後は、欠損のない場合よりもはるかに良好である。Nigro等, Am. J. Path., 158:1253-1262 (2001)。このような患者の生存期間がより長いのは、減少したFcRn発現に起因して、免疫監視を逃れようと

10

20

30

40

50

する腫瘍の能力が損なわれるためである。逆に、F c R n 発現が増加している患者では、免疫監視を逃れようとする腫瘍の能力が増すために、予後はより短い生存期間となり得る。

【0150】

T A T 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、T A T がレセプターである場合）、T A T 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 T A T 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 T A T 又は T A T 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。

また、T A T 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 D N A である。一実施形態では、T A T をコードする c D N A は、T A T をコードする D N A 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、T A T をコードするゲノム D N A 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 T A T 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 T A T 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 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。

【0151】

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、ベクターは無変換のフランキング D N A （5' と 3' 末端の両方）を数キロ塩基含む [例えば、相同的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

10

20

30

40

50

Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (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DNA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DNA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、TAT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、TAT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的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNA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RNA及びDNA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。

【0152】

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、DEAE-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TAT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TAT核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。FcRnをコードする遺伝子は、例えば、染色体アーム19qにマッピングされている。

また、本発明のTAT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TAT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に比較して疾患性組織において特異的に発現する。TAT核酸分子には、PCR、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。

【0153】

この発明は、TATポリペプチド(アゴニスト)を模倣、又はTAT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

10

20

30

40

50

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、さもないと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おこなうことができる。

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。

【0154】

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。更に、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray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 [Fields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ールドメインからなり、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 1-1 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（M A T C H M A K E R（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。

【0155】

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。更に、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。

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、例えばリガンドバニング及び 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。

【0156】

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 c D N A 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 T A T ポリペプチドとともにインキュベートする。ついで、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 T A T 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 T A T ポリペプチドの作用を競合的に阻害する T A T ポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的な T A T 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 R N A 又は D N A 作成物であり、例えば、アンチセンス R N A 又は D N A 分子は、標的 m R N A 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 m R N A 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

10

20

30

40

50

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阻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。

【0157】

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、つ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)及び国際公開第97/33551号（1997年9月18日発行）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。更なる詳細は、例えば、上掲の国際公開第97/33551号を参照。

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。

【0158】

単離されたTAT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TAT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TAT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TAT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TAT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。

TAT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、リボフェクション又はリボソームも抗体、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、細胞毒性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は成長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。

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】

10

【0159】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録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American Type Culture Collection、マナッサス、バージニアである。

【0160】

実施例1：GEPISによるTATポリペプチド及び／又はコード化核酸の同定

発現配列タグ（EST）DNAデータベース（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceutical, パロアルト, カリフォルニア）を検索し、GEPISによって興味あるEST配列を同定した。遺伝子発現プロファイリング インシリコ（GEPIS）は、ジェネンテック・インコーポレーテッドで開発されたバイオインフォマティック手法であり、新規の癌治療標的に関する対象の遺伝子の特徴付ける。GEPISは、大量のEST配列及びライブラリー情報を上手く利用し、遺伝子発現プロファイルを確認する。GEPISは、ESTデータベースでのその発現数との比例相関に基づいて、遺伝子の発現プロファイルを確認することができ、それは、LIFESEQ（登録商標）ESTリレーショナル・データベースとジェネンテック所有情報を、厳密かつ統計的に意味のある方法で統合することによって作動する。GEPISは極めて具体的な分析又は広いスクリーニング研究のいずれかをおこなうために設定することができるが、この実施例では、GEPISを、新規腫瘍抗原を同定して交差検定するために用いる。初期スクリーニングのために、GEPISを、特定の組織又は対象の組織（しばしば対象の腫瘍組織）での発現と相関するEST配列をLIFESEQ（登録商標）データベースから同定するために使用する。この初期スクリーニングで同定されるEST配列（又は、初期スクリーニングで得られた複数の関連及び重複するEST配列を整列させることによって得られるコンセンサス配列）は、次に、少なくとも一つのコードタンパク質の膜貫通ドメインの存在を同定することを意図するスクリーニングへ供した。最後に、対象の種々の配列に関する完全な組織発現プロファイルを作成するために、GEPISを用いた。このタイプのスクリーニングバイオインフォマティックスを用いて、他の癌及び／又は正常な非癌性組織と比較して、特定の型の癌又は幾つかの癌で有意に過剰発現されるものとして、種々のTATポリペプチド（及びそれらのコード化核酸分子）が同定された。GEPISでのヒットの割合は、例えば、組織特異性、腫瘍特異性及び正常な本質的組織及び／又は正常な増殖組織における発現レベルを含む幾つかの基準に基づく。下記は、GEPISで決定された組織発現プロファイルによって、他の腫瘍及び／又は正常組織と比較して、特定の腫瘍又は腫瘍群での高組織発現及び発現の顕著なアップレギュレーションがあり、場合によっては正常な本質的組織及び／又は正常な増殖組織での比較的低い発現があることが証明された分子のリストである。しかして、以下に列挙した分子は、哺乳動物の癌の診断及び治療にとっての優れたポリペプチド標的である。

20

30

40

分子	発現のアップレギュレーション が見られる腫瘍	比較対象
DNA98566 (TAT4434)	神経膠腫	正常な脳組織
DNA225918 (TAT36381)	神経膠腫	正常な脳組織

【0161】

50

実施例 2 : GeneExpress (登録商標) を利用した組織発現プロファイリング

遺伝子発現情報を含む専用データベース (GeneExpress (登録商標), Gene Logic Inc., ゲーサーズバーグ, メリーランド) を分析して、他の腫瘍及び／又は正常組織と比較して対象とする特定の腫瘍組織で発現が顕著にアップレギュレートされるポリペプチド (及びそれらのコード化核酸) の同定を試みた。具体的には、GeneExpress (登録商標) データベースの分析を、Gene Logic Inc., ゲーサーズバーグ, メリーランドを介して入手可能な GeneExpress (登録商標) データベースで使用するためのソフトウェア、又はジェネンテック社で作製されて開発された GeneExpress (登録商標) データベースで使用するための専用ソフトウェアのいずれかを利用しておこなった。この分析でのポジティブヒットの割合は、例えば、組織特異性、腫瘍特異性及び正常な本質的組織及び／又は正常な増殖組織における発現レベルを含む幾つかの基準に基づいている。下記は、GeneExpress (登録商標) データベースの分析から決定された組織発現プロファイルによって、他の腫瘍及び／又は正常組織と比較して、特定の腫瘍において高い腫瘍発現及び発現の有意なアップレギュレーションがあり、及び場合によっては、正常な本質的組織及び／又は正常増殖組織において比較的低い発現があることを証明された分子のリストである。従って、下に挙げる分子は、哺乳動物における癌の診断及び治療に関する優れたポリペプチド標的である。

分子	発現のアップレギュレーション が見られる腫瘍	比較対象
DNA98566 (TAT4434)	神経膠腫	正常な脳組織
DNA225918 (TAT36381)	神経膠腫	正常な脳組織

【0162】

実施例 3 : マイクロアレイ分析による癌性腫瘍における T A T ポリペプチドのアップレギュレーションの検出

しばしば何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、対応する正常組織と比較して病変組織においては異なって発現する遺伝子を同定するのに有用である。核酸マイクロアレイを使用し、試験及びコントロール組織試料から得られた試験及びコントロール m R N A 試料を逆転写し、c D N A プローブが生成されるように標識した。次いで c D N A プローブを固体支持体に固定した核酸のアレイにハイブリダイズした。アレイはアレイの各メンバーの配列及び位置がわかるように構成した。例えば、特定の病態に発現することが知られている遺伝子の選択を固体支持体上で配列することができるものであった。標識プローブの特定のアレイメンバーとのハイブリダイゼーションは、プローブが取得された試料がその遺伝子を発現することを示す。試験 (病変組織) 試料から得られたプローブのハイブリダイゼーションシグナルがコントロール (正常組織) 試料から得られたプローブのハイブリダイゼーションシグナルより大きい場合、病変組織に過剰発現する遺伝子を同定した。この結果により、病変組織に過剰発現するタンパク質は、病態の存在を示す診断マーカーとしてだけでなく、病態の治療の標的としても有用であることが示された。

核酸のハイブリダイゼーションの方法論及びマイクロアレイ技術は従来技術に周知である。一例では、ハイブリダイゼーション及びプローブ、スライド、及びハイブリダイゼーション条件のための核酸の特定の調製法が、2001年3月30日に出願された国際特許出願番号第 PCT/US01/10482号に詳細に開示されており、その内容を出典明示によりここに取り込む。

【0163】

本実施例では、様々なヒト組織から採取した癌性腫瘍を、他の種類の組織由来の癌性腫瘍及び／又は非癌性ヒト組織と比較した場合にアップレギュレーションされている遺伝子発現について研究し、よって特定の癌性腫瘍に過剰発現するそれらのポリペプチドを同定しようとした。特定の試験では、(しばしば同一の患者から) 同じ種類の組織の癌性ヒト腫瘍組織と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、様々なヒト腫瘍のうち任意のものから癌性ヒト腫瘍組織を取得し、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用意した「汎用性」上皮

コントロール試料と比較した。プールした組織から単離したmRNAはこれら様々な組織由来の発現遺伝子産物の混合物に相当する。プールしたコントロール試料を使用したマイクロアレイハイブリダイゼーション実験は、2色分析において線形プロットを生成した。次に、2色分析において生成された線の勾配を使用して、各実験の割合（試験：コントロールの検出）を基準化した。次いで様々な実験から基準化された割合を比較し、遺伝子発現のクラスタリングの同定に使用した。よって、プールした「汎用性コントロール」試料は、単純な2つの試料の比較において効果的な相対的遺伝子発現の測定を可能にするだけでなく、複数の実験に亘る多重試料の比較も可能とした。

本実験では、本明細書に開示するTATポリペプチドコード化核酸配列から採取した核酸プローブをマイクロアレイの作成に使用し、様々な腫瘍組織から採取したRNAをそれに対するハイブリダイゼーションに使用した。以下に示すのはこれら実験の結果である。この結果は、本発明による複数の異なるTATポリペプチドが、他のヒト腫瘍組織及び／又は非癌性ヒト組織と比較して、様々なヒト腫瘍組織に有意に過剰発現していることを示している。上述したように、これらデータは、本発明のTATポリペプチドが、1以上の癌性腫瘍の存在の診断マーカーとしてだけでなく、これら腫瘍の処置のための治療的標的として有用であることを示す。

分子	発現のアップレギュレーション が見られる腫瘍	比較対象
DNA98566 (TAT4434)	神経膠腫	正常な脳組織
DNA225918 (TAT36381)	神経膠腫	正常な脳組織

【0164】

実施例4：TATのハイブリダイゼーションプローブとしての使用

以下の方法は、TATをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとして、すなわち哺乳類における腫瘍の存在を診断するための使用を記載する。

ここに開示した完全長又は成熟TATのコード化配列を含んでなるDNAを、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリにおける相同的なDNA（例えば、TATの天然に生じる変異体をコードするもの）のスクリーニングのためのプローブとしてもまた用いられる。

いずれかのライブラリDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高ストリンジェント条件で実施した。放射標識TAT誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハート溶液、及び10%硫酸デキストランの溶液中で、42℃において20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%SDSの水溶液中、42℃で行った。

ついで、完全長天然配列TATをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0165】

実施例5：大腸菌中でのTATの発現

この実施例は、大腸菌中での組換え発現によるTATの非グリコシル化形態の調製を例証する。

TATをコードするDNA配列は、選択されたPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322（大腸菌由来のもの；Bolivar等，Gene，2:95（1977）参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸化される。PCR増幅した配列は、ついで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリ-Hisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリ-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、TATコードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びargU遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、ついで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いた選択し

10

20

30

40

50

た大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのLBプレートで成長する能力により同定され、ついで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドDNAが単離され、制限分析及びDNA配列で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したLBブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を所望の光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

数時間の細胞培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、ついで可溶化TATタンパク質を、タンパク質が強く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【0166】

以下の手法を用いて、ポリ-His（ポリ-ヒス）タグ形態でTATを大腸菌で発現させてもよい。TATをコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。ついでPCR増幅された、ポリ-Hisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52（W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq))に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30℃で振盪しながら3-5のO.D. 600に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地（3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gのKC1、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7mMのMgSO₄の混合で調製）中に50-100倍希釈し、30℃で振盪させながら約20-30時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGE分析により発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及びリフォールディングまで凍結させた。

0.5から1Lの発酵（6-10gペレット）からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4℃で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4）の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに充填した。カラムを50mMのイミダゾール（Calbiochem, Utrol grade）を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸光度により見積もった。

【0167】

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質をリフォールディングさせた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4℃で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを最終濃度0.4%（約3のpH）で添加することにより停止させた。タンパク質を更に精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1%TFAの移動バッファーと10-80%のアセトニ

10

20

30

40

50

リル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A 280吸収を持つ画分の一定分量をSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最も緻密であり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折り畳みTATポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8に調製した。 10

ここで記載されるTATポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【0168】

実施例6：哺乳動物細胞中でのTATの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるTATの潜在的なグリコシ化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてpRK5 (1989年3月15日発行のEP307247を参照のこと)を用いた。場合によっては、TAT DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてTAT DNAを挿入させる。得られたベクターは、各々pRK5-TATと呼ばれる。 20

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 µgのpRK5-TAT DNAを、VA RNA遺伝子をコードする約1 µgのDNAと混合し[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]、500 µlの1 mMトリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mMのNaCl、1.5 mMのNaPO₄を滴下添加し、25℃で10分間沈殿物を形成させた。沈殿物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2 mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、ついで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。 30

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(単独)又は200 µCi/ml³⁵S-システイン及び200 µCi/ml³⁵S-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15% SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、TATポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。 40

【0169】

これに換わる技術において、TATは、Somparyrac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載された硫酸デキストラン法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 µgのpRK5-TAT DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 µg/mlウシインシュリン及び0.1 µg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。ついで発現されたTATを含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラム 50

クロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、T A TをC H O細胞で発現させることができる。p R K 5 - T A Tは、C a P O₄又はD E A E -デキストランなどの公知の試薬を用いてC H O細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は³⁵S -メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。T A Tポリペプチドの存在を判定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたT A Tを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

【0170】

また、エピトープタグT A Tは、宿主C H O細胞において発現させてもよい。T A Tは、p R K 5 ベクターからサブクロニングした。サブクローン挿入物は、ついで、P C Rを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-H i s タグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-H i s タグT A T挿入物は、ついで、安定なクローニングのためのD H F R等の選択マーカーを含むS V 4 0誘導ベクターにサブクロニングできる。最後に、C H O細胞をS V 4 0誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-H i s タグT A Tを含む培養培地は、ついで濃縮し、N i²⁺ -キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

また、T A Tは、一過性発現法によって、C H O及び／又はC O S細胞中で、あるいは他の安定な発現法によってC H O細胞中で発現させることもできる。

C H O細胞における安定な発現は、以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、C H 2及びC H 2ドメインを含むI g G 1定常領域配列に融合したI g G作成物（イムノアドヘシン）及び／又はポリ-H i s タグ形態として発現する。

P C R増幅に続いて、それぞれのD N Aを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてC H O発現ベクターにサブクロニングした。C H O発現ベクターは、対象とするD N Aの5'及び3'に適合する制限部位を有し、c D N Aの便利なシャトル化（Shuttling）ができるように作成される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids res. 24:9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにC H O細胞での発現を用い、対象とするc D N A及びジヒドロフォレートレダクターゼ（D H F R）の発現の制御にS V 4 0初期プロモーター／エンハンサーを用いる。D H F R発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドD N Aの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect（登録商標）（Quiagen）、Dosper（登録商標）及びFugene（登録商標）（Boehringer Mannheim）を用いて約一千万のC H O細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【0171】

プラスミドD N Aを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10 mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000 rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10 mLの選択培地（0.2 μ M濾過P S 20、5%の0.2 μ M透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。ついで細胞を90 mLの選択培地を含む100 mLスピナーに分けた。1-2日後、細胞を150 mLの選択成長培地を満たした250 mLスピナーに移し、37°Cでインキュベートした。更に2-3日後、250 mL、500 mL及び2000 mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なC H O培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5122469号に記載された生産培地を使用した。3 Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とp Hを測定した。1日目に、スピナーをサンプリングし、濾過

空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプリングし、温度を33℃に変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤（例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）の30mLとした。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22μmフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi-NTAカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes、pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。充填後、カラムを更に平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトール、pH6.8を含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine（Pharmacia）カラムを用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン（Fc含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム（Pharmacia）にポンプ供給した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275μLの1Mトリスバッファー、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン（Edman）分解によりN末端アミノ酸配列決定した。

ここに開示されるTATポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【0172】

実施例7：酵母中でのTATの発現

以下の方法は、酵母中でのTATの組換え発現を記述する。

まず、ADH2/GAPDHプロモーターからのTATの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。TATをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してTATの細胞内発現を指示する。分泌のために、TATをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然TATシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又は転化酵素分泌シグナル/リーダー配列、及び（必要ならば）TATの発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、ついでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えTATは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、ついで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。TATを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いて更に精製してもよい。

ここに開示されるTATポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【0173】

実施例8：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのTATの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるTATの組換え発現を示す。

TATをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリン

ンタグ (I g G の F c 領域など) を含む。p V L 1 3 9 3 (Novagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単に述べると、T A T コード化配列、又は T A T のコード化配列の所望する部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、5' 及び 3' 領域に相補的なプライマーでの P C R により増幅される。5' プライマーは、隣接する (選択された) 制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及び BaculoGold^{T M} ウイルス D N A (Pharming) を、Spodoptera frugiperda (「S f 9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRL から市販) を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O' Reilley 等, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994) に記載されているように実施した。

【0174】

次に、発現されたポリ-H i s タグ T A T は、例えば N i ²⁺ -キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert 等, Nature, 362:175-179 (1993) に記載されているように、ウイルス感染した組み換え S f 9 細胞から調製した。簡単には、S f 9 細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー (25 mM の H e p e s、p H 7. 9; 12. 5 mM の M g C l ₂; 0. 1 mM の E D T A; 10% グリセロール; 0. 1% の N P - 40; 0. 4 M の K C l) 中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清をローディングバッファー (50 mM リン酸塩、300 mM の N a C l、10% グリセロール、p H 7. 8) で50倍希釈し、0. 45 μ M フィルターで濾過した。N i ²⁺ -N T A アガロースカラム (Qiagen から市販) を5 mL の総容積で調製し、25 mL の水で洗浄し、25 mL のローディングバッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0. 5 mL でカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点である A₂₈₀ のベースラインまでローディングバッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー (50 mM リン酸塩; 300 mM の N a C l、10% グリセロール、p H 6. 0) で洗浄した。A₂₈₀ のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500 mM イミダゾール勾配で展開した。1 mL の分画を回収し、S D S - P A G E 及び銀染色又はアルカリホスファターゼ (Qiagen) に複合した N i ²⁺ -N T A でのウェスタンブロットで分析した。溶離した H i s ₁₀ -タグ T A T を含む画分をプールしてローディングバッファーで透析した。

あるいは、I g G タグ (又は F c タグ) T A T の精製は、例えば、プロテイン A 又はプロテイン G カラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示される T A T ポリペプチドの所定のものは、この方法を使用して成功裏に発現され精製された。

【0175】

実施例 9: T A T に結合する抗体の調製

この実施例は、T A T に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。

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することなくすることができる。

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 (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) に乳化し、

10

20

30

40

50

動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、ついで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、マウスを更なる免疫化注射で追加免疫する。抗TAT抗体の検出のためのELISA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、TAT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。ついで脾臓細胞を（35%ポリエチレングリコールを用いて）、ATCCから番号CRL 1597で入手可能なP3X63AgU. 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、ついで、HAT（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、TATに対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。TAT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、当該分野での技量の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗TAT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ーボトルで成長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。

本明細書に開示された特定のTATポリペプチドを目的とした抗体は、このような技術を用いて成功裏に生産された。

【0176】

実施例10：特異的抗体を用いたTATポリペプチドの精製

天然又は組換えTATポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-TATポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-TATポリペプチドは、対象のTATポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗TATポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA（Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.）での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロースTM（Pharmacia LKB Biotechnology）等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のTATポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるTATポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化TATポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化TATポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはTATポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄される。ついで、カラムは、抗体/TATポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約2-3といった低pH、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ）で溶離され、TATポリペプチドが回収される。

【0177】

実施例11：ヒト神経膠腫での活性FcRn活性

ヒト神経膠腫での活性FcRn活性の存在を実証するために、FITC-タグヒトIg

Gの、ヒト膠芽細胞腫の凍結した非固定切片への結合をおこなった。F I T Cへのs p pリンカーを介して標識されたH u 4 D 5及びH u 4 D 5変異体（F c変異体T 3 0 7 A、E 3 8 0 A及びN 4 3 4 A）を、m l当たり1 0 0 u gの濃度で結合研究に用いた。使用したF c変異体は、p H 6. 0で、I g G 1と比較して約1 2倍の増加した結合を示す。Shields等, J. Biol. Chem., 276:6591-6604 (2001)。抗体は、0. 9 % N a C l及び1 % ウマ血清を含むp H 6. 0の5 0 m M M E Sバッファー、又は0. 9 % N a C l及び1 % ウマ血清を含むp H 7. 4の5 0 m M T r i s H C lバッファーのいずれかで、室温で1 0分間、腫瘍切片に結合させた。結合後、切片を、室温で3分間、抗体なしで同じバッファーで洗浄した。その後、切片を水性封入剤にマウントし、蛍光顕微鏡で可視化した。コントロールとして、いかなる抗体にも曝されなかった切片も試験した。

10

p H 6. 0又は7. 4で4 D 5とインキュベートした切片は、いかなる抗体ともインキュベートされなかった切片と類似した。一方、p H 6. 0で4 D 5変異体とインキュベートした切片は、試料に分散した細胞の経路で鮮やかな蛍光発光を示した。よって、F c変異体は、神経膠腫でのF c R nへの結合だけでなく、p H依存性結合（つまり、中性p Hではなく酸性p Hでの結合）をも示した。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託した構成により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、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、本発明の任意の側面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対して請求の範囲を制限す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、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

20

【図面の簡単な説明】

【0 1 7 8】

【図 1】T A T 4 4 3 4 c D N Aのヌクレオチド配列（配列番号 1）を示し、ここで配列番号 1は「D N A 9 8 5 6 6」と命名されたクローンである。

【図 2】図 1の配列番号 1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

30

【図 3】T A T 3 6 3 8 1 c D N Aのヌクレオチド配列（配列番号 3）を示し、ここで配列番号 3は「D N A 2 2 5 9 1 8」と命名されたクローンである。

【図 4】図 3の配列番号 3のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号 4）を示す。

【図 1】

TCGGCCGAGATGCTCGCTCCGTGGCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGC
CTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAAT
GSAAGCTCAATTTCTGAATGCTATGTCTGGGTTTCAATCCATCCGACATTGAAGTT
GACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAGTGGAGCAATTGAGACTTGTCTTTGAGC
AAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCACTGAAGAGATGAG
TATGCTGCGGTGTGAACCATGTGACTTTGACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGA
GACATCTAAGCAGCATCATGGAGGTTTGAAGATGCGCATTTGGATTGGATGAATTCCAA
ATTCTGCTTGTCTTCTTTTAAATTTGATATGCTTATACACTTACACTTTATGCACAAAA
TGTAGGGTTATATAATTTTAACTGACATGATCTCTTTATAATTTACTTTGAGTGC
TGCTCCCATGTTTGATGATCTTGAGCAGGTTTCTCCACAGGTAGCTCTAGAGAGGACTGGC
AACTTAGAGGTGGGAGCAGAGAAATTCCTTTATCCAAATCAACATCTTGGTCAGATTTG
AACTCTTCAATCTCTTGCACTCAAGCTTGTTAAGATAGTTAAGCTGCGATTAAGTTAACT
TCCAAATTCATACTCTGCTTAGAATTTGGGGGAAATTTAGAAATATAATTGACAGGAT
TATTGGAAATTTGTTATATGAATGAACAAATTTTGTATATAAGATTATATTACTTCT
TATKCAATTTGATATAACTAAGGATGATGTTGTGTTAATCTGTTTATTTTGTTCACAAG
TTAAATAAATCAATAAACTTGAAGAAAGAAAAA

【図 2】

MW: 13715, pI: 6.44, NX(S/T): 0
MSRSVALAVLALLSLGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENKSNFLNVCYSGFHPSDIEVDLL
KNGERI EKVEHSDLSFSKDWSYLLYYTEFTTFEKDEYACRVNHNVLSSQPKIVKWDRLM

シグナル配列

1-20

膜貫通ドメイン

なし

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー

98-104

免疫グロブリンドメイン

38-102

【図 3】

CGGGCGCAGAAGCCCTCTCGGCGTCTGSGTCCGGCGCTGCCCCGGGTGTCCGGGAG
GAAGGGGCGGGCCGGGGGTCCGGAGGAGTCACTGCCCCCTCCCGCCAGTCTGCTC
TCAGCAITGGGGTCCCGGGCTCAGGCTTGGGCGCTGGGGCTCTGCTCTTTCTCTTC
CTGGAGCTTGGGCGGAAAGCCCTCTCTCTCTGTATACACTTACCGGCTGTCT
CGCTGCCCCGGGACTCTCTGCTTCTGGGTGTCTGGGCTGGCTGGGCGCGAGCATACC
TGAGCTACAAATAGCTTGGGGGCGAGCGGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAACC
AGGTCTCTGGTATTGGGAGAAAGAGACCAAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTTTTC
TGGAAGCTTTCAAAGCTTTGGGGGGAAGGTCCCTACACTCTGAGGGCTCTGGGCT
GTGAAGCTGGGCTTACACACCTCGGTGCCCCAGGCTTGGGCTGAAAGCGGAGG
AGTTCATGAATTTGACCTCAGCAGGCGCACTTGGGTGGGAGCTGGCCGAGGCTTGG
CTATCAGTCAGCGGTGGGAGCAGCAGGACAGGCGGCCAAAGAGGCTCACTCTCTGC
TATTCTCTGCGCGACCGCTGGGGAGCACTGGAGAGGGGCGCGGAACCTCGGAGT
GGAAGGAGCCCCCTCCATGCGCTGAAGGCCGACCCAGCAGCCCTGGCTTTTCGTGC
TTACCTGCAGCGCTTCTCTCTTACCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTCTCTGGGAAATG
GGCTGGCGCTGGCAACGGCGAGGTGACTTGGGCTTCAACAGTACGGATCTTCCAGC
CTCTCTCTCTATACAGTCAAAAGTGGGCTGAGCAGCACTACTCTGCTGCTGGAGC
ACCGGGGCTGGCGAGCCCTCAGGCTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAGTCTCTCTGTC
TGCTGTTGGGAATCGTCATCGGTGTCTTGTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGGAGCTC
TGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCTTGAGTCTCTCTCTGGAGAGC
ACACCGGGTCTCTCTGCCACCCAGGGAGGCGCAGGATCTGATTTGAAGGATGTA
ATGTGATTCAGGCAACCGCTGGCCATTCGCCATTCGAGCTGCTAAAGCGAATGAGTC
AGGCCCCCTTCATGCTGTGAGACCTCTCGAACAATGGCATCTTGAAGCTCAGAGAGG
GTTCTGGGCTAGTTGTCTCTCTCTGGAGCCCGTCTGTGGTCTGCTCAGTTTCCCC
TCCTAATACATATGGCTGTTTCCACCTGATAATAAACAAGGATTTGGGCGCGA

【図 4】

MW: 39743, pI: 6.45, NX(S/T): 1
MGVPRPQFWALGLLLFLPGSLGAESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLPQCYLS
YNSLRGEAEPCGAWVWENQVSNYKEKTTDLRIKEKLPLEAFKALGGKPYTLQGLLQCE
LGPNTSVPTAKFALNGEFPNFDLKQGTWGGDWPEALAI SQRWQQDKAANKELTFLLF
SCPRLRHLERGRNLWEKPPSMRLKARPSSPGFSLTCSAFSYFPELQLRFLRNLG
AAGTGGQDGFPGNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSSVIV
VGIVIVGLLLTAAAVGGALLWRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQDADLKDVNV
IPATA

シグナル配列

1-23

膜貫通ドメイン

297-317

N-グリコシル化部位

125-128

チロシンキナーゼリン酸化部位

266-273

N-ミリスチル化部位

20-25

115-120

148-153

239-244

243-248

255-260

302-307

細胞付着配列

336-338

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー

273-279

クラス I 組織適合性抗原ドメイン

26-97

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/21606
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/02; C12P 21/06; C12N 15/85 US CL : 536/23.1; 435/69.1, 325 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1; 435/69.1, 325		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MPSRCH OF SEQ ID NO: 1, 2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	Database GenCore on EST, No. AAR60514, DENZYME APS (WO 94/18227 A2), 'Human beta-2 microglobulin', Gene Sequence, 18 August 1994, pages 1 and 2.	1-5 ----- 6-10
X --- Y	Database GenCore on EST, No. ABP43154, HUMAN GENOME SCI., INC. (WO 2002/22677 A1), 'Homo sapiens', Gene Sequence, 03 January 2002, pages 4 and 5.	1-5 ----- 6-10
X --- Y	Database GenCore on EST, Accession No. AB021288, MATSUMOTO et al. 'Human mRNA for beta 2-microglobulin', Gene sequence, 22 December 1998, pages 5 and 6.	1-5 ----- 6-10
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 March 2005 (03.03.2005)		Date of mailing of the international search report 14 JUN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MINH-TAM DAVIS <i>J. Roberts for</i> Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/21606

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/21606

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-10, drawn to a nucleic acid encoding SEQ ID NO:2, or SEQ ID NO:1, a fragment, variant or complement thereof, a nucleic acid hybridizing to said nucleic acid, a vector, a host cell, a process for producing a polypeptide.

Group 2, claim(s) 1-10, drawn to a nucleic acid encoding SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:3, a fragment, variant or complement thereof, a nucleic acid hybridizing to said nucleic acid, a vector, a host cell, a process for producing a polypeptide.

Group 3, claim(s) 11-14, 39-41, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:2, a fragment thereof, a chimeric polypeptide.

Group 4, claim(s) 11-14, 39-41, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:4, a fragment thereof, a chimeric polypeptide.

Group 5, claims 15-33, 39-41, 100, drawn to an antibody that binds to SEQ ID NO:2.

Group 6, claims 15-33, 39-42, 100, drawn to an antibody that binds to SEQ ID NO:4.

Group 7, claims 34-38, drawn to a nucleotide sequence encoding an antibody that binds to SEQ ID NO:2.

Group 8, claims 34-38, drawn to a nucleotide sequence encoding an antibody that binds to SEQ ID NO:4.

Group 9, claims 43-81, drawn to a method for treating cancer, using an antibody that binds to SEQ ID NO:2.

Group 10, claims 43-81, drawn to a method for treating cancer, using an antibody that binds to SEQ ID NO:4.

Group 11, claims 82-99, drawn to a method for detecting cancer, comprising detecting the presence or overexpression of SEQ ID NO:2.

Group 12, claims 82-99, drawn to a method for detecting cancer, comprising detecting the presence or overexpression of SEQ ID NO:4.

The inventions listed as Groups 1-12 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

An international stage application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. When claims to different categories are present in the application, the claims will be considered to have unity of invention if the claims are drawn only to one of the following combinations of categories: (1) A product and a process specially adapted for the manufacture of said product; or (2) A product and a process of use of said product; or (3) A product, a process specially adapted for the manufacture of the said product, and a use of the said product; or (4) A process and an apparatus or means specifically designed for carrying out the said process; or (5) A product, a process specially adapted for the manufacture of the said product, and an apparatus or means specifically designed for carrying out the said process. If multiple products, processes of manufacture or uses are claimed, the first invention of the category first mentioned in the claims of the application will be considered as the main invention in the claims, see PCT article 17(3) (a) and 1.476 (c), 37 C.F.R. 1.475(b) and (d). Group 1 will be the main invention. After that, all other products and methods will be broken out as separate groups (see 37 C.F.R. 1.475(d).)

Group 1, claims 1-10 form a single general inventive concept.

Groups 2-8 are not linked to the single general inventive concept of group 1, because the nucleic acid of group 2, the polypeptides of groups 3-4, the antibodies of groups 5-6, and the nucleic acids of groups 7-8 do not share a common structure with the polynucleotide of SEQ ID NO:1 of group 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/21606

Groups 9-12 are not linked to the single general inventive concept of group 1, because the methods of groups 9-12 do not use the polynucleotide of SEQ ID NO:1 of group 1.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/435
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K 16/32
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y
			G 0 1 N 33/574 A
			C 1 2 N 5/00 A

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

(72)発明者 メン, ユーージュ, ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94706, アルバニー, ベンチュラ アヴェニュー 1033

(72)発明者 バンドレン, リチャード, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバラ, ヘイン ロード 1015

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA38 BA54 CA01 CA04 CA09 DA02 DA05
DA12 HA12 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ58 QQ79 QR32 QR48 QR55 QR62
QS25 QS33 QS34
4B064 AG13 AG27 AG30 AG31 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 AA16 BB07 CC21 DD62 FF01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA72 CA41 DA76 DA83 DA86 EA28
EA31 EA51 FA72 FA74