(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-211153
(P2012-211153A)
(43)公開日　平成24年11月1日(2012.11.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/32	(2006.01)	C07K	16/32	ZNA	4B024
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	E	4B064
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	T	4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C085
G01N 33/574	(2006.01)	A61K	37/02		4H045

審査請求 有　請求項の数 91　ＯＬ　（全 109 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-130881 (P2012-130881)
(22)出願日　平成24年6月8日 (2012.6.8)
(62)分割の表示　特願2008-545754 (P2008-545754)の分割
原出願日　平成18年12月12日 (2006.12.12)
(31)優先権主張番号　60/749,716
(32)優先日　平成17年12月12日 (2005.12.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　508030006
バイエル・ヘルスケア・エルエルシー
アメリカ合衆国コネチカツト州０６５１６
ウエストヘブン・モーガンレーン４００
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　ポール・タンバリニ
アメリカ合衆国コネチカツト州０６０３７
ケンジントン・デボンシヤーウエイ８０
(72)発明者　ジエラルド・ランジエス
アメリカ合衆国コネチカツト州０６５１７
ハムデン・フイルバートストリート３９
(72)発明者　リラ・アドネーン
アメリカ合衆国コネチカツト州０６４３３
マデイソン・コンコードドライブ２８
最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗M抗体およびそれらを使用する方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体、ならびにＭＮ関連疾患を処置することおよび診断することにおいてそのような抗体を使用する方法を提供する。
【解決手段】細胞表面タンパク質ＭＮに結合しそして癌の処置、予防および／もしくは診断において使用することができる抗体、例えばモノクローナル抗体、もしくは抗体フラグメント。抗体はさらに細胞毒性薬、例えばモノメチルアウリスタチン－Ｅに連結することができ、そして／または１つもしくはそれ以上の追加の抗癌剤と共投与するかもしくは調合することができる。抗ＭＮ抗体および免疫コンジュゲートは癌、例えば充実性腫瘍を処置しそして／もしくは診断しそして／もしくはモニターするために使用することができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原結合部位が少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項２】
抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項３】
抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項４】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項５】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；

（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項６】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項７】
抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項８】
抗体がＩｇＧである請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項９】
抗体がＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＭ　Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体もしくは多重特異性抗体である請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１０】
抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１１】
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１２】
請求項１に記載の抗体もしくはその抗体フラグメントおよび１つもしくはそれ以上の製薬学的補助剤を含んでなる組成物。
【請求項１３】
配列同一性が約８５％より大きい請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１４】
配列同一性が約９０％より大きい請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１５】
配列同一性が約９５％より大きい請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１６】
配列同一性が約９９％より大きい請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【請求項１７】
細胞毒性薬に連結した特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、Ｃ

ＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
ＭＮタンパク質に対して反応性の組成物。
【請求項１８】
抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項１７に記載の組成物。
【請求項２０】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる請求項１７に記載の組成物。
【請求項２１】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５

よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項１７に記載の組成物。

【請求項２２】

抗原結合部位が：

（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６

よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項１７に記載の組成物。

【請求項２３】

細胞毒性薬が：モノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログ、モノメチルアウリスタチン－Ｆもしくはその機能性アナログ、アプリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン－１、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ＳＮ－３８、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロキシウリジン（ＦＵｄＲ）、３’，５’－Ｏ－ジオレオイル－ＦｕｄＲ（ＦＵｄＲ－ｄＯ）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、Ｌ－アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、ＰＳＩ－３４１、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ベルケイド、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、ｒａｐＬＲ１、ＤＮアーゼＩ、ブドウ球菌エンテロトキシン－Ａ、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素、シュードモナス菌内毒素およびその組み合わせよりなる群から選択される請求項１７に記載の組成物。

【請求項２４】

細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである請求項１７に記載の組成物。

【請求項２５】

抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する請求項１７に記載の組成物。

【請求項２６】

抗体がＩｇＧである請求項１７に記載の組成物。

【請求項２７】

抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭアイソタイプ、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である請求項１７に記載の組成物。

【請求項２８】

抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される請求項１７に記載の組成物。

【請求項２９】

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである請求項１７に記載の組成物。

【請求項３０】

抗癌剤および細胞毒性薬に連結した特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：

（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；

（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして

（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、

ＭＮ関連癌を有する患者を処置するための組成物。

【請求項３１】

抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項３０に記載の組成物。

【請求項３２】

抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項３０に記載の組成物。

【請求項３３】

抗原結合部位が：

（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；

（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；

（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；

（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；

（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；

（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；

（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；

（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；

（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに

（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６

よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる請求項３０に記載の組成物。

【請求項３４】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項３０に記載の組成物。
【請求項３５】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項３０に記載の組成物。
【請求項３６】
抗癌剤がブレオマイシン、ドセタキセル（タキソテール）、ドキソルビシン、エダトレキセート、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド、フィナステリド（プロスカー）、フルタミド（ユーレキシン）、ゲムシタビン、（ジェムザール）、ゲフィチニブ（ｇｅｎｉｔｉｎｉｂ）（イレッサ）、酢酸ゴセレリン（ゾラデックス）、グラニセトロン（カイトリル）、イマチニブ（グリーベック）、イリノテカン（カンプト／カンプトサル）、オンダンセトロン（ゾフラン）、パクリタキセル（タキソール）、ペグアスパラガーゼ（ｐｅｇａｓｐａｒａｇａｓｅ）（オンキャスパー）、塩酸ピロカルピン（サラジェン）、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン）、インターロイキン－２（プロロイキン）、リツキシマブ（リツキサン）、トポテカン（ハイカムチン）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トリアピン、ビンクリスチン、酒石酸ビノレルビン（ナベルビン）および治療抗体もしくはそのフラグメントよりなる群から選択される請求項３０に記載の組成物。
【請求項３７】
抗癌剤がアンジオスタチン、ベバシズマブ（アバスチン(R)）、ソラフェニブ（ネクサバール(R)）、バキュロスタチン（ｂａｃｕｌｏｓｔａｔｉｎ）、カンスタチン、マスピン、抗ＶＥＧＦ抗体もしくはペプチド、抗胎盤成長因子抗体もしくはペプチド、抗Ｆｌｋ－１抗体、抗Ｆｌｔ－１抗体もしくはペプチド、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン１２、ＩＰ－１０、Ｇｒｏ－β、トロンボスポンジン、２－メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、ＣＭ１０１、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンジオポエチン２、インターフェロン－アルファ、ハービマイシンＡ、ＰＮＵ１４５１５６Ｅ、１６Ｋプロラ

クチンフラグメント、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、ＴＮＰ－４７０、エンドスタチン、パクリタキセル、アククチン（ａｃｃｕｔｉｎ）、シドフォビル、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ＡＧＭ－１４７０、血小板第４因子およびミノサイクリンよりなる群から選択される抗血管新生剤である請求項３０に記載の組成物。

【請求項３８】

抗癌剤がタモキシフェン、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡよりなる群から選択される多剤耐性表現型を阻止するかもしくは抑制する薬剤である請求項３０に記載の組成物。

【請求項３９】

細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである請求項３０に記載の組成物。

【請求項４０】

細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである請求項３１のいずれか一つに記載の組成物。

【請求項４１】

抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する請求項３０に記載の組成物。

【請求項４２】

抗体がＩｇＧである請求項３０に記載の組成物。

【請求項４３】

抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭアイソタイプ、Ｆａｂフラグメント、$F(ab')_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である請求項３０に記載の組成物。

【請求項４４】

抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される請求項３０に記載の組成物。

【請求項４５】

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである請求項３０に記載の組成物。

【請求項４６】

配列同一性が約８５％より大きい請求項３０に記載の組成物。

【請求項４７】

配列同一性が約９０％より大きい請求項３０に記載の組成物。

【請求項４８】

配列同一性が約９５％より大きい請求項３０に記載の組成物。

【請求項４９】

配列同一性が約９９％より大きい請求項３０に記載の組成物。

【請求項５０】

癌が充実性腫瘍の形態である請求項３０に記載の組成物。

【請求項５１】

充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する請求項５０に記載の組成物。

【請求項５２】

疑わしい罹患組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルを対応する健常組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルと比較することを含んでなり、ここで、疑わしい罹患組織もしくは細胞における異常なＭＮレベルはＭＮ関連疾患の指標であり、該比較する段階は請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメントで罹患組織および健常組織におけるＭＮのレベルを検出することをさらに含んでなる、異常なＭＮレベルを特徴とするＭＮ関連疾患を診断

する方法。
【請求項５３】
ＭＮ関連疾患が癌である請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
癌が充実性腫瘍の形態である請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する請求項５２に記載の方法。
【請求項５６】
比較する段階が
ａ）健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；
ｂ）疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；および
（ｃ）（ａ）および（ｂ）からのＭＮタンパク質のレベルを比較する段階
をさらに含んでなり、ここで、健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルと比較した場合に疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質の上昇したレベルはＭＮ関連疾患の存在を示す請求項５２に記載の方法。
【請求項５７】
検出する段階が核画像化モダリティ（ｎｕｃｌｅａｒ　ｉｍａｇｉｎｇ　ｍｏｄａｌｉｔｙ）により成し遂げられる請求項５２に記載の方法。
【請求項５８】
核画像化モダリティがＳＰＥＣＴもしくはＰＥＴである請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメントおよびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【請求項６０】
請求項１７に記載の組成物およびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【請求項６１】
請求項３０に記載の組成物およびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【請求項６２】
配列同一性が約８５％より大きい請求項１７に記載の組成物。
【請求項６３】
配列同一性が約９０％より大きい請求項１７に記載の組成物。
【請求項６４】
配列同一性が約９５％より大きい請求項１７に記載の組成物。
【請求項６５】
配列同一性が約９９％より大きい請求項１７に記載の組成物。
【請求項６６】
特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントの治療的に有効な量を投与することを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配

列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
患者におけるＭＮの異常なレベルを特徴とするＭＮ関連疾患を処置する方法。
【請求項６７】
抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる請求項６６に記載の方法。
【請求項６９】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる請求項６６に記載の方法。
【請求項７０】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項６６に記載の方法。
【請求項７１】
抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；

（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる請求項６６に記載の方法。
【請求項７２】
抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する請求項６６に記載の方法。
【請求項７３】
抗体がＩｇＧである請求項６６に記載の方法。
【請求項７４】
抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭ、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である請求項６６に記載の方法。
【請求項７５】
抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される請求項６６に記載の方法。
【請求項７６】
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである請求項６６に記載の方法。
【請求項７７】
配列同一性が約８５％より大きい請求項６６に記載の方法。
【請求項７８】
配列同一性が約９０％より大きい請求項６６に記載の方法。
【請求項７９】
配列同一性が約９５％より大きい請求項６６に記載の方法。
【請求項８０】
配列同一性が約９９％より大きい請求項６６に記載の方法。
【請求項８１】
抗体もしくは抗体フラグメントが細胞毒性薬に連結される請求項６６の方法。
【請求項８２】
細胞毒性薬が：モノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログ、モノメチルアウリスタチン－Ｆもしくはその機能性アナログ、アプリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン－１、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ＳＮ－３８、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロキシウリジン（ＦＵｄＲ）、３’，５’－Ｏ－ジオレオイル－ＦｕｄＲ（ＦＵｄＲ－ｄＯ）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、Ｌ－アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、ＰＳＩ－３４１、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカ

ン、ウラシルマスタード、ベルケイド、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、ｒａｐＬＲ１、ＤＮアーゼＩ、ブドウ球菌エンテロトキシン－Ａ、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素、シュードモナス菌内毒素およびその組み合わせよりなる群から選択される請求項８１に記載の方法。

【請求項８３】

細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである請求項８２に記載の方法。

【請求項８４】

抗癌剤を共投与することをさらに含んでなる請求項６６に記載の方法。

【請求項８５】

抗癌剤がブレオマイシン、ドセタキセル（タキソテール）、ドキソルビシン、エダトレキセート、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド、フィナステリド（プロスカー）、フルタミド（ユーレキシン）、ゲムシタビン（ジェムザール）、ゲフィチニブ（イレッサ）、酢酸ゴセレリン（ゾラデックス）、グラニセトロン（カイトリル）、イマチニブ（グリーベック）、イリノテカン（カンプト／カンプトサル）、オンダンセトロン（ゾフラン）、パクリタキセル（タキソール）、ペグアスパラガーゼ（オンキャスパー）、塩酸ピロカルピン（サラジェン）、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン）、インターロイキン－２（プロロイキン）、リツキシマブ（リツキサン）、トポテカン（ハイカムチン）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トリアピン、ビンクリスチン、酒石酸ビノレルビン（ナベルビン）および治療抗体もしくはそのフラグメントよりなる群から選択される請求項８４に記載の方法。

【請求項８６】

抗癌剤がタモキシフェン、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡよりなる群から選択される多剤耐性表現型を阻止するかもしくは抑制する薬剤である請求項８４に記載の方法。

【請求項８７】

ＭＮ関連疾患が癌である請求項６６に記載の方法。

【請求項８８】

癌が充実性腫瘍癌である請求項８７に記載の方法。

【請求項８９】

充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する請求項８８に記載の方法。

【請求項９０】

抗原結合部位が：

（ａ）配列番号：１３３の重鎖可変領域および配列番号：１３４の軽鎖可変領域；

（ｂ）配列番号：１３５の重鎖可変領域および配列番号：１３６の軽鎖可変領域；

（ｃ）配列番号：１３７の重鎖可変領域および配列番号：１３８の軽鎖可変領域；

（ｄ）配列番号：１３９の重鎖可変領域および配列番号：１４０の軽鎖可変領域；

（ｅ）配列番号：１４１の重鎖可変領域および配列番号：１４２の軽鎖可変領域；

（ｆ）配列番号：１４３の重鎖可変領域および配列番号：１４４の軽鎖可変領域；

（ｇ）配列番号：１４５の重鎖可変領域および配列番号：１４６の軽鎖可変領域；

（ｈ）配列番号：１４７の重鎖可変領域および配列番号：１４８の軽鎖可変領域；

（ｉ）配列番号：１４９の重鎖可変領域および配列番号：１５０の軽鎖可変領域；ならびに

（ｊ）配列番号：１５１の重鎖可変領域および配列番号：１５２の軽鎖可変領域

よりなる群から選択される１対の重鎖可変および軽鎖可変領域を含有する請求項１に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。

【請求項９１】

配列番号：１５３のヌクレオチド配列によりコードされる抗ＭＮ　ＩｇＧ抗体。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［引用による組み込み］
本願は、２００５年１２月１２日に出願された米国仮特許出願第６０／７４９，７１６号の利益を請求する。
【０００２】
前述の出願、ならびにその中に引用される全ての書類およびその中に引用されるかもしくは参照される全ての書類、ならびに本明細書に引用されるかもしくは参照される全ての書類（「本明細書に引用される書類」）、ならびに本明細書に引用される書類に引用されるかもしくは参照される全ての書類は、本明細書にもしくは本明細書に引用することにより組み込まれる任意の書類に記載される任意の製品の任意の製造業者の説明書、記述、製品仕様書および製品シートと一緒に、本明細書に引用することにより本明細書に組み込まれ、そして本発明の実施において用いることができる。
【０００３】
本発明は、ＭＮタンパク質に対する特異性を有する抗体および／もしくはそのフラグメントに関する。本発明はさらに抗体および／もしくは免疫コンジュゲート組成物ならびにＭＮ関連疾患、例えば癌を処置すること、予防することおよび／もしくは診断することにおけるそれらの使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
癌の発生は最も一般的には加齢と関連し、そのため癌の全ての新規症例の６５％は６５歳以上の患者について記録される。癌は、心臓疾患のみが上回る、米国における第二位の死亡原因である。実際に、米国癌協会は、現在の死亡率が変化しないままであると仮定して、米国において４人に１人が癌で死亡すると概算している。米国だけで、１，３９９，７６０の新規症例および５６４，８３０の癌による死亡が２００６年に予想される。これらの新規症例の大部分は、結腸（１０６，６８０）、肺（１７２，５７０）および乳房（２１４，６４０）の癌であると予想される。さらに、癌の発生率および罹患率は両方とも、１．４％の平均増加率を反映して、今後１０年間にわたって約１５％増加すると予測される（非特許文献１）。
【０００５】
１つの最近同定された腫瘍関連抗原、ＭＮ、細胞表面タンパク質は、多数の臨床癌腫において発現されることが見出されている。例えば、ＭＮは１００％の腎細胞癌（非特許文献２）、１００％の食道癌（非特許文献３）、９０％より多くの子宮頸癌（非特許文献２）、７６％の悪性結腸癌（非特許文献４）、８０％の非小細胞肺癌（非特許文献５）において、そして４８％の乳癌（非特許文献６）において異所的に発現されることが見出されている。他の腫瘍関連抗原のように、ＭＮタンパク質はまた、例えば胃、胆管粘膜および小腸に位置する非常に増殖性の正常細胞を包含する限られた数の正常組織の細胞上にも存在する（非特許文献７）。
【０００６】
ヒトＭＮ　ｃＤＮＡはクローン化され、そしてシークエンスされている（非特許文献８）。予測されるタンパク質はシグナルペプチド、プロテオグリカン関連配列、カルボニックアンヒドラーゼドメイン（カルボニックアンヒドラーゼＩＸもしくはＣＡ　ＩＸ）、膜貫通セグメントおよび短い細胞内尾部からなる。カルボニックアンヒドラーゼＩＸドメインは、炭酸への二酸化炭素の可逆的水和を触媒する。この活性は、腫瘍環境の細胞外部分の局所酸性化を調節することにおいて役割を有することができ、それは結果としてプロテアーゼの活性化そして最終的に転移をもたらし得る。
【０００７】
ＭＮ発現の調節もまた調べられている。１つの態様において、例えば、ＭＮ発現は低酸素によりアップレギュレーションされる。低酸素誘導性因子－１（ＨＩＦ－１）として知

られている転写複合体は、ＭＮ発現の調節因子である。従って、ＭＮは、低酸素への腫瘍応答の理解において意味を有するＨＩＦ－１応答遺伝子として知られている（非特許文献９）。さらに、ＭＮ発現は腫瘍低酸素レベルと相関関係があり、そして子宮頸癌における全生存および無転移生存の予後指標である（非特許文献１０）。ＭＮ発現はまた、高い平均血管密度、進行した癌の病期、頭頸部癌における壊死の程度（非特許文献１１）、鼻咽頭癌における低い生存（非特許文献１２）、腫瘍壊死、より高い悪性度、陰性エストロゲン受容体状態、より高い再発率および浸潤性乳癌の低い生存（非特許文献６）とも相関関係がある。従って、ＭＮ抗原の発現は低い生存予後およびより高い悪性度の癌と相関関係がある。

【０００８】

これらの侵襲性の強い癌の新規のそして改善された治療、特にＭＮ発現を標的とするものは非常に望ましく、そして当該技術分野における進歩を表す。そのようなものとして、本発明はＭＮ関連癌の処置、予防および／もしくは診断において有用である新規抗体組成物およびその免疫コンジュゲートを開示する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，２００６
【非特許文献２】Ｌｉａｏ，ＳＹ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１９９７，５７：２８２７－２８３１
【非特許文献３】Ｔｕｒｎｅｒ　ＪＲ，Ｈｕｍ．Ｐａｔｈｏｌ．，１９９，２８：７４０－７４４
【非特許文献４】Ｓａａｒｎｉｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．，１９９７，１５３：２７９－２８５
【非特許文献５】Ｖｅｒｍｙｌｅｎ　Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｊ．，１９９９，１４：８０６－８１１
【非特許文献６】Ｃｈｉａ　ＳＫ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２００１，１９：３６６０－３６６８
【非特許文献７】Ｓａａｒｎｉｏ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，１９９８，４６：４９７－５０４
【非特許文献８】Ｐａｓｔｏｒｅｋ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，１９９４，９：２８７７－２８８８
【非特許文献９】Ｗｙｋｏｆｆ　ＣＣ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２０００，６０：７０７５－７０８３
【非特許文献１０】Ｌｏｎｃａｓｔｅｒ，ＪＡ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２０００，６０：７０７５－７０８３
【非特許文献１１】Ｂｅａｓｌｅｙ　ＮＪＰ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２００１，６１：５２６２－５２６７
【非特許文献１２】Ｈｕｉ　ＥＰ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２００２，８：２６９５－２６０４

【発明の概要】

【００１０】

［発明の要約］

本発明は、細胞表面タンパク質ＭＮに結合しそして癌の処置、予防および／もしくは診断において使用することができる抗体、例えばモノクローナル抗体、もしくは抗体フラグメントに関する。本発明の抗体はさらに細胞毒性薬、例えばモノメチルアウリスタチンＥに連結することができ、そして／または１つもしくはそれ以上の追加の抗癌剤と共投与するかもしくは調合することができる。本発明の抗ＭＮ抗体および免疫コンジュゲートは癌、例えば充実性腫瘍を処置しそして／もしくは診断しそして／もしくはモニターするために本発明の方法において使用することができる。

【００１１】
１つの態様において、本発明は抗体もしくは抗体フラグメント、または抗体もしくは抗体フラグメントを含む組成物を提供し、ここで、抗体もしくは抗体フラグメントは特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する。抗原結合部位は、少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３、またはＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３と一緒にＣＤＲ１、またはＣＤＲ１もしくはＣＤＲ３と一緒にＣＤＲ２、またはＣＤＲ１もしくはＣＤＲ２と一緒にＣＤＲ３、またはその任意の組み合わせを含むことができる。ＣＤＲ１は、配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７および１０８よりなる群から選択することができる。ＣＤＲ２は、配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９および１１０よりなる群から選択することができる。ＣＤＲ３は、配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１および１１２よりなる群から選択することができる。本発明のこの態様のＣＤＲ配列はまた、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３の各々について示される上記の配列のいずれかに好ましくは約８０％より大きい配列同一性、より好ましくは約８５％より大きい配列同一性、さらにより好ましくは約９０％の配列同一性、なおより好ましくは約９５％もしくはさらに約９９％の配列同一性、そしてさらに約１００％までの配列同一性を有するアミノ酸配列を含むこともできる。

【００１２】
別の態様において、抗原結合部位は配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを有することができる。

【００１３】
抗原結合部位はまた、配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを有することもできる。

【００１４】
抗原結合部位はまた、６個のＣＤＲの以下の組：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
を含む１組の特定のＣＤＲ配列から選択することもできる。

【００１５】
抗原結合部位はまた：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；

（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含むこともできる。
【００１６】
抗原結合部位は：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含むこともできる。
【００１７】
さらに別の態様において、本発明は：
（ａ）配列番号：１３３の重鎖可変領域および配列番号：１３４の軽鎖可変領域；
（ｂ）配列番号：１３５の重鎖可変領域および配列番号：１３６の軽鎖可変領域；
（ｃ）配列番号：１３７の重鎖可変領域および配列番号：１３８の軽鎖可変領域；
（ｄ）配列番号：１３９の重鎖可変領域および配列番号：１４０の軽鎖可変領域；
（ｅ）配列番号：１４１の重鎖可変領域および配列番号：１４２の軽鎖可変領域；
（ｆ）配列番号：１４３の重鎖可変領域および配列番号：１４４の軽鎖可変領域；
（ｇ）配列番号：１４５の重鎖可変領域および配列番号：１４６の軽鎖可変領域；
（ｈ）配列番号：１４７の重鎖可変領域および配列番号：１４８の軽鎖可変領域；
（ｉ）配列番号：１４９の重鎖可変領域および配列番号：１５０の軽鎖可変領域；ならびに
（ｊ）配列番号：１５１の重鎖可変領域および配列番号：１５２の軽鎖可変領域
よりなる群から選択される１対の重鎖可変および軽鎖可変領域を含有する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントを提供する。
【００１８】
本発明の抗体もしくは抗体フラグメントは、好ましくは約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合することができる。
【００１９】
別の態様において、本発明の抗体もしくはフラグメントはＩｇＧ抗体もしくはＩｇＧフラグメントである。抗体もしくは抗体フラグメントはまたＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭ抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、多重特異性抗体もしくはキメラ抗体（例えば、ヒトもしくは非ヒト抗体結合領域に移植したヒト抗体骨格、またはヒトもしくは非ヒト抗体結合領域に移植した非ヒト抗体骨格を含んでなる）であることもできる。キメラ抗体は、例えばウシ、マウス、ラマ、ラクダもしくはウサギのような非ヒト供給源からの例えば抗体骨格領域を含むことができる。抗体工学に関するさらなる情報は文献、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ａｎｄ Ｈｕｄｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（Ｓｅｐ，２００５）２３：１１２６－１１３６に見出されることができる。上記のフラグメントは免疫グロブリンから得られるか、もしくはフラグメントの形態で適当な手段、例えば組換え発現により製造されることができる。
【００２０】

本発明の抗体もしくは抗体フラグメントはまたヒト化されることもでき、ここで、ＣＤＲ配列もしくは領域（例えばＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）は非ヒト、例えばネズミ科動物であることができる。

【００２１】

本発明の抗体もしくは抗体フラグメント、または抗体もしくはフラグメントを含む組成物は、抗体もしくはフラグメントに連結される細胞毒性薬を含むことができる。１つの態様において、細胞毒性薬はモノメチルアウリスタチン－Ｅ（ＭＭＡＥ）であり、しかしながら、他の細胞毒性薬もまた提供され、それらには例えば、ＭＭＡＥの機能性アナログ（例えばモノメチルアウリスタチン－Ｆ）および他の細胞毒性薬、例えばアプリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン－１、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ＳＮ－３８、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロキシウリジン（ＦＵｄＲ）、３’，５’－Ｏ－ジオレオイル－ＦｕｄＲ（ＦＵｄＲ－ｄＯ）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、Ｌ－アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、ＰＳＩ－３４１、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ベルケイド、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、ｒａｐＬＲ１、ＤＮアーゼＩ、ブドウ球菌エンテロトキシン－Ａ、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素およびシュードモナス菌内毒素、もしくはその組み合わせを包含することができる。細胞毒性薬のいずれも、その機能性アナログを含むこともできる。

【００２２】

本発明の組成物は、抗体およびフラグメント（上記の連結した細胞毒性薬を有するもしくは有さない）に加えて様々な抗癌剤を含むことができ、それらには例えばブレオマイシン、ドセタキセル（タキソテール）、ドキソルビシン、エダトレキセート、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド、フィナステリド（プロスカー）、フルタミド（ユーレキシン）、ゲムシタビン（ジェムザール）、ゲフィチニブ（イレッサ）、酢酸ゴセレリン（ゾラデックス）、グラニセトロン（カイトリル）、イマチニブ（グリーベック）、イリノテカン（カンプト／カンプトサル）、オンダンセトロン（ゾフラン）、パクリタキセル（タキソール）、ペグアスパラガーゼ（オンキャスパー）、塩酸ピロカルピン（サラジェン）、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン）、インターロイキン－２（プロロイキン）、リツキシマブ（リツキサン）、トポテカン（ハイカムチン）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トリアピン、ビンクリスチンおよび酒石酸ビノレルビン（ナベルビン）または治療抗体もしくはそのフラグメント、あるいは例えばアンジオスタチン、ベバシズマブ（アバスチン(R)）、ソラフェニブ（ネクサバール(R)）、バキュロスタチン、カンスタチン、マスピン、抗ＶＥＧＦ抗体もしくはペプチド、抗胎盤成長因子抗体もしくはペプチド、抗Ｆｌｋ－１抗体、抗Ｆｌｔ－１抗体もしくはペプチド、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン１２、ＩＰ－１０、Ｇｒｏ－β、トロンボスポン

ジン、２－メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、ＣＭ１０１、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンジオポエチン２、インターフェロン－アルファ、ハービマイシンＡ、ＰＮＵ１４５１５６Ｅ、１６Ｋプロラクチンフラグメント、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、ＴＮＰ－４７０、エンドスタチン、パクリタキセル、アククチン、シドフォビル、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ＡＧＭ－１４７０、血小板第４因子およびミノサイクリンのような抗血管新生剤を包含することができる。

【００２３】

本発明はさらに、別の態様において本発明の抗体および／もしくはフラグメント、または本発明の抗体および／もしくはフラグメントを含む本発明の組成物の治療的に有効な量を投与することによりＭＮ関連疾患を処置する方法を提供する。ＭＮ関連疾患には、例えば充実性腫瘍癌のような癌を包含することができる。充実性腫瘍は、乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来することができる。

【００２４】

別の態様において、本発明は疑わしい罹患組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルを対応する健常組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルと比較することを含んでなる異常なＭＮレベルを特徴とするＭＮ関連疾患を診断する方法を提供し、ここで、疑わしい罹患組織もしくは細胞における異常なＭＮレベルはＭＮ関連疾患の指標であり、該比較する段階は、本発明の抗体もしくは抗体フラグメントで罹患組織および健常組織におけるＭＮのレベルを免疫アッセイにより検出することをさらに含んでなる。

【００２５】

特定の態様において、本発明は、免疫アッセイが：（ａ）健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；（ｂ）疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；ならびに（ｃ）（ａ）および（ｂ）からのＭＮタンパク質のレベルを比較する段階を含むＭＮ関連疾患を診断する方法を提供する。健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルと比較した場合に疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質の上昇したレベルは、ＭＮ関連疾患の存在を示す。

【００２６】

また本発明により提供されるのは、本発明の抗体もしくは抗体フラグメント、あるいはまた本発明の組成物、およびＭＮ関連疾患を処置する方法においてもしくはＭＮ関連疾患を診断するためにキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキットである。

【００２７】

これらのおよび他の態様は開示されるか、もしくは以下の詳細な記述から明らかでありそしてそれにより包含される。

【００２８】

例として与えられるが、記述される特定の態様にだけ本発明を限定するものではない以下の詳細な記述は、添付の図面と併せて最もよく理解されることができる。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

［発明の記述］

本明細書に記載のとおりの本発明は、記載の抗ＭＮ抗体、免疫コンジュゲート、処置の方法、プロトコル、細胞系、動物種もしくは属、構築物および試薬を包含する本発明の任意の態様に関して本明細書に記載される特定の詳細に限定されるものではなく、そしてそのようなものとして異なり得ることが理解されるべきである。本明細書において使用する専門用語は特定の態様のみを記述する目的のためであり、そして本発明の範囲を限定するものではないこともまた理解されるべきである。

【００３０】

定義

他に定義されない限り、本明細書において使用する全ての技術および科学用語は、本発

明が属する当業者によって一般に理解される意味を有する。しかしながら、以下の参考文献は、本発明が関連する当業者に本発明において使用する用語の多くの一般的定義を提供することができ、そしてそのような定義が当該技術分野において一般に理解される意味と一致する限り参照しそして使用することができる。そのような参考文献には、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（２ｄ ｅｄ．１９９４）；Ｔｈｅ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｗａｌｋｅｒ ｅｄ．，１９８８）；Ｈａｌｅ ＆ Ｍａｒｈａｍ，Ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９１）；およびＬａｃｋｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｅｌｌ ＆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（３ｄ ｅｄ．１９９９）；およびＣｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｅｄｓ．Ａｂｂａｓ，Ｌｉｃｈｔｍａｎ ａｎｄ Ｐｏｂｅｒ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏｍｐａｎｙが包含されるがこれらに限定されるものではない。当該技術分野において一般に理解される意味を有する本明細書において使用する用語の定義を提供する当業者に利用可能な任意の追加の技術的資源を参考にすることができる。本発明の目的のために、以下の用語がさらに定義される。追加の用語は、記述の他の所に定義される。

【００３１】

本明細書においてそして添付の請求項において用いる場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」には、文脈が他に明らかに指示しない限り複数の言及が包含される。従って、例えば、「１つの遺伝子（ａ ｇｅｎｅ）」への言及は１つもしくはそれ以上の遺伝子への言及であり、そして当業者に既知であるその同等物が包含されるなど。

【００３２】

本明細書において用いる場合、「抗体」という用語には天然から単離されるかもしくは組換え手段により製造される免疫グロブリン分子（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹを包含する任意のタイプ、ならびに／もしくはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２を包含する任意のクラス）が包含される。抗体にはまた、完全な免疫グロブリンから製造されるかもしくは組換え手段により製造される、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ（一般鎖Ｆｖｓ）、Ｆｖ、一本鎖抗体、ジアボディ、ジスルフィド結合したＦｖｓ（ｓｄＦｖ）、およびＶ$_L$もしくはＶ$_H$ドメインを含んでなるフラグメントのような抗原結合抗体フラグメントも包含されるものとする。

【００３３】

本発明の抗体および／もしくは抗原結合抗体フラグメントは、単一特異性（例えばモノクローナル）、二重特異性、三重特異性であるかもしくはより大きい多重特異性のものであることができる。多重特異性抗体は、抗原の異なるエピトープに特異的であることができ、もしくは１つより多くの抗原のエピトープに特異的であることができる。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９３／１７７１５；ＷＯ９２／０８８０２；ＷＯ９１／００３６０；ＷＯ９２／０５７９３；Ｔｕｔｔ，ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０ ６９；米国特許第４，４７４，８９３号；第４，７１４，６８１号；第４，９２５，６４８号；第５，５７３，９２０号；第５，６０１，８１９号；Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７ １５５３を参照、これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる。

【００３４】

抗原結合抗体フラグメントは、単独でもしくは以下のもの：ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＬドメインの全部もしくは一部と組み合わせて可変領域（１つもしくは複数）を含んでなることができる。また本発明に包含されるのは、ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＬドメインと可変領域（１つもしくは複数）の任意の組み合わせもまた含んでなる抗原結合抗体フラグメントである。

【００３５】
好ましくは、抗体もしくは抗原結合抗体フラグメントはヒト、ヒト化、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ科動物、ウマもしくはニワトリである。本明細書において用いる場合、「ヒト」抗体にはヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が包含され、以下にそして例えばＫｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ ｅｔ ａｌによる米国特許第５，９３９，５９８号に記述されるように、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、ヒトＢ細胞から、または１つもしくはそれ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックの動物から単離された抗体が包含される。抗体という用語はまた、ＣＤＲが由来する自然抗体の結合活性に対してこれらのキメラタンパク質で認められる標的抗原の結合が維持されるように自然抗体に存在するものと同じ活性結合構造に抗体ＣＤＲインサートを配置することができる他のタンパク質骨格にも及ぶ。

【００３６】
本明細書において用いる場合、非ヒト（例えばネズミ科動物）抗体の「ヒト化」形態という用語は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基（例えば相補性決定領域「ＣＤＲ」）が所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギもしくは非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）からの超可変領域残基（ＣＤＲ）で置換されるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合において、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で置換されることができる。さらに、ヒト化抗体はレシピエント抗体にもしくはドナー抗体に存在しない残基を含んでなることができる。そのような改変は、抗体性能をさらに改善するために行われる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも１つのもしくは典型的には２つの可変領域の実質的に全てを含んでなることができ、ここで、超可変領域の全てもしくは実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そしてＦＲの全てもしくは実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は場合により免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含んでなってもよい。概説には、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５，１９８６）；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９，１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ，（Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６，１９９２）を参照。ヒト化抗体の製造は、米国特許第７，０４９，１３５号、第６，８２８，４２２号、第６，７５３，１３６号、第６，７０６，４８４号、第６，６９６，２４８号、第６，６９２，９３５号、第６，６６７，１５０号、第６，６５３，０６８号、第６，３００，０６４号、第６，２９４，３５３号および第５，５１４，５４８号に見出されることができ、これらの各々はそれらの全部が本明細書に組み込まれる。

【００３７】
本明細書において用いる場合、「一本鎖Ｆｖ」もしくは「ｓＦｖ」抗体フラグメントという用語は抗体のV_HおよびV_Lドメインを含んでなり、ここで、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Ｆｖポリペプチドは、ｓＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするV_HとV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含んでなる。概説には、引用することによりその全部が本明細書に組み込まれる、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５，１９９４）を参照。

【００３８】
「ジアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小抗体フラグメントをさし、これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖（V_H－V_L）において軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結された重鎖可変ドメイン（V_H）を含んでなる。短すぎるために同じ鎖上の２つのドメイン間の対合を与えないリンカーを用いることにより、これらのドメイン

はもう一つの鎖の相補的ドメインと対合して２つの抗原結合部位を生じさせられる。ジアボディは、例えば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８，１９９３）にさらに十分に記述され、これらの各々は引用することにより組み込まれる。

【００３９】

「線状抗体」という表現は、当該技術分野において、例えば引用することにより組み込まれる、Ｚａｐａｔａ，ｅｔ ａｌ．，（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２，１９９５）に記述される抗体をさす。簡潔に言えば、そのような抗体は１対の抗原結合領域を形成する１対のタンデムＦｄセグメント（$V_H-C_H1-V_H-C_H1$）を含んでなる。線状抗体は、二重特異性もしくは単一特異性であることができる。

【００４０】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、微量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一の集団を含んでなる個々の抗体をさす。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、すなわち、単一の抗原部位に向けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む通常の（ポリクローナル）抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に向けられる。「モノクローナル」という修飾語句は、抗体の実質的に均質な集団から得られるとして抗体の特徴を示し、そして任意の特定の方法による抗体の製造を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５，１９７５）により最初に記述されたハイブリドーマ法により製造することができ、もしくは組換えＤＮＡ法（例えば米国特許第４，８１６，５６７号を参照）により製造することができる。モノクローナル抗体はまた、例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８，１９９１）およびＭａｒｋｓ，ｅｔ ａｌ．，（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７，１９９１）に記述される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。

【００４１】

本明細書におけるモノクローナル抗体にはまた、所望の生物学的活性を示す限り、重鎖および／もしくは軽鎖の一部が、特定の種から得られるかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一であるかもしくは相同であり、一方、鎖（１つもしくは複数）の残りの部分が別の種から得られるかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一であるかもしくは相同である「キメラ」抗体、ならびにそのような抗体のフラグメントも包含される（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５，１９８４を参照、これらの各々は引用することにより組み込まれる）。

【００４２】

本明細書において用いる場合、「生体サンプル」もしくは「患者サンプル」という用語は、本明細書において用いる場合に、生物体からもしくは生物体の構成要素（例えば細胞）から得られるサンプルをさす。サンプルは、任意の生物学的組織もしくは液のものであることができる。サンプルは、患者から得られるサンプルである「臨床サンプル」であることができる。そのようなサンプルには、他の体液サンプルの中でも、痰、血液、血清、血漿、血液細胞（例えば白血球）、組織サンプル、生検サンプル、尿、腹水および胸膜液、唾液、精液、乳房浸出液（ｂｒｅａｓｔ ｅｘｕｄａｔｅ）、脳脊髄液、涙液、粘液、リンパ液、サイトゾル、腹水、羊水、膀胱洗浄および気管支肺胞洗浄もしくはそれからの細胞が包含されるが、これらに限定されるものではない。患者サンプルは新鮮であるかもしくは凍結されることができ、そしてヘパリン、クエン酸塩もしくはＥＤＴＡで処理することができる。生体サンプルにはまた、組織学的目的のために取られた凍結切片のような組織の切片を包含することもできる。

【００４３】
「癌」という用語には、乳房、気道、脳、生殖器官、消化管、尿路、眼、肝臓、皮膚、頭頸部、甲状腺、副甲状腺の癌のような充実性腫瘍、およびそれらの遠隔転移が包含されるがこれらに限定されるものではない。該用語にはまた、肉腫、リンパ腫、白血病および形質細胞性骨髄腫も包含される。
【００４４】
乳癌の例には、浸潤性腺管癌、浸潤性小葉癌、非浸潤性腺管癌および非浸潤性小葉癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。気道の癌の例には、小細胞および非小細胞肺癌、ならびに気管支腺腫および胸膜肺芽腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。脳腫瘍の例には、脳幹および視床下部（ｈｙｐｏｐｈｔａｌｍｉｃ）グリオーマ、小脳および大脳星状細胞腫、髄芽細胞腫、上衣細胞腫、ならびに神経外胚葉性および松果体部腫瘍が包含されるがこれらに限定されるものではない。男性生殖器官の腫瘍には、前立腺癌および精巣癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。女性生殖器官の腫瘍には、子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌、膣癌および外陰癌、ならびに子宮の肉腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。消化管の腫瘍には、肛門癌、結腸癌、結腸直腸癌、食道癌、胆嚢癌、胃癌、膵臓癌、直腸癌、小腸癌および唾液腺癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。尿路の腫瘍には、膀胱癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌および尿道癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。眼癌には、眼内黒色腫および網膜芽細胞腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。肝臓癌の例には、肝細胞癌（繊維層板バリアント（ｆｉｂｒｏｌａｍｅｌｌａｒ　ｖａｒｉａｎｔ）を有するもしくは有さない肝細胞癌）、胆管癌（肝内胆管癌）および混合型肝細胞胆管癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。皮膚癌には、扁平上皮細胞癌、カポジ肉腫、悪性黒色腫、メルケル細胞皮膚癌および非黒色腫皮膚癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。頭頸部癌には、喉頭癌／下咽頭癌／鼻咽頭癌／口腔咽頭癌、ならびに口唇および口腔癌が包含されるがこれらに限定されるものではない。リンパ腫には、エイズ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚Ｔ細胞性リンパ腫、ホジキン病および中枢神経系のリンパ腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。肉腫には、軟組織の肉腫、骨肉種、悪性線維性組織球腫、リンパ肉腫および横紋筋肉腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。白血病には、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病および有毛細胞白血病が包含されるがこれらに限定されるものではない。
【００４５】
本発明において用いる場合、「エピトープ」という用語は、それに対して抗体が抗原結合部位を介して結合する、抗原、例えばＭＮタンパク質上の任意の抗原決定基を意味する。決定基もしくは抗原決定基は、通常はアミノ酸もしくは糖側鎖のような分子の化学的に活性の表面集団からなり、そして通常は特定の３次元構造特性ならびに特定の荷電特性を有する。
【００４６】
「特異的に免疫反応性である」という用語は、抗体と抗体の抗原結合部位により認識されるエピトープを有するタンパク質、化合物もしくは抗原との間の結合反応をさす。この結合反応は、タンパク質および他のバイオロジック（ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ）の不均一な集団の存在の中で認識エピトープを有するタンパク質、抗原もしくはエピトープの存在を決定する。免疫アッセイとの関連において、特異的に免疫反応性である抗体は認識エピトープを有するタンパク質に結合し、そしてサンプルに存在するエピトープを欠く他のタンパク質にたとえあったとしてもより低い程度に検出可能に結合することができる。インビボ関連において、「特異的に免疫反応性である」は動物においてワクチンもしくは抗原に対する免疫応答、例えば抗原に対する体液性応答（免疫学的に反応性の条件下でそれに提示されるワクチン、タンパク質、化合物もしくは抗原に対する抗体の生産）もしくは細胞性（本明細書において「細胞性免疫応答」、すなわち、それに提示されるワクチン、タンパク質、化合物もしくは抗原に対するＴリンパ球により媒介される応答としても）を生じる

条件をさすことができる。

【００４７】

本明細書において用いる場合、「免疫学的に反応性の条件」という用語は、免疫アッセイもしくはインビトロ反応との関連において使用され、ここで、例えば温度、塩濃度、ｐＨ、試薬およびそれらの濃度、ならびに抗原および抗原に特異的に免疫反応性であるコグネイト抗体の濃度を包含する反応の物理的条件は、抗原へのコグネイト抗体の結合を可能にするように与えられるかもしくは調整される。免疫学的に反応性の条件は抗体結合反応の形態によって決まり、そして典型的には免疫アッセイプロトコルにおいて利用されるものである。免疫アッセイ形態および条件の記述については、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照。

【００４８】

「患者（ｐａｔｉｅｎｔ）」もしくは「患者（ｓｕｂｊｅｃｔ）」という用語には、本明細書において用いる場合、哺乳類（例えばヒトおよび動物）が包含される。

【００４９】

抗体

本発明は、ＭＮに結合する抗体に関する。これらの抗体は、様々な治療および診断目的のために有用であることができる。

【００５０】

抗体選択性および結合親和性の最も重要な決定要因は配列および結果として生じる相補性領域（ＣＤＲ）の構造であることは当業者により一般に認識される。大部分の抗体は６個のＣＤＲ、重鎖可変領域（ＶＨ）内に３個そして軽鎖可変領域（ＶＬ）内に３個を含有する。ＶＨおよびＶＬ内のＣＤＲ間の介在配列は、ＣＤＲを配置するフレームワーク領域である。ＣＤＲは一緒になって抗体内の抗原結合部位を形成する。抗体の機能特性を決定することにおけるこれらのＣＤＲの重要な役割は、抗体ヒト化および抗体最適化の方法において長い間利用されている。前者の方法において、モノクローナル抗体、例えばマウス抗体からのＣＤＲは同様のフレームワーク設計のヒト抗体に導入され、それによりヒトにおける同じ機能特性および減少した免疫原性を有する抗体をもたらす。

【００５１】

この方法の成功は、ヒト治療法として成功裏に商業化されているヒト化抗体の数から明らかであり、そしてハーセプチン(R)（トラスツズマブ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、シナジス(R)（パリビズマブ，Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）、キャンパス(R)（アレムツズマブ，Ｇｅｎｚｙｍｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）、ゼナパックス(R)（ダクリズマブ，Ｒｏｃｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｌａｓ，Ｎｕｔｌｅｙ，ＮＪ）、ゾレア(R)（オマリズマブ，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、ラプティバ(R)（エファリズマブ，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、アバスチン(R)（ベバシズマブ，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）およびマイロターグ(R)（ゲムツズマブオゾガマイシン，Ｗｙｅｔｈ－Ａｙｅｒｓｔ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＮＪ）が包含される。他の例は、Ｓｉｎｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１５０：２８４４－２８５７，１９９３）；Ｌｕｏ，ｅｔ ａｌ．，（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈ．，２７５：３１－４０，２００２）；およびＫｏｓｔｅｌｎｙ，ｅｔ ａｌ．，（Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ９３；５５６－５６５，２００１）に記述されている。

【００５２】

抗体最適化の方法は、ＣＤＲの配列における特定の改変による抗体選択性もしくは結合親和性の改善に焦点を合わせる。ＣＤＲは治療および診断用途に必要とされる結合親和性および選択特性をコードし、そしてこれらのＣＤＲ配列は当業者に既知である標準的な方

法を用いて多種多様な代替抗体フレームワークにそのような望ましい機能特性を与えるために使用できることは、抗体開発の分野内で一般に認められている。免疫グロブリンスーパーファミリー内の他のタンパク質および免疫グロブリンと同様のフォールド（ｆｏｌｄ）を有する非免疫グロブリンのような免疫グロブリン様フォールドを有する他のタンパク質上に抗体ＣＤＲを移植することにより抗体結合活性を導入することもまた可能である（Ｎｉｃａｉｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　１３：１８８２－１８９１，２００４）。

【００５３】

本発明は、本発明の抗体および抗原結合抗体フラグメントの製造のための任意の既知のもしくは適当な技術を意図する。

【００５４】

例えば、ファージディスプレイ技術は、ＭＮ関連癌のようなＭＮ関連疾患の診断および／もしくは処置における使用のための本発明の高親和性抗ＭＮ抗体もしくは抗原結合抗体フラグメントを得るために有用である。親和性成熟と呼ばれる技術は、最初のもしくは親抗体と比較した場合に抗原に対してより高い親和性で結合する抗体を同定するために突然変異誘発もしくはＣＤＲウォーキングおよびＭＮ抗原を使用する再選択を用いる（例えば、Ｇｌａｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１４９：３９０３を参照）。単一ヌクレオチドよりむしろ全コドンを突然変異させることによりアミノ酸突然変異の半ランダム化レパートリーをもたらす。その各々が単一のＣＤＲにおける単一のアミノ酸改変によって異なりそして各ＣＤＲ残基の各可能なアミノ酸置換を表すバリアントを含有するバリアントクローンのプールからなるライブラリーを構築することができる。抗原に対する増加した結合親和性を有する突然変異体は、標識抗原を含有する固定化突然変異体との接触によりスクリーニングすることができる。抗原に対する増加したアビディティを有する突然変異体抗体を同定するために当該技術分野において既知である任意のスクリーニング方法を用いることができる（例えばＥＬＩＳＡ）（引用することにより組み込まれる、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：６０３７；Ｙｅｌｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１５５：１９９４を参照）。ＣＤＲウォーキングもまた軽鎖をランダム化するために用いることができる（引用することにより組み込まれる、Ｓｃｈｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．２６３：５５１を参照）。

【００５５】

特定の例において、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ　ＡＧ（ドイツ）は完全にヒトの抗体を作製するために用いることができるファージ抗体技術を提供する。Ｍｏｒｐｈｏｓｙｓ　ＨｕＣＡＬ　ＧＯＬＤライブラリーは、Ｒａｕｃｈｅｎｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，（引用することにより組み込まれる、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：３８１９４－３８２０５，２００３）に記述されるＨｕＣＡＬ－Ｆａｂ　１ライブラリーを包含する該技術の以前のバージョン（引用することにより組み込まれる、Ｋｎａｐｐｉｋ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９６：５７－８６，２０００）に対して多数の進歩を提供する。以前のバージョンのように、ＨｕＣＡＬ　ＧＯＬＤはヒト共通フレームワーク配列および自然ヒト配列多様性を模倣するＣＤＲ可変性のパターンを特徴とするヒト抗体設計を取り入れる。しかしながら、多様性は６個全ての抗体ＣＤＲを含むようにＨｕＣＡＬ　ＧＯＬＤにおいて拡張される。さらに、高親和性抗体の回収はＣｙｓＤｉｓｐｌａｙ™特性によって増大される（Ｋｒｅｔｚｓｃｈｍａｒ　ａｎｄ　ｖｏｎ　Ｒｕｄｅｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１３：５９８－６０２，２００２）。この技術で得られる抗体は、免疫原性の非常に減少した可能性を示す。

【００５６】

Ｍｏｒｐｈｏｓｙｓから入手可能であるもののようなファージディスプレイ技術は当該技術分野において既知であり、そしてＢｏｅｈｎｃｋｅ　ＷＨ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ　Ｊ　Ｄｅｒｍａｔｏｌ．（２００５），Ｎｏｖ；１５３（５）：１０９２；Ｓｉｍｏｎ　Ｍｏｒｏｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｄｅｒｎ　Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ；

Ｊ．Ｋｎａｅｂｌｅｉｎ編集，Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ Ｖｅｒｌａｇ（２００５）；Ｒａｌｆ Ｏｓｔｅｎｄｏｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｖｏｌｕｍｅ ２：Ｎｏｖｅｌ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｕｓｅ，ｐ．１３－５２，（２００４），Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｒ．Ｒａｕｃｈｅｎｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，（２００３），Ｏｃｔ ３，２７８（４０）：３８１９４－３８２０５；Ｔ．Ｋｒｅｔｚｓｃｈｍａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，（２００２），Ｄｅｃ，１３（６）：５９８－６０２；Ｋｒｅｂｓ Ｂ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，（２００１），Ａｕｇ １，２５４（１－２）；Ｍ．Ｍａｒｇｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ，（２０００），５６：１－９；Ａ．Ｋｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，（２０００），Ｆｅｂ １１，２９６（１）：５７－８６；およびＡ．Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（１９９７），Ｊｕｎ；３（２）：８３－１０５にさらに言及することができ、これらの各々はそれらの全部が引用することにより本明細書に組み込まれる。

【００５７】

例として、ＭＮ結合および細胞接着中和活性を有する抗体は、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ技術を用いて同定することができる。ＭＮタンパク質をマイクロタイタープレートもしくは磁気ビーズ上に被覆し、そしてＭｏｒｐｈｏＳｙｓ ＨｕＣＡＬ－ＧＯＬＤ Ｆａｂファージライブラリーとインキュベーションすることができる。ＭＮに結合しないファージ連結Ｆａｂをプレートから洗浄し、ＭＮに結合するファージのみを残すことができる。ファージに抗体を連結するジスルフィド結合の切断をもたらすジチオスレイトール（ＤＴＴ）のようなチオール還元剤の添加により結合したファージを溶出することができる。回収されるファージ集団をＭＮ結合抗体フラグメントを発現するファージで濃縮することができ、そしてエシェリキア・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）宿主の感染により増幅することができる。ＭＮに結合するファージ連結抗体の集団についてさらに濃縮するためにファージの濃縮集団を用いてこのパンニング方法を繰り返すことができる。次に、Ｆａｂをコードする遺伝子配列を標準的なクローニング技術を用いて切り出し、そして細菌（例えばエシェリキア・コリ）発現ベクターもしくは哺乳類発現ベクターのような発現ベクターに導入することができ、それはＣＨＯもしくはエシェリキア・コリ発現細胞系のような宿主細胞系を形質転換するために用いられる。次に、濃縮プールからのＦａｂを発現させ、そして精製することができる。

【００５８】

あるいはまた、パンニングは、抗原としてＭＮ発現細胞を用いて行うことができる。例えば、ＭＮ抗原でトランスフェクションした細胞をビオチンで標識することができる。次に、これらのトランスフェクションした細胞を１：１０の標識：非標識比率で非標識の非ＭＮトランスフェクション細胞と混合することができる。ファージライブラリーを細胞に加え、そして磁石に結合されるストレプトアビジン結合磁気ビーズでビオチニル化ＭＮ保有細胞を捕獲する。非特異的ファージを洗浄して除き、そして磁場を取り除くことによりＭＮ保有細胞を特異的に溶出する。これらの特異的に結合したファージを細胞パンニングのさらなるラウンドにわたって増幅することができ、またはペプチドおよび／もしくはタンパク質パンニングと交互に行うことができる。

【００５９】

抗体は、下記のような様々な他の技術により製造することができる。例えば、抗体を得るための別の方法は、Ｄｏｗｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（引用することにより組み込まれる、ＷＯ９１／１７２７１）およびＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，ｅｔ ａｌ．，（ＷＯ９２／０１０４７）（これらの各々はその全部が引用することにより組み込まれる）により記述されるようにＢ細胞からＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることである。これらの方法において、メンバーがそれらの外側表面上に異なる抗体を提示するファージのライブラリーが製造される。抗体は、通常、ＦｖもしくはＦａｂフラグメントとして提示される。抗

体を提示するファージは、選択したタンパク質への結合についての親和性濃縮により選択される。

【００６０】

ファージディスプレイ法のバリエーションにおいて、選択したネズミ科動物抗体の結合特異性を有するヒト抗体を製造することができる（例えば、引用することにより組み込まれる、ＷＯ９２／２０７９１）。この方法において、選択したネズミ科動物抗体（例えば５Ｃ７．２９）の重鎖もしくは軽鎖可変領域のいずれかを出発材料として用いることができる。例えば、軽鎖可変領域が出発材料として選択される場合、メンバーが同じ軽鎖可変領域（すなわち、ネズミ科動物出発材料）および異なる重鎖可変領域を提示するファージライブラリーを構築することができる。重鎖可変領域は、再構成したヒト重鎖可変領域のライブラリーから得ることができる。タンパク質に対する強い特異的結合を示すファージ（例えば、少なくとも１０ｎＭもしくは少なくとも１ｎＭ）が選択される。次に、このファージからのヒト重鎖可変領域は、さらなるファージライブラリーを構築するための出発材料として役立つ。このライブラリーにおいて、各ファージは同じ重鎖可変領域（すなわち、最初のディスプレイライブラリーから同定される領域）および異なる軽鎖可変領域を提示する。軽鎖可変領域は、再構成したヒト可変軽鎖領域のライブラリーから得ることができる。この場合も同様に、強い特異的結合を示すファージが選択される。

【００６１】

別の例として、抗体はまたトリオーマ方法論を用いて製造することもできる。基本的方法および典型的な細胞融合相手、この方法において使用するＳＰＡＺ－４は、Ｏｅｓｔｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，（各々、引用することにより組み込まれる、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　２：３６１－３６７，１９８３；米国特許第４，６３４，６６４号）；およびＥｎｇｌｅｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．，（引用することにより組み込まれる、米国特許第４，６３４，６６６号）により記述されている。この方法により得られる抗体産生細胞系は、３つの細胞－２つのヒトおよび１つのマウスに由来するので、トリオーマと呼ばれる。最初に、マウス骨髄腫系統をヒトＢリンパ球と融合させてＳＰＡＺ－４細胞系のような非抗体産生異種ハイブリッド細胞を得る。次に、免疫したヒトＢリンパ球と異種細胞を融合させて抗体産生トリオーマ細胞系を得る。トリオーマは、ヒト細胞から製造される通常のハイブリドーマより安定に抗体を生産することが見出されている。

【００６２】

Ｂリンパ球は、ヒトドナーの血液、脾臓、リンパ節もしくは骨髄から得られる。タンパク質での生きているヒトのインビボ免疫は、有害な反応を開始する危険性のために通常は望ましくない。従って、Ｂリンパ球は、通常、タンパク質（例えばＭＮ）もしくはその抗原フラグメント、または該タンパク質（例えばＭＮ）を保有する細胞でインビトロで免疫される。例示されたネズミ科動物抗体の１つに結合するアミノ酸セグメントから本質的になる特定のエピトープフラグメントをインビトロ免疫に用いることができる。Ｂリンパ球は、典型的に、１０％ヒト血清を補足したＲＰＭＩ－１６４０のような培地において７～１４日の期間にわたって抗原にさらされる（例えば、米国特許第４，６３４，６６６号を参照）。

【００６３】

免疫したＢリンパ球は、当該技術分野において既知である方法によりＳＰＡＺ－４のような異種ハイブリッド細胞に融合させることができる。例えば、細胞をＭＷ１，０００～４，０００の４０～５０％ポリエチレングリコールで約３７℃で約５～１０分間処理することができる。細胞を融合混合物から分離し、そして所望のハイブリッドに対して選択的である培地（例えば、ＨＡＴもしくはＡＨ）において増殖させることができる。必要とされる結合特異性を有する抗体を分泌するクローンは、非ヒト抗体について上記に説明したのと同じ方法を用いてタンパク質（例えばＭＮ）に結合する能力についてトリオーマ培養培地をアッセイすることにより同定することができる。所望の特異性を有するヒト抗体を生産するトリオーマは、例えば、限界希釈技術によりサブクローン化し、そして培養培地においてインビトロで培養することができる。

【００６４】
トリオーマは遺伝的に安定であるが、それらは非常に高いレベルで抗体を生産することができない。発現レベルは、抗体遺伝子をトリオーマから１つもしくはそれ以上の発現ベクターにクローン化しそして組換えもしくはヒト化免疫グロブリンの発現のための細胞系のような細胞系にベクターを形質転換することにより増加することができる。
【００６５】
タンパク質（例えばＭＮ）と交差反応するヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくともセグメントをコードする導入遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック哺乳類から製造することもできる。通常、そのようなトランスジェニック哺乳類の内因性免疫グロブリン遺伝子座は機能的に不活性化される。ヒト免疫グロブリン遺伝子座のセグメントは、重鎖および軽鎖成分の非再構成配列を含むことができる。内因性免疫グロブリン遺伝子の不活性化および外来免疫グロブリン遺伝子の導入は両方とも、標的化相同組換えにより、もしくはＹＡＣ染色体の導入により成し遂げることができる。この方法から得られるトランスジェニック哺乳類は、免疫グロブリン成分配列を機能的に再構成し、そして内因性免疫グロブリン遺伝子を発現することなしに、ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる様々なアイソタイプの抗体のレパートリーを発現することができる。これらの特性を有する哺乳類の製造および特性は、例えば、Ｌｏｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，（ＷＯ９３／１２２２７）；およびＫｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ，（ＷＯ９１／１０７４１）（これらの各々は、その全部が引用することにより組み込まれる）により詳細に記述される。交差反応するＭＮヒト抗体は、上記のようなトランスジェニック非ヒト哺乳類を免疫することにより得ることができる。モノクローナル抗体は、例えば、従来のＫｏｈｌｅｒ－Ｍｉｌｓｔｅｉｎ技術（引用することにより組み込まれる、Ｋｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－４９７，１９７５）を用いて適当な骨髄腫細胞系にそのような哺乳類からのＢ細胞を融合させることにより製造することができる。
【００６６】
タンパク質（例えばＭＮ）と交差反応するマウスもしくは他の非ヒト抗体は、様々な免疫戦略を用いて得ることができる。いくつかの戦略において、非ヒト動物（通常はマウスのような非ヒト哺乳類）は、ＭＮ抗原で免疫することができる。免疫原には、ＭＮで安定にトランスフェクションされそしてそれらの細胞表面上にＭＮを発現する細胞、およびＭＮタンパク質もしくは例示される交差反応抗体に結合するこれらの分子のセグメントを含有するエピトープフラグメントを包含することができる。免疫した動物から得られる抗体産生細胞を不死化し、そしＭＮに特異的に結合する抗体の生産に関して選択することができる（例えば、引用することにより組み込まれる、Ｈａｒｌｏｗ　＆　Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃ．Ｓ．Ｈ．Ｐ．，Ｎ．Ｙ．，１９８８）。結合は、例えば、第二の標識を保有する適切な二次抗体を用いて検出することができる。次に、交差反応する抗体は、ＭＮを発現する細胞に選択的細胞毒性を導くそれらの能力についてさらにスクリーニングすることができる。
【００６７】
本発明は、選択したマウスもしくは他の非ヒト抗体と同様の結合特異性および親和性を有するヒト化抗体にも関する。ヒト化抗体は、組換えＤＮＡ技術（例えば、Ｑｕｅｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１００２９－１００３３，１９８９；ＷＯ９０／０７８６１；各々それらの全部が引用することにより組み込まれる）、すなわち、ＣＤＲ移植によりヒトフレームワークおよび定常領域に非ヒト抗体のＣＤＲ領域（例えば、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）を連結することにより形成することができる。これらのヒト化免疫グロブリンは、実質的にヒト免疫グロブリン（アクセプター免疫グロブリンと呼ばれる）からの可変領域フレームワーク残基および実質的にマウス免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリンと呼ばれる）からの相補性決定領域（ＣＤＲ）を有する。定常領域（１つもしくは複数）もまた、存在する場合、実質的にヒト免疫グロブリンからであることができる。

【００６８】
原則として、任意のヒト抗体からのフレームワーク配列はＣＤＲ移植の鋳型として働くことができる。しかしながら、そのようなフレームワーク上への直接ＣＤＲ置換は、抗原に対する結合親和性の有意な喪失をしばしばもたらすことが示されている（Ｇｌａｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：２６０６，１９９２）；Ｔｅｍｐｅｓｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：２６６，１９９２；Ｓｈａｌａｂｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７：２１７，１９９２）。ヒト抗体が元のネズミ科動物抗体に相同であるほど、ヒトフレームワークとネズミ科動物ＣＤＲとを組み合わせることにより親和性を減少し得るひずみをＣＤＲに導入する可能性は低い。従って、好ましくは少なくとも約６５％、より好ましくは少なくとも約７５％、さらにより好ましくは少なくとも約８５％、そしてさらにより好ましくは約９５％もしくは約９９％のヒト化抗体可変領域フレームワークとドナー抗体可変領域フレームワーク間の相同性（すなわち、パーセント配列同一性）が示唆される。

【００６９】
重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク残基は、同じもしくは異なるヒト抗体配列に由来することができる。しかしながら、同じヒト抗体から選択される重鎖および軽鎖フレームワーク配列は、２本の鎖の会合における不適合の可能性を減らす。ヒト抗体配列は天然に存在するヒト抗体の配列であることができ、もしくはいくつかのヒト抗体の共通配列であることができる（例えば、引用することにより組み込まれる、ＷＯ９２／２２６５３）。ヒト可変領域フレームワーク残基からのある種のアミノ酸は、ＣＤＲ構造および／もしくは抗原に対する結合へのそれらの可能な影響に基づいて置換のために選択されることができる。そのような可能な影響の分析は、モデリング、特定の位置でのアミノ酸の特性の試験、または特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異誘発の影響の実験観察により成し遂げることができる。

【００７０】
例えば、アミノ酸がネズミ科動物可変領域フレームワーク残基と選択したヒト可変領域フレームワーク残基間で異なる場合、ヒトフレームワークアミノ酸は、アミノ酸が：
（１）抗原と直接接触すること、
（２）配列においてＣＤＲ領域に隣接すること、もしくは
（３）そうでなければＣＤＲ領域と相互作用すること（例えば、ＣＤＲ領域の約４～６Å以内であること）
が合理的に予想される場合にマウス抗体からの同等なフレームワークアミノ酸で置換することができる。

【００７１】
置換の他の候補は、例えば、その位置でヒト免疫グロブリンには珍しいアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、ドナー抗体の同等な位置からのもしくはより典型的なヒト免疫グロブリンの同等な位置からのアミノ酸で置換することができる。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは、例えば、ヒト可変領域フレームワーク配列もしくはそのような配列の大多数に、少なくとも好ましくは約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、なおより好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、そしてさらにより好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を示すことができる。

【００７２】
本発明はまた、タンパク質（例えばＭＮ）に特異的に結合する１つの結合部位および第二の部分に特異的に結合する第二の結合部位を有する二重特異性もしくは二機能性抗体にも関する。二重特異性抗体において、一方の重鎖および軽鎖対は通常は例えばＭＮ結合抗体からであり、そしてもう一方の対は別のエピトープに対する抗体からである。これは多機能価（ｍｕｌｔｉ－ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｖａｌｅｎｃｙ）、すなわち、同時に少なくとも２つの異なるエピトープに結合する能力をもたらす。

【００７３】

結合アッセイ

本発明の抗体もしくは抗体フラグメントと本発明の抗原（ＭＮタンパク質）との間の結合（もしくは親和性）の強さを表すための任意の有用な手段を用いることができる。例えば、解離定数、Ｋ$_{d}$（Ｋ$_{d}$＝ｋ２／ｋ１＝［抗体］［抗原］／［抗体－抗原複合体］）は、当該技術分野において既知である標準的な速度論的分析により決定することができる。解離定数は、複合体を分離することがどのくらい容易であるかに関して抗体と抗原との間の結合の強さを示すことが当業者により理解される。複合体を形成するために高濃度の抗体および抗原が必要とされる場合、結合の強さもしくは親和性は低く、より高いＫ$_{d}$をもたらす。Ｋ$_{d}$（濃度単位、例えばモルもしくはナノモルで表されるような）が小さいほど結合は強いという結果になる。

【００７４】

親和性は、例えば、酵素結合免疫特異的（ｉｍｍｕｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃ）アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、２分子相互作用分析（ＢＩＡ）（例えば、各々引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ ａｎｄ Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８－２３４５，１９９１；Ｓｚａｂｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５，１９９５）およびＭＮを発現する細胞に結合する抗体の定量化のための蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を包含する様々な既知の技術および免疫アッセイにより評価しそして／もしくは測定することができる。ＢＩＡは、反応体のいずれかを標識することなしに、リアルタイムで生体特異的相互作用を分析するための技術である（例えばＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}）。ＢＩＡｃｏｒｅは、本発明の抗体およびＭＮタンパク質抗原のような生物学的分子間のリアルタイムの反応における光学現象表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の変化を決定することに基づく。ＢＩＡｃｏｒｅ技術に関する参考文献は、米国公開出願第２００６／０２２３１１３号、第２００６／０１３４８００号、第２００６／００９４０６０号、第２００６／００７２１１５号、第２００６／００１９３１３号、第２００６／００１４２３２号および第２００５／０１９９０７６号にさらに見出されることができ、これらの各々は引用することによりそれらの全部が本明細書に組み込まれる。

【００７５】

タンパク質（例えばＭＮ）に特異的に結合する本発明の抗体もしくは抗原結合抗体フラグメントは、免疫化学アッセイにおいて使用する場合に他のタンパク質に与えられる検出シグナルより例えば好ましくは少なくとも約５倍高い、より好ましくは少なくとも約１０倍高い、そしてさらにより好ましくは少なくとも約２０倍高い検出シグナルを与える。そのようなものとして、これらの抗体は、溶液からタンパク質（例えばＭＮ）を免疫沈降させるために用いることができる。

【００７６】

本発明の抗体およびフラグメントは、当該技術分野において既知である任意の適当な方法により免疫特異的結合（もしくは本明細書において定義される、「特異的に免疫反応性」である結合）についてアッセイすることができる。抗体および抗原を伴うアッセイは「免疫アッセイ」として知られており、それは本発明の抗体および抗原の両方を特性化するために本発明において用いることができる。使用することができる免疫アッセイには、いくつかを挙げれば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインＡ免疫アッセイのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が包含されるが、これらに限定されるものではない。そのようなアッセイは日常的であり、そして当該技術分野において周知であり（例えば、その全部が本明細書に引用することにより組み込まれる、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照）、そして必要以上の実験なしに行うことができる。典型的な免疫アッセイは、以

下に簡潔に記述される（しかし限定としてではない）。

【００７７】

免疫沈降プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼおよび／もしくはプロテアーゼ阻害剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補足したＲＩＰＡバッファー（１％ＮＰ－４０もしくはＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．２の０．０１Ｍリン酸ナトリウム、１％トラシロール）のような溶解バッファーに細胞の集団を溶解すること、細胞溶解物に興味のある抗体を加えること、４℃である期間（例えば１４時間）にわたってインキュベーションすること、細胞溶解物にプロテインＡおよび／もしくはプロテインＧセファロースピーズを加えること、４℃で約１時間もしくはそれ以上にわたってインキュベーションすること、溶解バッファーにおいてビーズを洗浄することおよびＳＤＳ／サンプルバッファーにビーズを再懸濁することを含んでなる。特定の抗原を免疫沈降させる興味のある抗体の能力は、例えばウェスタンブロット分析により評価することができる。当業者は、抗原への抗体の結合を増加しそしてバックグラウンドを減らすために改変することができるパラメーターに関して精通している（例えば、セファロースビーズで細胞溶解物をプレクリアすること）。免疫沈降プロトコルに関するさらなる説明については、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　１０．１６．１を参照。

【００７８】

ウェスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製すること、ポリアクリルアミドゲルにおけるタンパク質サンプルの電気泳動（例えば、抗原の分子量により８％　２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）、ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦもしくはナイロンのような膜にタンパク質サンプルを移すこと、ブロッキング溶液（例えば３％ＢＳＡもしくは脱脂乳を有するＰＢＳ）において膜をブロックすること、洗浄バッファー（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ　２０）において膜を洗浄すること、ブロッキングバッファーに希釈した一次抗体（興味のある抗体）で膜をブロックすること、洗浄バッファーにおいて膜を洗浄すること、ブロッキングバッファーに希釈した酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ）もしくは放射性分子（例えば^{32}Ｐもしくは^{125}Ｉ）に連結した二次抗体（これは一次抗体を認識する、例えば抗ヒト抗体）で膜をブロックすること、洗浄バッファーにおいて膜を洗浄すること、および抗原の存在を検出することを含んでなる。当業者は、検出されるシグナルを増加するためにそしてバックグラウンドノイズを減らすために改変することができるパラメーターに関して精通している。ウェスタンブロットプロトコルに関するさらなる説明は、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　１０．８．１を参照。

【００７９】

ＥＬＩＳＡは、典型的に、抗原を調製すること、抗原で９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルを被覆すること、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に連結した興味のある抗体をウェルに加えそしてある期間にわたってインキュベーションすること、および抗原の存在を検出することを含んでなる。ＥＬＩＳＡにおいて興味のある抗体は検出可能な化合物に連結される必要はなく；その代わりに、検出可能な化合物に連結した第二の抗体（これは興味のある抗体を認識する）をウェルに加えることができる。さらに、抗原でウェルを被覆する代わりに、抗体をウェルに被覆することができる。この場合、検出可能な化合物に連結した第二の抗体は、被覆したウェルへの興味のある抗原の添加後に加えることができる。当業者は、検出されるシグナルを増加するために改変することができるパラメーターなら

びに当該技術分野において既知であるＥＬＩＳＡの他のバリエーションに関して精通している。ＥＬＩＳＡに関するさらなる説明は、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １１．２．１を参照。

【００８０】

１つの態様において、本発明はＭｏｒｐｈｏＳｙｓ ＨｕＣＡＬ ＧＯＬＤ Ｆａｂライブラリーをスクリーニングすることにより同定されるＭＮ結合特性を有する多数の異なる抗体を具体化する。本発明の１つの態様において、ヒト抗体のＶＨ領域の３つのＣＤＲのアミノ酸配列が同定された（配列番号：５７～８５；図２）。本発明の別の態様において、ヒトＭＮ抗体のＶＬ領域の３つのＣＤＲのアミノ酸配列が同定された（配列番号：８６～１１２；図２）。本発明はまた、ＣＤＲ、フレームワークおよびＶＨ／ＶＬ対の組み合わせにも関する。そのような組み合わせの例は、図３（コードするヌクレオチド配列については配列番号：１１３～１３２）にそして図４（タンパク質配列については配列番号：１３３～１５２）に示される。ＭＮ結合を有する抗体もまた、図４に示される。スクリーニング方法の詳細は、本明細書に記載の実施例において記述される。高活性の特異的抗体もしくは抗体フラグメントの他の選択方法は当業者により予測され、そしてヒトＭＮ抗体を同定するために用いることができる。

【００８１】

本発明の抗体および／もしくは抗原結合抗体フラグメントはまた、抗体をコードする発現構築物でトランスフェクションされている宿主細胞を包含する、抗体を発現する任意の細胞から精製することもできる。宿主細胞は、抗体が発現される条件下で培養することができる。精製された抗体および／もしくは抗原結合抗体フラグメントは、当該技術分野において周知である方法を用いてある種のタンパク質、炭水化物もしくは脂質のような、細胞において抗体と会合し得る他の細胞成分から分離することができる。そのような方法には、サイズ排除クロマトグラフィー、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーおよび分取ゲル電気泳動が包含されるがこれらに限定されるものではない。調製物の純度は、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような当該技術分野において既知である任意の手段により評価することができる。精製された抗体の調製物は、１つより多くのタイプの抗体を含有し得る（例えば、ＭＮ結合および中和特性を有する抗体）。

【００８２】

あるいはまた、抗体は、固相技術を用いる直接ペプチド合成（例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５４，１９６３；Ｒｏｂｅｒｇｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６９：２０２－２０４，１９９５、これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる）によるような、そのアミノ酸配列もしくは抗体配列の一部（例えばＣＤＲ配列）を合成するために化学的方法を用いて製造することができる。タンパク質合成は、手動技術を用いてもしくは自動化により行うことができる。自動合成は、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ４３１Ａペプチド合成器（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を用いて成し遂げることができる。場合により、抗体のフラグメントを別個に合成し、そして全長分子を製造するために化学的方法を用いて合わせることができる。

【００８３】

いったん本発明の抗体もしくはフラグメントが例えば抗体製造の伝統的方法（例えば動物免疫法）、モノクローナル製造によるかもしくは組換えＤＮＡ手段によるが包含される、例えば本明細書に記述される方法のいずれかにより同定されるかもしくは得られると、抗体を特性化しそして／もしくは精製しそして／もしくは改変するためにさらなる段階を実施することが好ましい可能性がある。例えば、免疫反応性抗体フラグメントを製造することまたは同定された望ましい抗体の精製された高力価組成物を製造することまたは同定された抗体もしくはそのフラグメントの免疫反応性を試験することが望ましい可能性があ

る。本発明は、本発明の抗体を特性化するか、精製するかもしくはアッセイするための任意の既知のそして適当な方法を意図し、そして本発明が関係する当業者は、必要以上の実験なしに本発明の抗体の任意のさらなる特性化、精製および／もしくはアッセイすることを成し遂げるために必要なレベルの技術的専門知識および資源、例えば技術マニュアルもしくは論文を有すると予想される。

【００８４】

特定の態様において、本発明の抗体および／もしくは抗体フラグメントは、プロテインＡ精製、硫安もしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性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およびレシチンクロマトグラフィーが包含されるがこれらに限定されるものではない周知の方法により組換え細胞培養物から回収しそして精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）もまた、精製に用いることができる。例えば、各々引用することにより本明細書に全部が組み込まれる、Ｃｏｌｌｉｇａｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙもしくはＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，（１９９７ ２００１）、例えば、１、４、６、８、９、１０章を参照。

【００８５】

抗体との関連で「単離すること」という用語は、抗体を精製するための当該技術分野において既知である任意の方法をさす。抗体を精製する方法は当該技術分野において周知であり、本発明は当業者に既知でありそして必要以上の実験を必要としない任意の適当な方法を意図する。例えば免疫親和性クロマトグラフィー（興味のある抗体に結合しそして捕捉するための固定化リガンド）、親和性クロマトグラフィー、タンパク質沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーのような例えばクロマトグラフィー方法ならびに電気泳動は技術文献に、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ １８２，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｅｄｓ．Ｊ．Ａｂｅｌｓｏｎ，Ｍ．Ｓｉｍｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９０に記述されるのが見出されることができる。従って、クロマトグラフィー工程のようなそのような精製工程を行うための適当な材料は、当業者に既知である。そのような方法は、本明細書に記述されるような本発明による抗体、抗原もしくはその任意のフラグメントのいずれかの精製に適当である。

【００８６】

ある種の態様は、宿主細胞もしくはその一部からの発現タンパク質または抗体もしくはそのフラグメントの精製もしくは単離を必要とし得る。形質転換した宿主細胞から組換えタンパク質を単離するための常法が、本発明により意図される。そのような方法には、例えば、細胞ペレットからのもしくは細胞培養培地からの初期抽出、続いて塩析による興味のあるタンパク質もしくはフラグメントの単離が包含され、そして組換えタンパク質もしくはフラグメントを単離するために水性イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー工程、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）および親和性クロマトグラフィーを包含する１つもしくはそれ以上のクロマトグラフィー工程を用いることができる。タンパク質精製の方法における指針は、例えば、引用することによりすでに組み込まれる、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ １８２，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｅｄｓ．Ｊ．Ａｂｅｌｓｏｎ，Ｍ．Ｓｉｍｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９０を包含する技術文献に見出されることができる。

【００８７】

化学的に合成された分子は、分取高速液体クロマトグラフィーにより実質的に精製することができる（例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎ

ｃｉｐｌｅｓ，ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９８３を参照）。合成ポリペプチドの組成は、アミノ酸分析もしくはシークエンシング（例えばエドマン分解を用いる）により確かめることができる。

【００８８】

ポリヌクレオチド

別の態様において、本発明は本発明の抗体（例えば、ＭＮに対する抗体）もしくは抗原結合抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドに関する。これらのポリヌクレオチドは、例えば、治療もしくは診断用途のための抗体の量を製造するためにまたは本発明の免疫アッセイにおいて使用する抗体もしくはフラグメントのサンプルを製造するために用いることができる。

【００８９】

例えば、抗体ＶＨ領域内の３つのＣＤＲの各々をコードするために用いることができるポリヌクレオチドは、配列番号：１～２９により記述される。例えば、抗体ＶＬ領域内の３つのＣＤＲの各々をコードするために用いることができるポリヌクレオチドは、配列番号：３０～５６により記述される。例えば、抗体の完全な重鎖および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：１１３～１３２により記述される（図３）。

【００９０】

本発明のポリヌクレオチドはまた、当該技術分野における任意の既知のもしくは適当な方法に従って膜成分、タンパク質および脂質のような他の細胞成分を含まずに、宿主細胞から単離することもできる。ポリヌクレオチドは、標準的な核酸精製技術を用いて単離するか、またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のような増幅技術を用いてもしくは自動合成器を用いることにより合成することができる。ポリヌクレオチドを単離する方法は日常的であり、そして当該技術分野において既知である。本発明の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを得るためにポリヌクレオチドを得るための任意のそのような技術を用いることができる。例えば、抗体をコードするポリヌクレオチドを単離するために制限酵素およびプローブを用いることができる。

【００９１】

抗体をコードするｃＤＮＡ分子は、鋳型としてｍＲＮＡを用いて、標準的な分子生物学技術で製造することができる。その後に、当該技術分野において既知でありそしてＳａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；１９８９，Ｖｏｌ．１－３）のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いてｃＤＮＡ分子を複製することができる。ＰＣＲのような増幅技術は、ポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るために用いることができる。

【００９２】

あるいはまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを合成するために合成化学技術を用いることができる。遺伝暗号の縮重は、例えば、ＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３、ＶＬ－ＣＤＲ１、ＶＬ－ＣＤＲ２、ＶＬ－ＣＤＲ３、完全なＶＨもしくは完全なＶＬアミノ酸配列（例えば、配列番号：５７～１１２および１３３～１５２）の一つを有する抗体をコードする代わりのヌクレオチド配列を合成することを可能にする。

【００９３】

抗体をコードするポリヌクレオチドを発現するために、挿入コーディング配列の転写および翻訳のための必要な要素を含有する発現ベクターにポリヌクレオチドを挿入することができる。抗体をコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御要素を含有する発現ベクターを構築するために当業者に周知である方法を用いることができる。これらの方法には、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術およびインビボ遺伝子組換えが包含される。そのような技術は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（１９８９）にそしてＡ

ｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．，（引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９９５）に記述される。

【００９４】

抗体をコードする配列を含有しそして発現するために様々な発現ベクター／宿主系を利用することができる。これらには、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）もしくは細菌発現ベクター（例えば、ＴｉもしくはｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が包含されるがこれらに限定されるものではない。

【００９５】

制御要素もしくは調節配列は、転写および翻訳を実施するために宿主細胞タンパク質と相互作用するベクターの非翻訳領域－エンハンサー、プロモーター、５’および３’非翻訳領域である。そのような要素は、強さおよび特異性が異なり得る。利用するベクター系および宿主により、構成的および誘導性プロモーターを包含する任意の数の適当な転写および翻訳要素を用いることができる。例えば、細菌系にクローン化する場合、ＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴファージミド（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆ．）、ｐＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）などのハイブリッドｌａｃＺプロモーターのような誘導性プロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターは、昆虫細胞において用いることができる。植物細胞のゲノム（例えば、熱ショック、ＲＵＢＩＳＣＯおよび貯蔵タンパク質遺伝子）もしくは植物ウイルス（例えば、ウイルスプロモーターもしくはリーダー配列）由来のプロモーターもしくはエンハンサーをベクターにクローン化することができる。哺乳類細胞系において、哺乳類遺伝子からもしくは哺乳類ウイルスからのプロモーターを用いることができる、例えばＣＭＶプロモーター。抗体をコードするヌクレオチド配列の多数のコピーを含有する細胞系を作製することが必要である場合、ＳＶ４０もしくはＥＢＶに基づくベクターを適切な選択可能なマーカーとともに用いることができる。

【００９６】

従って、本発明はまた、本発明の単離された核酸分子（例えば、配列番号：１１３～１３２の重鎖および軽鎖可変領域）を含む組換えベクター、組換えベクターで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに本発明の組換え抗体もしくはそのフラグメントの製造および／もしくは発現にも関する。

【００９７】

発現構築物は転写開始、終結のための部位、および転写領域において翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有することができる。構築物により発現される成熟転写産物のコーディング部分は、最初に翻訳開始そして翻訳されるｍＲＮＡの最後に適切に位置する終止コドン（例えば、ＵＡＡ、ＵＧＡもしくはＵＡＧ）をさらに含むことができ、ＵＡＡおよびＵＡＧが哺乳類もしくは真核細胞発現には好ましい。

【００９８】

発現ベクターはまた、少なくとも１つの選択可能なマーカーを含むこともできる。そのようなマーカーには、メトトレキセート（ＭＴＸ）、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）（例えば、米国特許第４，３９９，２１６号；第４，６３４，６６５号；第４，６５６，１３４号；第４，９５６，２８８号；第５，１４９，６３６号；および第５，１７９，０１７号を参照、これらの各々は引用することにより組み込まれる）、アンピシリン、ネオマイシン（Ｇ４１８）、ミコフェノール酸もしくはグルタミン合成酵素（ＧＳ）（例えば、米国特許第５，１２２，４６４号；第５，７７０，３５９号；第５，８２７，７３９号を参照、これらの各々は引用することにより組み込まれる）のような哺乳類細胞マーカー、およびテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性遺伝子のような細菌細胞マーカーが

包含されるがこれらに限定されるものではない。上記の宿主細胞の適切な培養培地および条件は、当該技術分野において既知である。適当なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【００９９】

本発明のＤＮＡ、例えば配列番号：１１３～１３２の１つもしくはそれ以上の抗体コード配列を含有するＤＮＡ発現ベクターを宿主細胞に導入するための任意の適当な既知の方法を利用することができる。いくつかの既知の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染もしくは他の既知の方法が包含される。そのような方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；１９８９）Ｖｏｌ．１－３，１４、１６および１８章）におけるような、当該技術分野において記述される。

【０１００】

当業者は、本発明の抗体もしくはその一部をコードする核酸の発現に利用可能な多数の発現系に精通している。

【０１０１】

本発明の抗体もしくは抗体フラグメントの製造に有用な細胞培養物の実例となるのは、哺乳類細胞である。哺乳類細胞懸濁液もしくはバイオリアクターもまた使用することができるが哺乳類細胞系は細胞の単層の形態であることが多い。完全なグリコシル化タンパク質を発現することができる多数の適当な宿主細胞系が当該技術分野において開発されており、そして例えばＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから容易に入手可能である、ＣＨＯ、ＣＨＯ－Ｓ、ＣＯＳ－１（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５０）、ＣＯＳ－７（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６５１）、ＨＥＫ２９３、ＢＨＫ２１（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１０）、ＣＨＯ（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６１０）およびＢＳＣ－１（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－２６）細胞系、Ｃｏｓ－７細胞、ＣＨＯ細胞、ｈｅｐ Ｇ２細胞、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、２９３細胞、ＨｅＬａ細胞などが包含される。

【０１０２】

これらの細胞の発現ベクターは以下の発現制御配列、例えば、複製起点；プロモーター（例えば、後期もしくは初期ＳＶ４０プロモーター、ＣＭＶプロモーター（例えば、米国特許第５，１６８，０６２号；第５，３８５，８３９号）、ＨＳＶ ｔｋ プロモーター、ｐｇｋ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーター、ＥＦ－１アルファプロモーター（米国特許第５，２６６，４９１号）、免疫グロブリンプロモーター；エンハンサー、ならびに／もしくはリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位（例えば、ＳＶ４０ラージＴ ＡｇポリＡ付加部位）および転写ターミネーター配列のようなプロセシング情報部位（しかしこれらに限定されるものではない）の１つもしくはそれ以上を含むことができる。本発明の核酸もしくはタンパク質の製造に有用な他の細胞は既知であり、そして／あるいは例えばＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓまたは他の既知のもしくは商業的供給源から利用可能である。

【０１０３】

真核宿主細胞が用いられる場合、ポリアデニル化もしくは転写ターミネーター配列をベクターに導入することができる。ターミネーター配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写産物の正確なスプライシングのための配列もまた含むことができる。スプライシング配列の例は、ＳＶ４０からのＶＰ１イントロンである（Ｓｐｒａｇｕｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．４５：７７３ ７８１（１９８３））。さらに、当該技術分野において既知であるように、宿主細胞における複製を制御するための遺伝子配列をベクターに導入することができる。

【０１０４】
抗体の製造を包含する、本明細書において有用な追加の分子生物学技術を記述する一般的なテキストには、Ｂｅｒｇｅｒ ａｎｄ Ｋｉｍｍｅｌ（Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１５２，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；１９８９）Ｖｏｌ．１－３）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓａｂｅｌ ｅｔ ａｌ．［Ｅｄｓ．］，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．とＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．との共同事業（２０００年まで補完される））；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８８），Ｐａｕｌ［Ｅｄ．］）；Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ（１９９８））；およびＨａｒｌｏｗ，ｅｔ ａｌ．，（Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９８））が包含され、これらの全ては引用することにより本明細書に組み込まれる。

【０１０５】
別の態様において、本発明はまた患者サンプルにおけるＭＮタンパク質のレベルを特定するための定量的免疫アッセイの使用にも関する。多数の形態を本発明の方法での使用に適応させることができる。例えば、患者サンプルにおけるＭＮタンパク質の検出および定量は、当該技術分野において一般に既知である他のアッセイの中でも、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、二重抗体サンドイッチアッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫アッセイ、免疫電子および走査顕微鏡検査により行うことができる。そのようなアッセイにおけるＭＮタンパク質の定量は、当該技術分野において既知である常法により適応させることができる。１つの態様において、循環するＭＮタンパク質レベルの連続的変化は、捕獲抗体が支持体の表面上に通常の技術を用いて固定化されているサンドイッチアッセイにより検出しそして定量することができる。

【０１０６】
適当な支持体には、例えば合成ポリマー支持体、例えばポリプロピレン、ポリスチレン、置換されたポリスチレン、ポリアクリルアミド（ポリアミドおよびポリビニルクロリドのような）、ガラスビーズ、アガロースおよびニトロセルロースが包含される。

【０１０７】
本発明の方法において使用することができるＥＬＩＳＡサンドイッチ免疫アッセイの例は、捕獲抗体としてマウス抗ヒトＭＮモノクローナル抗体および検出抗体としてビオチニル化ヤギ抗ヒトＭＮポリクローナル抗体を用いる。捕獲モノクローナル抗体は、マイクロタイタープレートウェル上に固定化される。希釈したヒト血清／血漿サンプルもしくはＭＮ基準（組換え野生型ＭＮタンパク質）をウェルにおいてインキュベーションして捕獲モノクローナル抗体によるＭＮ抗原の結合を可能にする。ウェルの洗浄後に、固定化したＭＮ抗原をビオチルニル化検出抗体にさらし、その後にウェルを再び洗浄する。次に、ストレプトアビジン－西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを加える。最終洗浄の後に、ＴＭＢ Ｂｌｕｅ基質をウェルに加えて結合したペルオキシダーゼ活性を検出する。２．５Ｎ硫酸の添加により反応を止め、そして吸光度を４５０ｎｍで測定する。ＭＮ基準とサンプルの吸光度値を相関させることによりｐｇ／ｍｌ血清もしくは血漿単位のＭＮの定量値の決定を可能にする。

【０１０８】
ＭＮタンパク質を同定するために有用な抗体は、任意の常法において標識することがで

きる。標識の例は西洋ワサビペルオキシダーゼであり、そして抗体を標識する方法の例はビオチン－ストレプトアビジン複合体を用いることによる。

【０１０９】

必要に応じて、トレーサーとして用いる本発明の免疫アッセイにおいて使用する抗体は、可視であるかもしくは可視にすることができるシグナルをもたらす、任意の方法で直接もしくは間接的に標識することができる。検出可能なマーカー物質には、^{3}Ｈ、^{125}Ｉおよび^{131}Ｉのような放射性核種；フルオレセインイソチオシアネートおよび他の蛍光色素、フィコビリタンパク質、フィコエリトリン（ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｉｎ）、希土類キレート、テキサスレッド、ダンシルおよびローダミンのような蛍光物質；比色試薬（色原体）；コロイド金のような電子不透明材料（ｅｌｅｃｔｒｏｎ－ｏｐａｑｕｅ ｍａｔｅｒｉａｌｓ）；生物発光物質；化学発光物質；色素；とりわけ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルファ－、ベーターガラクトシダーゼのような酵素；補酵素；酵素基質；酵素補因子；酵素阻害剤；酵素サブユニット；金属イオン；フリーラジカル；または形成される免疫複合体の存在もしくは量を検出するかもしくは測定する手段を提供する任意の他の免疫学的に活性のもしくは不活性の物質が包含される。典型的な酵素基質の組み合わせは、西洋ワサビペルオキシダーゼとテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、およびアルカリホスファターゼとリン酸パラニトロフェニル（ｐＮＰＰ）である。

【０１１０】

本発明の別の検出および定量系は、発光シグナル、生物発光（ＢＬ）もしくは化学発光（ＣＬ）を生成する。化学発光（ＣＬ）もしくは生物発光（ＢＬ）アッセイにおいて、強度もしくは全発光を測定し、そして未知の検体の濃度に関連付ける。光は照度計（検出器として光電子増倍管）もしくは電荷結合素子を用いて定量的に、または写真もしくはＸ線フィルムを用いて定性的に測定することができる。そのようなアッセイを使用する主な利点はそれらの簡単さおよび分析感度であり、非常に少量の検体の検出および／もしくは定量を可能にする。

【０１１１】

典型的な発光標識はアクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルカルボキサミド、ルミノール、ウンベリフェロン、イソルミノール誘導体、発光タンパク質、例えばエクオリン、およびホタル、海洋細菌、バルグラ（Ｖａｒｇｕｌｌａ）およびレニラ（Ｒｅｎｉｌｌａ）からのルシフェラーゼである。ルミノールは、場合により４－ヨードフェノールもしくは４－ヒドロキシ－桂皮酸のようなエンハンサー分子とともに用いてもよい。典型的に、ＣＬシグナルは塩基性条件下で酸化剤での処理により生成される。

【０１１２】

追加の発光検出系は、シグナル（検出可能なマーカー）が基質への酵素反応により生成されるものである。ＣＬおよびＢＬ検出スキームは、とりわけ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、グルコースオキシダーゼ、グルコース６－リン酸デヒドロゲナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）およびキサンチン－オキシダーゼ標識をアッセイするために開発されている。ＡＰおよびＨＲＰは、一連のＣＬおよびＢＬ反応により定量することができる２つの酵素標識である。例えば、ＡＰは、１－（トリオクチルホスホニウムメチル）－４－（トリブチルホスホニウムメチル）ベンゼンジクロリドのようなエンハンサー分子とともにもしくはそれなしに、アダマンチル１，２－ジオキセタンアリールホスフェート基質（例えば、ＡＭＰＰＤもしくはＣＳＰＤ；Ｋｒｉｃｋａ，Ｌ．Ｊ．，”Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ａｎｄ Ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ，Ａｎａｌｙｓｉｓ ｂｙ，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ｅｄ．Ｒ．Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ）（ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ；Ｎ．Ｙ．，Ｎ．Ｙ．；１９９５））；例えば、４－メトキシ－４－（３－ホスフェートフェニル）スピロ［１，２－ジオキセタン－３，２’－アダマンタン］のような基質で用いることができる。ＨＲＰは、２’，

３’，６’－トリフルオロフェニル－メトキシ－１０－メチルアクリダン－９－カルボキシレートのような基質で用いることができる。

【０１１３】

ＣＬおよびＢＬ反応は、酵素のだけでなく他の基質、補因子、阻害剤、金属イオンなどの分析にも適応することができる。例えば、ルミノール、ホタルルシフェラーゼおよび海洋細菌ルシフェラーゼ反応は、それぞれ、過酸化物、ＡＴＰおよびＮＡＤＰＨの生成もしくは消費の指示反応である。それらはオキシダーゼ、キナーゼおよびデヒドロゲナーゼを伴う他の反応に共役させることができ、そして共役反応（酵素、基質、補因子）の任意の成分を測定するために用いることができる。

【０１１４】

検出可能なマーカーは、本発明のアッセイにおいて使用する抗体に直接もしくは間接的に連結することができる。検出可能な標識の間接的連結の例は、抗体とマーカー間の結合対の使用もしくはシグナル増幅系の使用である。

【０１１５】

検出可能なマーカーに抗体を連結するために用いることができる結合対の例は、ビオチン／アビジン、ストレプトアビジンもしくは抗ビオチン；アビジン／抗アビジン；チロキシン／チロキシン結合グロブリン；抗原／抗体；抗体／抗抗体；炭水化物／レシチン；ハプテン／抗ハプテン抗体；色素および疎水性分子／疎水性タンパク質結合部位；酵素阻害剤、補酵素もしくは補因子／酵素；ポリ核酸／相同なポリ核酸配列；フルオレセイン／抗フルオレセイン；ジニトロフェノール／抗ジニトロフェノール；ビタミンＢ１２／内因子；コルチゾン、コルチゾール／コルチゾール結合タンパク質；および特定受容体タンパク質のリガンド／膜結合特定受容体タンパク質である。

【０１１６】

抗体に直接もしくは間接的に標識を連結する様々な手段は、当該技術分野において既知である。例えば、標識は共有結合的にもしくは非共有結合的に結合させることができる。典型的な抗体結合方法は、Ａｖａｒｍｅａｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８（Ｓｕｐｐｌ．７）：７，１９７８）；Ｂａｙｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６２：３０８，１９７９；Ｃｈａｎｄｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．５３：１８７，１９８２；Ｅｋｅｋｅ ａｎｄ Ａｂｕｋｎｅｓｈａ，Ｊ．Ｓｔｅｒｏｉｄ Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１：１５７９，１９７９；Ｅｎｇｖａｌｌ ａｎｄ Ｐｅｒｌｍａｎｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０９：１２９，１９７２；Ｇｅｏｇｈｅｇａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｏｍｍ．７：１，１９７８；およびＷｉｌｓｏｎ ａｎｄ Ｎａｋａｎｅ，Ｉｍｍｕｎｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ／Ｎｏｒｔｈ Ｈｏｌｌａｎｄ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ；Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（１９７８）に記述されており、これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる。

【０１１７】

標識の性質により、標識を検出しそして定量するために様々な技術を用いることができる。蛍光物質には、多数の蛍光光度計が利用可能である。化学発光物質には、照度計もしくはフィルムが利用可能である。酵素では、蛍光、化学発光もしくは着色生成物を蛍光分析で、発光分析で、分光光度法でもしくは視覚的に決定するかもしくは測定することができる。

【０１１８】

アクリジニウム、ベンズアクリジニウムもしくはアクリダンタイプの複素環系を有する様々なタイプの化学発光化合物は、標識の別の例である。アクリジニウムエステルの例には、アクリジニウム、ベンズ［ａ］アクリジニウム、ベンズ［ｂ］アクリジニウム、ベンズ［ｃ］アクリジニウム、ベンズイミダゾールカチオン、キノリニウム、イソキノリニウム、キノリジニウム、環式置換キノリニウム、フェナントリジニウムおよびキノキサリニウムのような環系を包含する正の酸化状態のヘテロ原子を含有する複素環もしくは環系を有する化合物が包含される。

【０１１９】
トレーサは、当業者に周知であるように（例えば、Ｗｅｅｋｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．２９（８）：１４７４－１４７９，１９８３を参照）、アクリジニウムもしくはベンズアクリジニウムエステル上に存在する反応性官能基を直接もしくは間接的に選択した抗体につなぐことにより製造することができる。化合物の例は、アリール環脱離基およびアリール環のパラもしくはメタ位のいずれかに存在する反応性官能基を有するアクリジニウムおよびベンズアクリジニウムエステルである（例えば、引用することにより本明細書に組み込まれる、米国特許第４，７４５，１８１号およびＷＯ９４／２１８２３を参照）。
【０１２０】
使用方法
「処置」という用語には任意の方法、作用、適用、治療などが包含され、ここで、ヒトを包含する患者（ｓｕｂｊｅｃｔ）（もしくは患者（ｐａｔｉｅｎｔ））には、直接もしくは間接的に患者の症状を改善するか、または患者における症状もしくは疾患の進行を遅くするか、または処置下の疾病もしくは疾患の少なくとも１つの症状を改善する目的で医療扶助が与えられる。
【０１２１】
「組み合わせ治療」もしくは「共治療」という用語は、疾病、症状および／もしくは疾患を処置するための２つもしくはそれ以上の治療薬の投与を意味する。そのような投与には、固定比率の有効成分を有する単一のカプセル剤におけるか、もしくは各阻害剤の複数の別個のカプセル剤におけるような、実質的に同時の方法での２つもしくはそれ以上の治療薬の共投与が包含される。さらに、そのような投与には、順次の方法での治療薬の各タイプの使用が包含される。２つもしくはそれ以上の順次に共投与される治療薬の投与の順序は限定されない。
【０１２２】
「治療的に有効な量」という語句は、既定の治療処置と関連する不都合な副作用を回避するかもしくは最小限に抑えながら、疾病、症状、および／もしくは疾患の重症度、および／もしくはその症状の改善の目的を果たす投与される各薬剤の量を意味する。
【０１２３】
「製薬学的に許容しうる」という用語は、対象事項が製薬学的製品における使用に適切であることを意味する。
【０１２４】
本発明の抗体は、治療薬として有益であると予想される。従って、本発明の態様には、標的症状を処置することにおいて有効である本発明の抗体の量を含有する組成物を当該患者に投与することを含んでなる患者（哺乳類を包含する）における様々な症状を処置する方法が包含される。
【０１２５】
本発明の抗体は、ＭＮタンパク質と関連する疾病および／もしくは行動の処置もしくは予防において用いることができる。これらの疾病および／もしくは行動には、例えば、腎臓、食道、乳房、頸部、結腸および肺の癌腫のような癌が包含される。本発明はまた、ＭＮが上昇しているかもしくはそうでなければ異常に発現される疾患の症状を改善する方法にも関する。これらの疾患には、腎臓、食道、乳房、頸部、結腸および肺の癌腫が包含されるが、これらに限定されるものではない（例えば、Ｌｉａｏ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：２８２７－２８３１，１９９７；Ｔｕｒｎｅｒ，Ｈｕｍ．Ｐａｔｈｏｌ．２８：７４０－７４４，１９９７；Ｌｉａｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１４５：５９８－６０９，１９９４；Ｓａａｒｎｉｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５３：２７９－２８５，１９９８；Ｖｅｒｍｙｌｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｊ．１４：８０６－８１１，１９９９を参照）。本発明の１つの態様において、本発明の抗体の治療的に有効な用量をＭＮが上昇している疾患にかかっている患者に投与する。

【０１２６】
本発明の抗体は、単独でまたは１つもしくはそれ以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。組み合わせ治療には、本発明の抗体および１つもしくはそれ以上の追加の治療薬を含有する単一の製薬学的投与製剤の投与ならびにそれ自体の別個の製薬学的投与製剤における本発明の抗体および各追加の治療薬の投与が包含される。例えば、本発明の抗体および治療薬は単一の経口投与組成物において一緒に患者に投与することができ、もしくは各薬剤は別個の経口投与組成物において投与することができる。
【０１２７】
別個の投与製剤が使用される場合、本発明の抗体および１つもしくはそれ以上の追加の治療薬は本質的に同時期に（例えば同時に）もしくは別個に時間差で（例えば順次）投与することができる。薬剤の投与の順序は限定されない。
【０１２８】
例えば、１つの態様において、抗体／フラグメントもしくは抗癌剤（１つもしくは複数）のいずれかもしくは両方の効果を高めるための１つもしくはそれ以上の抗体剤と一緒の本発明の抗ＭＮ抗体もしくは抗体フラグメントの共投与は、癌のようなＭＮ関連疾患を処置することにおける使用が意図される。
【０１２９】
そのような組み合わせ治療はまた、癌を防ぐか、癌の再発を防ぐか、癌の広がりもしくは転移を防ぐか、または癌と関連する症状を軽減するかもしくは改善するために用いることもできる。
【０１３０】
１つもしくはそれ以上の抗癌剤には、例えば、化学療法剤、他の免疫治療薬、癌ワクチン、抗血管新生剤、サイトカイン、ホルモン治療、遺伝子治療および放射線治療のような、当該技術分野における任意の既知のそして適当な化合物を包含することができる。化学療法剤（もしくは「抗癌剤」もしくは「抗腫瘍剤」もしくは「癌治療法」）は、癌の処置において役立つ任意の分子もしくは化合物をさす。本発明により意図される化学療法剤の例には、シトシンアラビノシド、タキソイド（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、抗チューブリン剤（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、エポチロンＢ、もしくはそのアナログ）、マクロライド（例えば、リゾキシン）、シスプラチン、カルボプラチン、アドリアマイシン、テノポシド、ミトザントロン、ディスコデルモライド、エレウテロビン、２－クロロデオキシアデノシン、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、メクロレタミン、チオエパ（ｔｈｉｏｅｐａ）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン、チオテパ）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン）、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、フラボピリドール、５－フルオロウラシル、フルダラビン、ゲムシタビン、ダカルバジン、テモゾラミド）、アスパラギナーゼ、バチルス・カルメッテ・グエリン（Ｂａｃｉｌｌｕｓ Ｃａｌｍｅｔｔｅ ａｎｄ Ｇｕｅｒｉｎ）、ジフテリア毒素、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシウレア、ＬＹＳＯＤＲＥＮ．ＲＴＭ．、ヌクレオシドアナログ、植物アルカロイド（例えば、タキソール、パクリタキセル、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン（ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ，ＣＰＴ－１１）、ビンクリスチン、ビンカアルカロイド、例えばビンブラスチン）、ポドフィロトキシン（エピポドフィロトキシン、ＶＰ－１６（エトポシド）、ＶＭ－２６（テニポシド）のような誘導体を包含する）、サイトカラシンＢ、コルチン、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、プロカルバジン、メクロレタミン、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）、ドキソルビシン、リポソーム化ドキソルビシン）、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロ

プラノロール、ピューロマイシン、抗有糸分裂剤、アブリン、リシンＡ、シュードモナス菌外毒素、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノーゲンアクチベーター、アルデスロイキン、アルタミン（ａｌｌｕｔａｍｉｎｅ）、アナストロゾール（ａｎａｓｔｒｏｚｌｅ）、ビカルタミド、ビアオマイシン（ｂｉａｏｍｙｃｉｎ）、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｉｎ）、クロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｂｕｓｉｌ）、クラドリビン、シララビン（ｃｙｌａｒａｂｉｎｅ）、ダクチノマイシン（ｄａｃｌｉｎｏｍｙｃｉｎ）、エストラムシン、フロキシウリジン（ｆｌｏｘｕｒｉｈｅ）、ゲムシタビン（ｇａｍｃｉｔａｂｉｎｅ）、ゴセレリン（ｇｏｓｅｒｅｉｎｅ）、イダルビシン、イホスファミド（ｉｔｏｓｆａｍｉｄｅ）、酢酸ロイプロリド（ｌａｕｐｒｏｌｉｄｅ　ａｃｅｔａｔｅ）、レバミゾール、ロムスチン（ｌｏｍｕｓｌｉｎｅ）、メクロレタミン、酢酸メゲストロール（ｍａｇｅｓｔｒｏｌ）、メルカプトプリン、メスナ、ミトランク（ｍｉｔｏｌａｎｃ）、ペグアスパラガーゼ（ｐｅｇａｓｐｅｒｇａｓｅ）、ペントスタチン（ｐｅｎｔｏｓｌａｔｉｎ）、ピカマイシン（ｐｉｃａｍｙｃｉｎ）、リウキシルマブ（ｒｉｕｘｌｍａｂ）、キャンパス－１、ストレプトゾシン（ｓｔｒａｐｌｏｚｏｃｉｎ）、チオグアニン、トレチノイン、ビノレルビン、またはその製薬学的に許容しうる塩を包含する、その任意のフラグメント、ファミリーメンバーもしくは誘導体が包含されるがこれらに限定されるものではない。１つもしくはそれ以上の化学療法剤を含んでなる組成物（例えば、ＦＬＡＧ、ＣＨＯＰ）もまた、本発明により意図される。ＦＬＡＧは、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ａｒａ－Ｃ）およびＧ－ＣＳＦを含んでなる。ＣＨＯＰは、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシンおよびプレドニゾンを含んでなる。

【０１３１】

化学療法剤は、例えば、アンジオスタチン、ベバシズマブ（アバスチン(R)）、ソラフェニブ（ネクサバール(R)）、バキュロスタチン、カンスタチン、マスピン、抗ＶＥＧＦ抗体もしくはペプチド、抗胎盤成長因子抗体もしくはペプチド、抗Ｆｌｋ－１抗体、抗Ｆｌｔ－１抗体もしくはペプチド、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン１２、ＩＰ－１０、Ｇｒｏ－β、トロンボスポンジン、２－メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、ＣＭ１０１、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンジオポエチン２、インターフェロン－アルファ、ハービマイシンＡ、ＰＮＵ１４５１５６Ｅ、１６Ｋプロラクチンフラグメント、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、ＴＮＰ－４７０、エンドスタチン、パクリタキセル、アククチン、シドフォビル、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ＡＧＭ－１４７０、血小板第４因子およびミノサイクリンのような抗血管新生剤であることができる。理論によって拘束されることなしに、抗血管新生剤の共投与は腫瘍におけるＭＮ発現の増加を都合よくもたらし、それにより本発明の抗体および抗体コンジュゲートに対して腫瘍をより感受性にすることができる。

【０１３２】

１つの態様において、該化学療法剤は１００～１０００ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のゲムシタビンである。１つの態様において、該化学療法剤は２００～４０００ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のダカルバジンである。別の態様において該用量は７００～１０００ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間である。さらに別の態様において、該化学療法剤は２５～５０ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のフルダラビンである。別の態様において、該化学療法剤は２００～２０００ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のアラビノシド（Ａｒａ－Ｃ）である。さらに別の態様において、該化学療法剤は１．５～７．５ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量のドセタキセルである。さらに別の態様において、該化学療法剤は５～１５ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量のパクリタキセルである。さらなる態様において、該化学療法剤は５～２０ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量のシスプラチンである。なおさらなる態様において、該化学療法剤は５～２０ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量の５－フルオロウラシルである。別の態様において、該化学療法剤は２～８ｍｇ／ｋｇ／サイクルの

間の用量のドキソルビシンである。なおさらなる態様において、該化学療法剤は４０～１６０ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量のエピポドフィロトキシンである。さらに別の態様において、該化学療法剤は５０～２００ｍｇ／ｋｇ／サイクルの間の用量のシクロホスファミドである。さらなる態様において、該化学療法剤は５０～１５０ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のイリノテカンである。なおさらなる態様において、該化学療法剤は３．７～１８．５ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のビンブラスチンである。別の態様において、該化学療法剤は０．７～２ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のビンクリスチンである。１つの態様において、該化学療法剤は３．３～１０００ｍｇ／ｍ^2／サイクルの間の用量のメトトレキセートである。

【０１３３】

別の態様において、本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントは、ハーセプチン(R)、レツキサン(R)（Ｒｅｔｕｘａｎ）、オバレックス（ＯｖａＲｅｘ）、パノレックス（Ｐａｎｏｒｅｘ）、ＢＥＣ２、ＩＭＣ－Ｃ２２５、ビタキシン、キャンパスＩ／Ｈ、Ｓｍａｒｔ　ＭＩ９５、ＬｙｍｐｈｏＣｉｄｅ、Ｓｍａｒｔ　Ｉ　Ｄ１０およびオンコリム、リツキサン、リツキシマブ、ゲムツズマブもしくはトラスツズマブが包含されるがこれらに限定されるものではない、抗体もしくは免疫モジュレーターのような１つもしくはそれ以上の免疫療法薬と組み合わせて投与される。

【０１３４】

本発明はまた、アンジオスタチン、サリドマイド、クリングル５、エンドスタチン、セルピン（セリンプロテアーゼ阻害剤）、抗トロンビン、フィブロネクチンの２９ｋＤａ　Ｎ－末端および４０ｋＤａ　Ｃ－末端タンパク質分解フラグメント、プロラクチンの１６ｋＤａタンパク質分解フラグメント、血小板第４因子の７．８ｋＤａタンパク質分解フラグメント、血小板第４因子のフラグメントに対応するβ－アミノ酸ペプチド（Ｍａｉｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：２０７７）、コラーゲンＩのフラグメントに対応する１４アミノ酸ペプチド（Ｔｏｌｍａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１２２：４９７）、トロンボスポンジンＩのフラグメントに対応する１９アミノ酸ペプチド（Ｔｏｌｓｍａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１２２：４９７）、ＳＰＡＲＣのフラグメントに対応する２０アミノ酸ペプチド（Ｓａｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５７：１３２９－）、またはその製薬学的に許容しうる塩を包含する、その任意のフラグメント、ファミリーメンバーもしくは誘導体が包含されるがこれらに限定されるものではない１つもしくはそれ以上の抗血管新生剤と本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントを投与することも意図する。

【０１３５】

血管新生を抑制しそしてラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびＥＧＦのフラグメントに対応する他のペプチドもまた記述されている（Ｃａｏ，１９９８，Ｐｒｏｇ．Ｍｏｌ．Ｓｕｂｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２０：１６１による概説を参照）。ＲＧＤタンパク質（すなわち、ペプチドモチーフＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐを保有する）に結合するある種のインテグリンを阻止するモノクローナル抗体および環式ペンタペプチドは、抗血管形成活性を有することが示されている（Ｂｒｏｏｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６４：５６９；Ｈａｍｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２：５２９）。さらに、アンタゴニストによるウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター受容体の阻害は、血管新生、腫瘍増殖および転移を抑制する（Ｍｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：２４２８－３３；Ｃｒｏｗｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：５０２１）。そのような抗血管新生剤の使用もまた、本発明により意図される。

【０１３６】

別の態様において、本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントは放射線の処方計画と組み合わせて投与される。

【０１３７】
本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントはまた、リンホカイン、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子様サイトカイン、リンホトキシン－α、リンホトキシン－β、インターフェロン－β、マクロファージ炎症タンパク質、顆粒球単球コロニー刺激因子、インターロイキン（インターロイキン－１、インターロイキン－２、インターロイキン－６、インターロイキン－１２、インターロイキン－１５、インターロイキン－１８が包含されるがこれらに限定されるものではない）、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０もしくはＣＤ１３７リガンド、Ｆａｓ－Ｐａｓリガンド、４－１ＢＢＬ、内皮単球活性化タンパク質またはその製薬学的に許容しうる塩を包含する、その任意のフラグメント、ファミリーメンバーもしくは誘導体が包含されるがこれらに限定されるものではない１つもしくはそれ以上のサイトカインと組み合わせて投与することもできる。
【０１３８】
本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントはまた、その例には自己細胞もしくは組織、非自己細胞もしくは組織、癌胎児性抗原、アルファ－フェトプロテイン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ＢＣＧ生ワクチン、メラニン細胞系統タンパク質（例えば、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１／ＭｅｌａｎＡ、ＴＲＰ－１（ｇｐ７５）、チロシナーゼ、広く共有される腫瘍関連（腫瘍特異的を包含する）抗原（例えば、ＢＡＧＥ、ＧＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ－Ｖ、ｐ１５）、腫瘍に関連する突然変異抗原（β－カテニン、ＭＵＭ－１、ＣＤＫ４）、非黒色腫抗原（例えば、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ（乳癌および卵巣癌）、ヒトパピローマウイルス－Ｅ６、Ｅ７（子宮頸癌）、ＭＵＣ－１（乳癌、卵巣癌および膵臓癌）が包含されるがこれらに限定されるものではない、癌ワクチンと組み合わせて投与することもできる。Ｔ細胞により認識されるヒト腫瘍抗原については、一般にＲｏｂｂｉｎｓ ａｎｄ Ｋａｗａｋａｍｉ，１９９６，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：６２８を参照。癌ワクチンは、精製された調製物であることができもしくはそうでなくてもよい。
【０１３９】
さらに別の態様において、本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントはホルモン療法と関連して使用される。ホルモン治療療法は、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト（例えば、フルタミド、タモキシフェン、酢酸ロイプロリド（ＬＵＰＲＯＮ）、ＬＨ－ＲＨアンタゴニスト）、ホルモン生合成およびプロセシングの阻害剤、ならびにステロイド（例えば、デキサメタゾン、レチノイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラロコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲスチン）、抗ゲスターゲン（例えば、ミフェプリストン、オナプリストン）、および抗アンドローゲン（例えば、酢酸シプロテロン）を含んでなる。
【０１４０】
本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくはフラグメントは、抗ＭＤＲ（多剤耐性）表現型剤と組み合わせて用いることができ、例えば共投与することができる。
【０１４１】
薬剤種類の各々は異なる構造および作用機序を有するにもかかわらず、多くのヒト癌は同時にいくつかの種類の抗癌剤に対する耐性を本質的に発現するかもしくは自然に発生する。培養した哺乳類細胞において模倣することができるこの現象は、一般に多剤耐性（「ＭＤＲ」）もしくは多剤耐性表現型と呼ばれる。ＭＤＲ表現型は、ヒト患者における癌の成功した化学療法処置に重大な障害を与える。多数の化学療法剤に対する悪性腫瘍の耐性は、処置の失敗の主要原因である（Ｗｉｔｔｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔ．Ｒｅｐ．７０：１０５（１９８６）；Ｂｒａｄｌｅｙ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ９４８：８７（１９８８）；Ｇｒｉｓｗａｌｄ，Ｄ．Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔ．Ｒｅｐ．６５（Ｓ２）：５１（１９８１）；Ｏｓｔｅｅｎ，Ｒ．Ｔ．（ｅｄ．），Ｃａｎｃｅｒ Ｍａｎｕａｌ，（１９９０））。最初は細胞毒性薬に感受性である腫瘍は、しばしば、再発するかもしくは多数の化

学療法剤に反応しなくなる（Ｒｉｏｒｄａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２８：５１（１９８５）；Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．９：５４（１９８８）；Ｍｏｓｃｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８０：１４（１９８８）；Ｃｒｏｏｐ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８１：１３０３（１９８８））。腫瘍から得られそして選択する細胞毒性薬の存在下で培養した細胞もしくは組織は、その種類における他の薬剤ならびにアントラサイクリン、ビンカアルカロイドおよびエピポドフィロトキシンが包含されるがこれらに限定されるものではない他の種類の薬剤に対する交差耐性をもたらすことができる（Ｒｉｏｒｄａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２８：５１（１９８５）；Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：１２１６３（１９８８））。従って、単一の薬剤に対する獲得耐性は、構造的にそして機能的に関係のない薬剤の多様な群に対する同時の耐性をもたらす。そのような耐性は、固体形態および液体形態の腫瘍（例えば、血液もしくはリンパ液に基づく癌）の両方の問題であり得る。

【０１４２】

哺乳類細胞における多剤耐性の１つの主要な機序は、１７０ｋＤａ原形質膜糖タンパク質ポンプシステムの増加した発現を伴う（Ｊｕｒａｎｋａ ｅｔ ａｌ．，ＦＡＳＥＢＪ ３：２５８３（１９８９）；Ｂｒａｄｌｅｙ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ９４８：８７（１９８８））。多剤輸送体と呼ばれることもある、このポンプシステムをコードする遺伝子は培養したヒト細胞からクローン化されており、そして一般にｍｄｒ１と呼ばれる。この遺伝子はいくつかの種類の正常組織において発現されるが、これらの組織におけるｍｄｒ１遺伝子産物の輸送される生理的基質は同定されていない。ＭＤＲ１産物は、エネルギー依存性輸送機能を有する一群のタンパク質、ＡＢＣ輸送体タンパク質スーパーファミリーのメンバーである。

【０１４３】

Ｐ－糖タンパク質（「Ｐ－１７０」、「Ｐ－ｇｐ」）として一般に既知である、ｍｄｒ１遺伝子のタンパク質産物は、上記のエネルギー依存性排出ポンプを構成する１７０ｋＤａの原形質膜貫通タンパク質である。細胞表面上のＰ－ｇｐの発現は、多数の抗癌剤を包含する多数の細胞毒性薬に対して細胞を耐性にするために十分である。Ｐ－ｇｐに媒介されるＭＤＲは、異なるタイプの腫瘍における腫瘍耐性の重要な臨床成分であるように思われ、そしてｍｄｒ１遺伝子発現は異なるタイプの癌における化学療法に対する耐性と相関関係がある。

【０１４４】

ｍｄｒ１遺伝子のヌクレオチド配列（Ｇｒｏｓ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １４７：３７１（１９８６）；Ｃｈｅｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ４７：３８１（１９８６））は、それがＰ－糖タンパク質と同様のもしくは同一のポリペプチドをコードすること、およびこれらが細菌輸送体と同様のそして正常な生理的輸送プロセスに関与する膜タンパク質の高度に保存された種類のメンバーであることを示す。ｍｄｒ１遺伝子の配列分析は、Ｐｇｐが２つの相同な（４３％の同一性）半分の間に分散している１２８０アミノ酸からなることを示す。分子の各半分は６個の疎水性膜貫通ドメインを有し、そして各々大きな細胞質ループ内にＡＴＰ結合部位を有する。分子の約８％のみが細胞外であり、そして炭水化物部分（約３０ｋＤａ）はこの領域中の部位に結合している。

【０１４５】

従って、「多剤耐性」もしくは「多剤耐性」表現型を有する哺乳類細胞は、細胞内環境から複数の細胞毒性物質（例えば化学療法剤）を封鎖するか、輸送するかもしくは放出する能力を特徴とすることが理解される。細胞は、単一の化学療法剤（選択毒素）への暴露により課せられる選択圧の結果としてこの表現型を獲得し得る。あるいはまた、細胞毒性物質の輸送は細胞分泌産物、代謝物などの通常の輸送と共通する機序に関連し得るので、細胞は毒素暴露の前に該表現型を示し得る。多剤耐性は、細胞が以前にさらされなかった追加の細胞毒素（他の化学療法剤）を輸送する能力を細胞が獲得する点において選択毒素

に対する単純な獲得耐性と異なる。例えば、Ｍｉｒｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７），４７　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２５９４－２５９８は、選択毒素としてアドリアマイシン（ドキソルビシン）の存在下で、ヒト小細胞肺癌由来のＨ６９細胞系を培養することによる多剤耐性細胞集団の単離を記述する。生存細胞は、アントラサイクリンアナログ（例えば、ダウノマイシン、エピルビシン、メノガリルおよびミトキサントロン）、アシビシン、エトポシド、グラミシジンＤ、コルヒチンおよびビンカ由来のアルカロイド（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）のならびにアドリアマイシンの細胞毒性効果に耐性であることが見出された。同様の選択培養技術は、追加の多剤耐性細胞集団を生成するために適用することができる。

【０１４６】

従って、本発明の製薬学的組成物はＭＤＲ表現型および／もしくはＭＤＲ表現型と関連する症状を抑制するように働く化合物をさらに含むことができる。そのような化合物には、多剤耐性を覆すかもしくは抑制することが既知の薬剤である、特にタモキシフェン、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡを包含する、ＭＤＲ成分に特異的な抗体（例えば、抗ＭＤＲ輸送体抗体）もしくはＭＤＲ輸送体の小分子阻害剤のような、当該技術分野における任意の既知のＭＤＲ阻害剤化合物を包含することができる（引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｌａｖｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１９５３０－１０５３６，１９９６）。そのような化合物は米国特許第５，７７３，２８０号、第６，２２５，３２５号および第５，４０３，５７４号に見出されることができ、それらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる。そのようなＭＤＲ阻害剤化合物は、化学療法処置を助けるかもしくは高めるためにＭＤＲ表現型の検出後にＭＤＲ表現型を覆すことを包含する様々な目的のために本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくはフラグメントと共投与することができる。例えば、タモキシフェン、ベラパミルもしくはサイクロスポリンＡのようなＭＤＲ阻害剤は、ＭＤＲ表現型の検出を助けるために本発明の化合物と併せて用いることができる。この態様に従って、基質ドメインに関して画像化化合物を輸送することもしくは「排出すること」におけるＭＤＲ輸送系の能力はＭＤＲ阻害剤の存在下で減少されるので、ＭＤＲ阻害剤はＭＤＲ癌細胞における本発明の化合物の取り込みおよび蓄積を高めることができる。

【０１４７】

さらに別の態様において、本発明の抗ＭＮ抗体および／もしくは抗体フラグメントは、癌の処置において遺伝子治療プログラムと関連して使用される。インターロイキン－２を分泌する組換え細胞での遺伝子治療は癌、特に乳癌を防ぐかもしくは処置するために本発明の抗体と組み合わせて投与することができる（例えば、Ｄｅｓｈｍｕｋｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．９４：２８７を参照）。

【０１４８】

例として、癌を処置するために治療的に有用である特定の抗体の能力を評価するために、抗体をマウス異種移植片腫瘍モデルにおいてインビボで試験することができる。所望に応じて、ＭＮ抗体は治療評価の前にＩｇＧ$_1$抗体に転化することができる。この転化は実施例５において記述され、そして治療モデルの例は実施例９において詳述される。抗体活性はまた、実施例１２において記述されるように抗体依存性細胞媒介性細胞傷害アッセイを用いて試験することもできる。

【０１４９】

本発明はまた、患者サンプルもしくは生体サンプルにおいてＭＮを検出することができる診断方法も提供する。そのような診断方法は、例えば、ＭＮが上昇している疾患を診断するために用いることができる。そのような疾患には、腎臓、食道、乳房、頸部、結腸および肺の癌腫が包含されるがこれらに限定されるものではない。診断に使用する場合、正常サンプルにおける複合体の量より大きい患者からのサンプルにおける抗体－ＭＮ複合体の量の検出は、該疾患にかかっている可能性があると患者を同定する。癌組織におけるＭＮの検出のための免疫組織化学方法は、実施例１１において記述される。

【０１５０】

本発明の別の態様において、異常な量の発現されたＭＮタンパク質を有するＭＮ関連癌を検出しそして／もしくは視覚化する方法が提供される。そのような方法は、本発明の抗ＭＮ抗体もしくはフラグメントとＭＮ関連癌細胞を接触させること、および医療用画像化モダリティを用いて画像を作成することを含んでなることができ、ここで、抗ＭＮ抗体もしくはフラグメントは医療用画像化モダリティにより検出することができる標識ドメインを含んでなる。

【０１５１】

本発明の検出方法は、インビトロで行うことができる。癌細胞もしくは組織は、例えば、生検または細胞もしくは組織培養のような任意の適当な供給源からであることができる。生検を採取しそして取り除いた組織および／もしくは細胞を維持しそして／もしくは増殖させる方法は、当業者に周知である。多剤耐性のインビトロ検出は、例えば、処置の前に、間にもしくは後に特定の患者の癌が多剤表現型を発生しているかどうかを決定することのような様々な適用を有することができる。

【０１５２】

本発明の化合物を検出するために使用する画像化モダリティのタイプは、本発明の化合物において使用する特定の標識ドメインにより決まる。例えば、標識ドメインがガドリニウムキレートを含んでなる場合、本発明の造影剤を検出するために典型的にはＭＲＩを使用することができる。放射性核種キレートを標識ドメインとして使用する場合、核画像化法を用いることができる（例えばＰＥＴ）。蛍光に基づく標識ドメインを使用する場合、例えばＦＡＣＳシステムもしくは蛍光顕微鏡検査もしくは蛍光自動プレートリーダーのような光学画像化システムを用いることができる。本発明のインビトロ検出方法において使用する適切な画像化モダリティを選択することは、当業者の知識の十分に範囲内である。

【０１５３】

さらに、本発明のインビトロ検出方法において使用する造影剤の量は当業者により決定され、そしてＭＤＲ表現型が存在する程度、例えばＭＤＲ輸送系（例えば、Ｐ－糖タンパク質）の発現のレベルに依存することができる。当業者は、必要以上の実験なしにＭＤＲ表現型を検出するために十分である新規画像化化合物の量、すなわち、検出可能に十分な量を決定することができる。

【０１５４】

使用する画像化モダリティのタイプは任意の特定のタイプに限定されず、そして例えばＭＲＩ、核画像化（例えば、ＰＥＴもしくはＳＰＥＣＴ）、光学的画像化、ソノルミネンス（ｓｏｎｏｌｕｍｉｎｅｎｃｅ）画像化もしくは光音響画像化（超音波）を包含することができる。本発明の画像化化合物の特定の標識ドメインは使用する特定の画像化モダリティと適合すべきであることを当業者は理解する。

【０１５５】

特定の態様において、検出の方法は抗ＭＮ抗体もしくはそのフラグメントおよびＭＲＩにより検出することができる適切な標識を利用する。例えば、本発明の抗体もしくはフラグメントは、例えば、常磁性金属キレートもしくは複数のキレートまたは本明細書に記述されるもののいずれかのようなＭＲ造影剤である標識ドメインを含んでなることができる。造影剤はまた、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）もしくは単光子放出コンピューター断層撮影（ＳＰＥＣＴ）のような核画像化モダリティによる画像化もしくは検出のための放射性核種標識ドメイン、例えば、^{199}Ａｕ、^{72}Ａｓ、^{141}Ｃｅ、^{67}Ｃｕ、^{60}Ｃｕ、^{52}Ｆｅ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{51}Ｇｒ、^{111}Ｉｎ、^{177}Ｌｕ、^{51}Ｍｎ、^{203}Ｐｂ、^{188}Ｒｅ、^{97}Ｒｕ、^{47}Ｓｃ、^{177m}Ｓｎ、^{94m}Ｔｃ、^{167}Ｔｍおよび^{90}Ｙのような放射性核種を含んでなることもできる。放射性核種は、例えば、ＨＹＮＩＣ、ＤＲＰＡ、ＥＤＴＡ、ＤＯＴＡ、ＴＥＴＡ、ＤＴＰＡおよびＢＡＴのような、適当なキレート剤によりもしくは複数のキレート剤によりキレートすることができる。キレート剤が金属を配位する条件は、例えば、Ｇａｎｓｏｗ ｅｔ ａｌ．，米国特許第４，８３１，１７５号、第４，４５４，１０６号および第４，４７２，５０９号により記述されており、これらの各々は引用することにより本明細書に組み込まれる。^{99m}Ｔｃ（

テクネチウム－９９ｍ）は、核医学部門に一般に利用可能であり、安価であり、最小量の患者放射線量を与え、そして理想的な核画像化特性を有するので、治療および診断適用のための特に魅力的な放射性同位体である。

【０１５６】

患者サンプルを本発明の抗体と接触させることができ、そして次に患者サンプルを抗体－ＭＮ複合体の存在についてアッセイすることができる。上記のように、抗体は蛍光、放射性同位体、化学発光もしくは酵素標識、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼもしくはルシフェラーゼのような検出可能な標識を含んでなることができる。

【０１５７】

場合により、抗体を固体支持体に結合させることができ、それはアッセイの自動化を提供することができる。適当な固体支持体には、ガラスもしくはプラスチックスライド、組織培養プレート、マイクロタイターウェル、チューブ、シリコーンチップ、もしくはビーズ（ラテックス、ポリスチレンもしくはガラスビーズが包含されるがこれらに限定されるものはない）のような粒子が包含されるがこれらに限定されるものではない。共有結合および非共有結合連結、受動的吸収、もしくは抗体および固体支持体に結合している結合部分のペアの使用を包含する、当該技術分野において既知である任意の方法を固体支持体に抗体を結合させるために用いることができる。ＭＮおよび抗体の結合は、反応物質を含有するために適当な任意の容器において成し遂げることができる。そのような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管および微小遠心管が包含される。

【０１５８】

製薬学的組成物および投薬量

本明細書に記述される抗体は、製薬学的に許容しうる担体を含んでなる製薬学的組成物において提供することができる。製薬学的に許容しうる担体は、非発熱性であることができる。組成物は単独でもしくは安定化化合物のような少なくとも１つの他の薬剤と組み合わせて投与することができ、それは食塩水、緩衝食塩水、デキストロースおよび水が包含されるがこれらに限定されるものではない任意の無菌の生体適合性の製薬学的担体において投与することができる。食塩水、グリシンなどが包含されるがこれらに限定されるものではない様々な水性担体を用いることができる。これらの溶液は無菌であり、そして粒子状物質を一般に含まない。これらの溶液は、通常の周知の滅菌技術（例えば濾過）により滅菌することができる。

【０１５９】

一般に、「製薬学的に許容しうる担体」という語句は当該技術分野において認められており、そして哺乳類に本発明の化合物を投与するために適当な製薬学的に許容しうる物質、組成物もしくは賦形剤が包含される。担体には、１つの臓器もしくは体の部分から別の臓器もしくは体の部分に対象薬剤を運ぶこともしくは輸送することに関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒もしくは封入材料が包含される。各担体は、製剤の他の成分と適合しそして患者に有害でないという意味において「許容可能」でなければならない。製薬学的に許容しうる担体として働くことができる物質のいくつかの例には：糖、例えばラクトース、グルコースおよびショ糖；澱粉、例えばコーンスターチおよびジャガイモ澱粉；セルロースおよびその誘導体、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；粉末トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えばココアバターおよび座薬ワックス；油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーンオイルおよびダイズ油；グリコール、例えばプロピレングリコール；ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギン酸；パイロジェンフリー水；等張食塩水；リンガー溶液；エチルアルコール；リン酸バッファー溶液；ならびに製薬学的製剤に用いられる他の無毒の適合する物質が包含される。

【０１６０】

湿潤剤、乳化剤および潤滑剤、例えばラルリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、ならびに着色剤、剥離剤、コーティング剤、甘味料、香料および芳香剤、防腐剤および酸化防止剤もまた、本発明の抗体組成物に存在することができる。

【０１６１】

製薬学的に許容しうる酸化防止剤の例には：水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；油溶性酸化防止剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ－トコフェロールなど；および金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが包含される。

【０１６２】

組成物は、ｐＨ調整剤および緩衝剤などのような生理的条件に近づけるために必要とされるような製薬学的に許容しうる補助剤を含有することができる。そのような製薬学的製剤における本発明の抗体の濃度は広く異なることができ、そして選択した投与の特定の形態に従って、主に液量、粘度などに基づいて選択することができる。所望に応じて、１つより多くのタイプの抗体を製薬学的組成物に含むことができる（例えば、ＭＮ結合の異なるK_dを有する抗体）。

【０１６３】

組成物は、単独でまたは他の薬剤、薬物もしくはホルモンと組み合わせて患者に投与することができる。有効成分に加えて、これらの製薬学的組成物は、製薬学的に使用することができる製剤への活性化合物の処理を容易にする賦形剤および助剤を含んでなる適当な製薬学的に許容しうる担体を含有することができる。本発明の製薬学的組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下もしくは直腸手段が包含されるがこれらに限定されるものではない任意の数の経路により投与することができる。

【０１６４】

本発明の組成物は適当な免疫担体、例えばタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド、例えばアルブミン、ヘモシアニン、チログロブリンおよびその誘導体、特にウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）およびキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、多糖、炭水化物、ポリマーならびに固相をさらに意図する。他のタンパク質由来のもしくは非タンパク質由来の物質は、当業者に既知である。

【０１６５】

ワクチン、例えば本発明の抗体と一緒の癌ワクチンに関する態様において、本発明の組成物はアジュバントと共にもしくはそれなしに投与することができる。投与は、任意のアジュバント誘導毒性を回避するためにアジュバントの不在下で実施することができる。本発明が関係する当業者、例えば癌を専門とする医師は、アジュバントを使用すべきかもしくはすべきでないかを確かめる方法を認識しそして理解し、そして患者の病歴、家族データ、毒性データ、アレルギー関連試験結果などによって決まることができる。アジュバントを使用する態様において、アジュバントが防御ＩｇＧ抗体のような防御抗体の形成を促進することは好都合である。当業者に既知である任意の適当なアジュバントが本発明により意図され、そして本発明に容易に適応される。動物にワクチン接種することにおける使用に適当なアジュバントには、水酸化アルミニウム、水酸化アルミニウム、サポニンおよびその精製成分Ｑｕｉｔ　Ａ、完全フロインドアジュバント（ＣＦＡ）および不完全フロインドアジュバント（ＩＦＡ）を包含することができるが、これらに限定されるものではない。硫酸デキストランは、ブドウ球菌細胞表面抗原に対するIgG_2抗体の強力な刺激因子であることが示されており、そして同様にアジュバントとして適当である。あるアジュバントは獣医適用により好ましい可能性があり、一方、あるアジュバントはヒトにおける使用に好ましいこと、そしてアジュバント毒性はヒトへの化合物の投与の前に当業者により考慮されるべき事項であることが糖業者により理解される。

【０１６６】

非経口、皮下、静脈内、筋肉内などに適当な製剤；適当な製薬学的担体；ならびに調合および投与の技術は、当該技術分野において周知である方法のいずれかにより準備することができる（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，第２０版，２０００を参照）。本発明の化合物の経口投与のための液状投与形態物には、製薬学的に許容しうるエマルジョン、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤が包含される。有効成分に加えて、液状投与形態物は例えば水もしくは他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、コーンオイル、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにその混合物のような当該技術分野において一般に用いられる不活性希釈剤を含有することができる。

【０１６７】

「非経口投与」および「非経口的に投与する」という語句は、本明細書において用いる場合、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与の形態を意味し、そして静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内および胸骨内注射および注入が包含されるが、これらに限定されるものではない。

【０１６８】

治療的に有効な用量の決定は、当業者の能力の十分に範囲内である。治療的に有効な用量は、治療的に有効な用量の不在下で明らかである効能と比較して疾病（例えば癌）を効果的に処置するために用いることができる抗体の量をさす。

【０１６９】

治療的に有効な用量は、動物モデル（例えば、ラット、マウス、ウサギ、イヌもしくはブタ）において最初に概算することができる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲および投与の経路を決定するために用いることもできる。次に、そのような情報は、ヒトにおける有用な用量および投与の経路を決定するために用いることができる。

【０１７０】

抗体の治療効能および毒性（例えば、ED_{50}－集団の５０％において治療的に有効な用量およびLD_{50}－集団の５０％に致命的な用量）は、細胞培養もしくは実験動物において標準的な製薬学的方法により決定することができる。毒性：治療効果の用量比は治療指数であり、そして比率、LD_{50}／ED_{50}として表すことができる。動物研究から得られるデータは、ヒト使用のための投薬量の範囲を策定するために用いることができる。そのような組成物に含まれる投薬量は、ほとんどもしくは全く毒性なしにED_{50}を含む循環濃度の範囲内であることができる。投薬量は、用いる投与形態物、患者の感受性および投与の経路によりこの範囲内で異なる。

【０１７１】

正確な投薬量は、処置を必要とする患者に関連する因子に照らして、医師により決定されることができる。投薬量および投与は、抗体の十分なレベルを提供するためにもしくは所望の効果を維持するために調整することができる。考慮することができる因子には、病状の重症度、患者の一般的な健康、患者の年齢、体重および性別、食事、投与の時間および頻度、薬剤の組み合わせ（１つもしくは複数）、反応感受性および治療への耐容性／応答が包含される。

【０１７２】

本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、そしてトランスフェリン－ポリカチオン媒介ＤＮＡ導入、裸のもしくは封入された核酸でのトランスフェクション、リポソーム媒介細胞融合、ＤＮＡ被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」およびＤＥＡＥ－もしくはリン酸カルシウム媒介トランスフェクションが包含されるがこれらに限定されるものではない確立した技術を用

いてエクスビボもしくはインビボのいずれかで細胞に導入することができる。
【０１７３】
抗体の有効なインビボ投薬量は、約５μｇ～約５００μｇ／ｋｇ患者体重の範囲である。抗体をコードするポリヌクレオチドの投与では、有効なインビボ投薬量は約１００ｎｇ～約５００μｇのＤＮＡの範囲である。
【０１７４】
本発明の抗体を含有する製薬学的組成物の投与の形態は、抗体を宿主に送達する任意の適当な経路であることができる。例として、本発明の製薬学的組成物は非経口投与（例えば、皮下、筋肉内、静脈内もしくは鼻腔内投与）に有用であることができる。
【０１７５】
本開示において引用される全ての特許および特許出願は、引用することにより明白に本明細書に組み込まれる。上記の開示は本発明を一般的に記述する。説明の目的のためにのみ提供されそして本発明の範囲を限定するものではない以下の特定の実施例を参照することにより、より完全な理解を得ることができる。
【０１７６】
実施例
本明細書に記述される構造、材料、組成物および方法は本発明の代表例であるものとし、そして本発明の範囲はこれらの実施例の範囲により限定されないことが理解される。本発明は開示される構造、材料、組成物および方法へのバリエーションを有して実施できることを当業者は認識し、そしてそのようなバリエーションは本発明の範囲内とみなされる。
【実施例１】
【０１７７】
ヒト組み合わせＦａｂライブラリー（ＨｕＣＡＬ　Ｇｏｌｄ）の構築
ＨｕＣＡＬ(R)ＧＯＬＤは、ＨｕＣＡＬ(R)技術に基づく抗体ライブラリーである（ヒト組み合わせ抗体ライブラリー；ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ　ＡＧ，Ｍａｒｔｉｎｓｒｉｅｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）。該ライブラリーは、６つの多様なＣＤＲ領域を特徴とするＦａｂ形態の合成の完全ヒト抗体ライブラリーを高親和性抗体の選択のためのディスプレイ技術、ＣｙｓＤｉｓｐｌａｙ(TM)（ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ　ＡＧ，Ｍａｒｔｉｎｓｒｉｅｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）と組み合わせる。ＣｙｓＤｉｓｐｌａｙ(TM)は、高親和性を有する特定の抗体の回収を可能にする、ジスルフィド結合を介した表現型－遺伝子型連鎖に基づく１価のファージディスプレイ技術である。
【０１７８】
ファージディスプレイベクターｐＭＯＲＰＨ(R)２３は、Ｆａｂフラグメントの１価のＣｙｓＤｉｓｐｌａｙ(TM)を可能にするファージミドベクターである。それは全長ｇＩＩＩｐ、Ｆｄ鎖（V_H－C_H１）および軽鎖（V_L－C_L）をコードし、これらは全てエシェリキア・コリのペリプラズムに対応するタンパク質鎖を導く異なる分泌シグナル配列を備えている。ｏｍｐＡおよびｐｈｏＡシグナル配列は両方とも、重鎖および軽鎖をペリプラズムに運ぶために利用され、そこで、非共有結合相互作用を介した鎖会合が起こる。このディスプレイベクターは、誘導性ｌａｃプロモーター／オペレーター領域を保有する。発現の抑制のためのｌａｑＩ^{q}遺伝子産物は、エシェリキア・コリ宿主株ＴＧ１により供給される。Ｃｙｓ－ｇＩＩＩｐおよびＦａｂ発現の誘導は、ＩＰＴＧ（イソプロピル－β－Ｄ－チオ－ガラクトピラノシド）の添加により行われる。濃縮されたＦａｂプールを制限酵素ＸｂａＩおよびＥｃｏＲＩを用いてｐＭＯＲＰＨ(R)２３からＦａｂ発現ベクターｐＭＯＲＰＨ(R)ｘ９にサブクローン化した。この工程により、システインおよびＦｄ鎖のＣ末端のリンカー－Ｈｉｓ６部分は取り除かれ、そしてｇＩＩＩｐが切り出される。発現ベクターｐＭＯＲＰＨ(R)ｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨは２つのＣ末端タグ、ＦＬＡＧおよび６ｘＨｉｓを提供し、従って、Ｆａｂタンパク質の検出および精製を容易にする。
【０１７９】
ファージミドレスキューおよびファージ増幅

ＴＧ１細胞中のＨｕＣＡＬ ＧＯＬＤ Ｆａｂファージミドを３４μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールおよび１％のグルコースを補足した２ｘＴＹ培地において増幅した。３７℃で３０分間のヘルパーファージ感染（ＶＣＳＭ１３ ～２－６ｘ１０^{11}ｐｆｕ／ｍｌ）の後に、ＴＧ１細胞を遠心分離により濃縮した。３４μｇ／ｍｌのクロラムフェニコール、５０μｇ／ｍｌのカナマイシンおよび０．２５ｍＭのＩＰＴＧを含有する２ｘＴＹにおける感染したＴＧ１細胞の２２℃で一晩のインキュベーションによりファージを増幅した。ファージを含有する上清をファージパンニングに使用した。

【実施例２】

【０１８０】

固相パンニング

固相パンニングは、ＭａｘｉＳｏｒｐ^{TM}プレート（Ｎａｌｇｅｎｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）もしくはＤｙｎａｂｅａｄｓ^{TM}（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）をＰＢＳにおいてヒトＭＮタンパク質（１μｇ／ウェルもしくは１μｇ／１ｍｇのビーズ）で被覆することにより実施した。ＭＮタンパク質は、精製のためのＣ末端ｈｉｓタグを有するタンパク質の全細胞外ドメインに相当する。ＭＮタンパク質は、当業者に周知である標準的な方法を用いて哺乳類細胞系ＨＫＢ－１１において発現させそしてＮｉ－ＮＴＡクロマトグラフィーにより精製した。結合したＭＮタンパク質を含有するウェルをＰＢＳ中５％のミルクでブロックし、ＰＢＳにおいて洗浄し、続いて１ｘ１０^{12}のＨｕＣＡＬ ＧＯＬＤ Ｆａｂファージを含有するあらかじめブロックしたＨｕＣＡＬ ＧＯＬＤファージライブラリーのアリコートと室温で２時間インキュベーションした。結合したファージを洗浄し、そして次にｐＨ８．０の１０ｍＭ Ｔｒｉｓバッファー中２０ｍＭのＤＴＴで溶出した。ファージ増幅を上記のように各回の間に行って３回のパンニングを行った。非特異的結合を減らすために各回のパンニング間で洗浄ストリンジェンシーを増加した。

【実施例３】

【０１８１】

エシェリキア・コリにおける発現のための選択したＦａｂフラグメントのサブクローニング

ＥＬＩＳＡスクリーニングのための可溶性Ｆａｂの迅速な発現を容易にするために選択したＦａｂをｐＭＯＲＰＨ$^{(R)}$２３ディスプレイベクターからｐＭＯＲＰＨ$^{(R)}$ｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨ発現ベクターにクローン化した。ｐＭＯＲＰＨ$^{(R)}$２３ベクターのＤＮＡ調製物をＥｃｏＲＩおよびＸｂａＩで消化し、このようにして全Ｆａｂをコードするフラグメント（ｏｍｐＡ－ＶＬ－ＶＬおよびｐｈｏＡ－Ｆｄ）を切り出した。その後の精製後に、調製したｐＭＯＲＰＨｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨ ベクター（同様にＥｃｏＲＩ／ＸｂａＩで消化しそして精製した）にフラグメントを連結した。Ｆａｂインサートを含有するベクターを電気穿孔によりコンピテントエシェリキア・コリＴＧ１ Ｆ－細胞にトランスフェクションした。形質転換したエシェリキア・コリ細胞を３４μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールおよび１％のグルコールを含有するＬＢプレート上で３７℃でｏ／ｎ培養した。コロニーを選択し、そして３４μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールおよび１％のグルコールを含有する培養培地に置いた。グリセロールを２０％になるように加え、そしてこれらのストックスターター培養物をＥＬＩＳＡに必要とされるまで－８０℃で保存した。精製されたＦａｂを得るために、このベクターを保有するエシェリキア・コリ形質転換体を当業者に周知である方法を用いて典型的には多数の１Ｌ振盪フラスコ培養において培養し、採取し、そしてＮｉ－ＮＴＡ親和性クロマトグラフィーを使用して精製した。

【実施例４】

【０１８２】

ＥＬＩＳＡによるＭＮに結合するＦａｂフラグメントの同定

Ｍａｘｉｓｏｒｐ ９６ウェルＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ中５μｇ／ｍｌの濃度の精製されたヒトＭＮタンパク質の溶液１００μｌ／ウェルで被覆した。開始ストック培養物から３４μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含有する２ｘＴＹ培地において培養したエ

シェリキア・コリ形質転換体を用いてＦａｂを発現させた。採取の１２時間前にＩＰＴＧ（０．５ｍＭの最終濃度）の添加によりＦａｂ発現を誘導した。細胞を溶解し、そしてＭＮをプレコートしそしてミルクでブロックしたＭａｘｉｓｏｒｐプレートのウェル内で１００μｌの溶解物を室温で２時間インキュベーションした。次に、非特異的結合を除くためにプレートをＴＢＳおよびＴｗｅｅｎを含有するＴＢＳにおいて洗浄した。結合したＦａｂは、アルカリホスファターゼに連結したヤギ抗ヒト（Ｆａｂ’）$_2$抗体（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）で検出した。基質ＡｔｔｏＰｈｏｓ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）を製造業者の説明書に従って使用し、励起は４３０ｎｍであり、そして発光は５３５ｎｍで読み取った。

【０１８３】

多数のエシェリキア・コリ形質転換体がＦａｂを発現し、それは＞１０のＥＬＩＳＡにおけるシグナル：ノイズ比を示した。ＶＨおよびＶＬ領域のＤＮＡシークエンシングにより５０を超えるユニークなＭＮ結合Ｆａｂが同定された。それらの機能特性に基づく１０個の抗体の全ＶＨおよびＶＬのＤＮＡおよびタンパク質配列をそれぞれ図３および４に示す。これらの１０個の開示される抗体の各々は、哺乳類発現細胞系、ＨＫＢ－１１から単離された精製ＭＮタンパク質にＥＬＩＳＡにより結合した（図５）。調べた抗体はまた、ＭＮの細胞外ドメインをコードするバキュロウイルスを感染させたｓｆ９昆虫細胞から単離された精製ＭＮとも反応し（図５）、ＥＬＩＳＡ相互作用がＭＮタンパク質に特異的であり、そしてタンパク質調製物における任意の微量の汚染物質にではないことを示す。ＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}アッセイにおいて、本発明の抗体は１ｎＭ（１ｘ１０$^{-9}$Ｍ）～約５０ｎＭ（５．０ｘ１０$^{-8}$ｎＭ）の範囲のK_dでヒトＭＮに特異的に結合する（図５）。

【実施例５】

【０１８４】

ＭＮに結合するＦａｂおよびＩｇＧの同定

ＭＮタンパク質と本発明の抗体との間の結合相互作用をＢＩＡｃｏｒｅ ３０００装置（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）上で表面プラズモン共鳴技術を用いて分析した。全長ＩｇＧ（１ｅ４，１ａａ１および３ｅｅ９）の結合には、標準的なアミンカップリングキット（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いてヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃを高密度でＣＭ５バイオセンサーチップに共有結合的に連結した。次に、３００応答単位ＢＩＡｃｏｒｅシグナルを目指して、捕獲アッセイを用いてこれらのＩｇＧを抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ固定化表面に結合した。ＢＩＡｃｏｒｅを２５℃およびＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ ２０を含有するかもしくは１０ｍＭ Ｎａ－ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５／１５０ｍＭ ＮａＣｌ／３ｍＭ ＥＤＴＡ／０．００５％Ｔｗｅｅｎ ２０を含有する１０μｌ／分のランニングバッファーの流速で操作した。リガンド結合後に、流速を次に２５μｌ／分に上げ、そして会合相をモニターすることができるように様々な濃度のＭＮ検体（例えば、５０ｎＭ～１ｎＭの範囲）を１０分間表面上に流した。次に、解離が３５分間進み、続いて１００μｌの１０ｍＭリン酸で１００μｌ／分で抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ固定化表面を再生した。速度定数を計算するために１：１ラングミュア結合モデルを用いてセンサーグラムをフィッティングした。抗ヒトＦａｂ ＩｇＧをチップ上に固定し、そしてＭＮ結合の評価の前にＦａｂを捕獲するために用いたことを除いて、ＭＮへのＦａｂの結合を同様に決定した。図５は、精製ＭＮタンパク質への開示される抗体の結合の得られる結合定数を示す。抗体の各々は、０．１５～５０ｎＭの間であるＫｄ値を示してＭＮに結合した。

【実施例６】

【０１８５】

２９３Ｆ細胞における一時的発現抗体発現のためのＨｕＣＡＬ免疫グロブリン発現ベクターの構築

重鎖発現ベクター．ｐｃＤＮＡ３．１＋（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のマルチクローニング部位を取り除き（ＮｈｅＩ／ＡｐａＩ）、そしてＨｕＣＡＬに使用した制限部位と適合する部位をリーダー配列（ＮｈｅＩ／ＥｃｏＲＩ）、ＶＨドメ

イン（ＥｃｏＲＩ／ＢｌｐＩ）および免疫グロブリン定常領域（ＢｌｐＩ／ＡｐａＩ）の連結のために挿入した。リーダー配列（ＥＭＢＬ　Ｍ８３１３３）は、コザック配列（Ｋｏｚａｋ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１５：８１２５－８１４８，１９８７）を備えていた。ヒト　ＩｇＧ１（ＰＩＲ　Ｊ００２２８）、ＩｇＧ４（ＥＭＢＬ　Ｋ０１３１６）および血清ＩｇＡ１（ＥＭＢＬ　Ｊ００２２０）の定常領域を約７０塩基の長さを有する重複するオリゴヌクレオチドに分けた。ＨｕＣＡＬ設計と適合しない制限部位を除くためにサイレント突然変異を導入した。オリゴヌクレオチドは、重複伸長ＰＣＲによりつなぎ合わせた。

【０１８６】

軽鎖発現ベクター．ｐｃＤＮＡ３．１／Ｚｅｏ＋（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のマルチクローニング部位を２つの異なる部位で置き換えた。κ部位は、κリーダー（ＮｈｅＩ／ＥｃｏＲＶ）、ＨｕＣＡＬ－ｓｃＦｖ　Ｖｋ－ドメイン（ＥｃｏＲＶ／ＢｓｉＷＩ）およびκ鎖定常領域（ＢｓｉＷＩ／ＡｐａＩ）の挿入のための制限部位を与えた。λ部位における対応する制限部位は、ＮｈｅＩ／ＥｃｏＲＶ（ｌリーダー）、ＥｃｏＲＶ／ＨｐａＩ（Ｖｌドメイン）およびＨｐａＩ／ＡｐａＩ（λ鎖定常領域）であった。κリーダー（ＥＭＢＬ　Ｚ０００２２）ならびにλリーダー（ＥＭＢＬ　Ｌ２７６９２）は両方とも、コザック配列を備えていた。ヒトκ鎖（ＥＭＢＬ　Ｊ００２４１）およびλ鎖（ＥＭＢＬ　Ｍ１８６４５）の定常領域は、上記のように重複伸長ＰＣＲにより組み立てた。

【０１８７】

Ｆａｂからの全長ＩｇＧの作製．エシェリキア・コリ発現ベクターｐＭＯＲＰＨｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨ内に含有されるＦａｂ重鎖配列をＭｆｅＩ／ＢｌｐＩで切断することにより切り出し、そしてＥｃｏＲＩ／ＢｌｐＩで切断した上記の重鎖発現ベクターに連結した。ｐＭＯＲＰＨｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨ内に含有されるＦａｂカッパ軽鎖配列をＥｃｏＲＶ／ＢｓｉＷＩで切り出し、そしてＥｃｏＲＶ／ＢｓｉＷＩで同様に切断した上記のカッパ軽鎖発現ベクターに連結した。ｐＭＯＲＰＨｘ９＿Ｆａｂ＿ＦＨ内に含有されるＦａｂラムダ軽鎖配列をＥｃｏＲＶ／ＨｐａＩで切り出し、そして上記のラムダ発現ベクターに連結した。

【０１８８】

全長ＩｇＧの大規模一時的発現．Ｃｅｌｌｂａｇ　２０Ｌ／０（Ｗａｖｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＬＬＣ，Ｓｏｍｅｒｓｅｔ，ＮＪ）を９．３ＬのＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　２９３発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）において０．２５ｘ１０^{6}の２９３Ｆ細胞／ｍｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で接種した。細胞を１ｘ１０^{6}／ｍｌの密度まで培養し、そして２９３ｆｅｃｔｉｎ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含有する３５０ｍｌのＯｐｔｉｍｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）における全長抗体をコードする各々５ｍｇの軽鎖発現ベクターおよび重鎖発現ベクターの添加によりトランスフェクションした。３７℃で９６時間の発酵後に、細胞培養上清を遠心分離により採取し、無菌濾過し、ｐＨ７．６に調整した接線流濾過により濃縮し、そして次に標準的なプロテインＡカラムクロマトグラフィー（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）に供した。

【実施例７】

【０１８９】

細胞接着アッセイ

ＰＢＳ中の精製されたＭＮの１μｇ／ｍＬ溶液の５０μＬを無処理の９６ウェルプレート上に４℃で一晩吸着させた。溶液を除き、そしてウェルをＰＢＳで３ｘすすいだ。ウェルをＲＰＭＩ１６４０倍地中５０％のＦＢＳ２００μＬで１時間ブロックした。次に、ウェルをＰＢＳ中１％のＢＳＡにおける１００μｇの１ｅ４抗ＭＮ抗体、ＰＢＳ中１％のＢＳＡにおけるコントロールＩｇＧもしくはＰＢＳ中１％のＢＳＡで処理した。ＰＢＳで洗浄した後に、５０００のＭａＴｕ細胞（ＭＮ＋細胞）をウェルに加え、そしてプレートを３７℃で５％CO_2で一晩インキュベーションした。ＭＮ被覆ウェルへのＭａＴｕ細胞の

接着を阻止する抗ＭＮ抗体の能力をＰＢＳでの洗浄後に評価した。この実験の例は図６に示され、ここで、１００μｇの抗ＭＮ抗体１ｅ４は細胞接着を阻止し、一方、コントロールＩｇＧもしくはバッファー賦形剤はそうしない。

【実施例８】

【０１９０】

免疫コンジュゲートでの皮下異種移植片癌モデル

当該技術分野において既知であるプロトコル（例えば、Ｌｉｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３：８６１８－８６２３，１９９６．）を用いて抗ＭＮ抗体を細胞毒性小分子に連結した。ヒト乳房異種移植片、ＭａＴｕ細胞を１０％ＦＢＳを補足したＲＰＭＩにおいて接着培養物として維持した。Ｎｃｒヌードマウス（８～１２週齢）に０．１ｍＬの８０％マトリゲル／２０％ＨＢＳＳ中５ｘ１０^{6}細胞を右横腹に皮下接種した。腫瘍が～１８０ｍｇの平均サイズに達すると（６日）、処置を開始した。細胞毒性小分子に連結したモノクローナル抗体を１０ｍｇ／ｋｇの用量で４日ごとに１回ｉ．ｖ．投与した（Ｑ４Ｄｘ３）。コントロールマウスは、ＰＢＳもしくは非連結モノクローナル抗体で処置した。各動物の健康状態の毎日の検査を行った。各実験群は１０匹のマウスからなり、そして投与容量は０．１ｍＬ／１０ｇ体重であった。各腫瘍の長さおよび幅を週に２～３回電子カリパスを用いることにより測定し、そして腫瘍重量（ｍｇ）を［長さ（ｍｍ）ｘ幅（ｍｍ）^{2}］／２の式に基づいて計算した。研究経過を通して得られる毎日の観察を包含する全てのデータを記録した。腫瘍増殖阻害（ＴＧＩ）は１－Ｔ／Ｃｘ１００として計算し、ここで、Ｔ＝処置群からの最終腫瘍重量、そしてＣ＝コントロール群からの最終腫瘍重量。図７は、細胞毒性薬に連結した場合にモノクローナルＩｇＧ１ｌｅ４が３０ｍｇ／ｋｇの免疫コンジュゲートで有意な抗腫瘍効果をもたらし、一方、非連結抗体は効果がなかったことを示す。これらのデータは、腫瘍への細胞毒性薬送達の媒体としてのＭＮタンパク質に対する抗体の治療有用性を示す。

【実施例９】

【０１９１】

蛍光活性化細胞選別アッセイ（ＦＡＣＳアッセイ）

診断手段としてＭＮ発現について細胞をアッセイすることができる。接着性ＭＮ発現ＰＣ－３　ｍｍ２細胞および非ＭＮ発現ＤＬＤ１細胞を５～１０分間ＰＢＳ溶液中１：１０のトリプシン／バーセン（Ｖｅｒｓｅｎｅ）でそれらのフラスコからはがした。細胞を沈降させ（１０００ｒｐｍ、５分）、よく冷えたＲＰＭＩ　１０％ＦＢＳで１回洗浄し、そしてよく冷えた染色バッファー（Ｃａ$^{+}$　Ｍｇ$^{+}$フリーのＰＢＳ、２％ＢＳＡおよび０．０５％アジ化ナトリウム）に６ｘ１０^{6}細胞／ｍｌで再懸濁した。２５μｇ／ｍＬの一次抗体、ヒト抗ＭＮ　ＩｇＧ１もしくはコントロールヒトＩｇＧ１抗体を６ｘ１０^{5}細胞と氷上で１時間インキュベーションした。結合していない抗体をよく冷えた染色バッファーで細胞から洗浄した。細胞をＰＢＳ中２％のホルムアルデヒドで１０分間固定し、次に染色バッファーで２回洗浄した。抗ヒトＡｌｅｘａ　ｆｌｕｏｒ　４８８二次抗体（最終濃度．１：２００，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含有する１００μｌのよく冷えた染色バッファーに細胞ペレットを再懸濁し、そして氷上で１時間インキュベーションした。結合していない抗体をフローバッファー（２％ＢＳＡを含有するＰＢＳ）で２回細胞から洗浄し、そして細胞を１ｍＬのフローバッファーに再懸濁した。再懸濁した細胞のＦＡＣＳ分析をＢｅｃｋｍａｎ　ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｅｒ装置で行った。図８は、ＰＣ－３　ｍｍ２ヒト前立腺癌細胞がＦＡＣＳによりアッセイした場合にＭＮを発現し、一方、ＤＬＤ－１細胞はそうでなかったことを示す。

【実施例１０】

【０１９２】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害アッセイ（ＡＤＣＣアッセイ）

抗ＭＮ　ＩｇＧの抗腫瘍活性は、ＡＤＣＣ活性により媒介され得る。ＭＮ発現ＰＣ－３　ｍｍ２細胞および非ＭＮ発現ＨＣＴ－１１６細胞を２５０　ｎｇ／ｍＬ、１０００ｎｇ

／ｍＬもしくは２０００ｎｇ／ｍＬのヒト抗ＭＮ　ＩｇＧ１もしくはコントロールヒトＩｇＧ１抗ジゴキシン抗体とインキュベーションする。ヒトＰＢＭＣを５０：１、２５：１および５：１の比率のエフェクター：標的比でこれらの細胞に加える。標的細胞溶解のレベルを決定するためにクロム－５１遊離アッセイを行う。ＤＬＤおよびＰＣ－３　ｍｍ２細胞の存在下でコントロール抗体もしくは抗体なしのインキュベーションの際に少量の溶解が認められる。溶解のこの自然レベルは、それぞれ、５０：１、２５：１および５：１の標的エフェクター比について１０～１５％、５～１０％もしくは２～３％である。同様に、非ＭＮ発現ＤＬＤ細胞の溶解は、抗ＭＮ抗体とインキュベーションした場合に０～１０％の範囲であった。しかしながら、ＰＣ－３　ｍｍ２細胞の溶解は、ヒト抗ＭＮ　ＩｇＧとインキュベーションした場合にコントロールより有意に高かった。５０：１の標的：エフェクター比で２５０ｎｇ／ｍＬ、１０００ｎｇ／ｍＬおよび２０００ｎｇ／ｍＬを用いた場合に４０、５０および６０％の溶解が認められた。同様に、２５：１の比率で３０、３３および３８％の溶解が認められ、そして最後に５：１の標的：エフェクター比で８、１０および１５％の溶解が認められた。これらの実験は、ヒト抗ＭＮ抗体が抗腫瘍ＡＤＣＣ活性を媒介し、そして癌の治療処置に使用できることを示す。

【実施例１１】

【０１９３】

免疫コンジュゲート

製造

ＭＮ細胞表面抗原に対するヒト抗体を多様なヒトＦａｂをコードするファージディスプレイライブラリー（Ｍｏｒｐｈｏｓｙｓ）を用いて作製した。この抗体をモノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）（Ｆｒａｎｓｉｓｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００３，１０２：１４５８－１４６５）に連結した（図９）。

【０１９４】

インビトロ活性および選択性

３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗体部分（３ｅｅ９）は、10^{10}のヒトＦａｂフラグメント（Ｆａｂは抗体の抗原結合部分である）からなるＭｏｒｐｈｏＳｙｓファージライブラリーに対するヒトＭＮの精製された細胞外ドメインのインビトロ「パンニング」により同定された。活性ＦａｂをＭＮ陽性細胞への添加の際に選択的に結合しそして内在化を受けるそれらの能力についてさらに調べた。次に、得られる活性Ｆａｂを全長ヒトＩｇＧ１抗体に転化し、ＣＨＯ細胞において発現させ、精製し、そして次にトキソフォア（ｔｏｘｏｐｈｏｒｅ）、ＭＭＡＥ（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ，１９９６，９３：８６１８－８６２３）に連結した。次に、連結抗体をＭＮ発現細胞を殺すそれらの能力について試験した。試験した７つの全長抗体のパネルから、３ｅｅ９／ＭＭＡＥをインビトロおよびインビボアッセイの両方におけるその結合特性、選択性および効能に基づいて選択した。

【０１９５】

表面プラズモン共鳴（Ｂｉａｃｏｒｅ）材料および方法

ＨＫＢ１１により発現されるヒトＭＮタンパク質とヒト全長抗ＭＮ　ＭＡｂとの間の結合相互作用をＢＩＡｃｏｒｅ　３０００装置（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）で表面プラズモン共鳴技術を用いて分析した。チップ調製には、ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃを標準的なアミンカップリングキット（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いてＣＭ５バイオセンサーチップに共有結合的に連結した。次に、３００共鳴単位ＢＩＡｃｏｒｅシグナルを目指して、捕獲アッセイを用いて興味のある抗体を抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ固定化表面に結合した。ＢＩＡｃｏｒｅは、２５℃で１０ｕｌ／分の流速および１０ｍＭ　Ｎａ－ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ／３ｍＭ　ＥＤＴＡ／０．００５％Ｔｗｅｅｎ　２０を含有するランニングバッファーで操作した。リガンド結合後に、流速を２５ｕｌ／分に上げ、そして会合相をモニターすることができるようにＭＮ検体（５０ｎＭ～１ｎＭ）を表面上に１０分間流した。次に、解離が３５分間進み、続いて１０ｍＭのリン酸で１００ｕｌ／分で抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ固定化表面を再生

した。速度定数を計算するために１：１ラングミュア結合モデルを用いてセンサーグラムをフィッティングした（以下の表１）。

【０１９６】

【表１】

表1

表面プラズモン共鳴(Biacore)により決定される可溶性MNへのパンニング由来の抗体の親和性

	1E4	3EE9	1AA1	3A4	5AA3	3EF2
親和性（Kd, nM）	5	4	27	1	1	6

【０１９７】

抗体結合

３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、Ｂｉａｃｏｒｅ技術を用いて精製ＭＮタンパク質に３．６ｎＭのｋＤを有することが示され、それは非連結抗体３ｅｅ９の親和性と同じであった。１３個の他のカルボニックアンヒドラーゼへの検出可能な結合はなかったので、ＭＮ（ＣＡＩＸ）への結合は特異的であると思われた。ミトコンドリア関連ＣＡ５への結合が認められたが、このアイソザイムはインビボで抗体に近づくことはできない。

【０１９８】

ＦＡＣＳ分析により、３ｅｅ９／ＭＭＡＥはＭＮ発現ＭａＴｕ細胞に結合するがＭＮ陰性ＤＬＤ細胞にはそうでないことが示された（図１０ａ）。ＭＮ抗体Ｇ２５０、ヒト化ＩｇＧ１抗体、（Ｗｉｌｅｘ）をインビトロ研究を通して基準として用いた。それは５．３ｎＭのＫｄでＭＮに結合し、そして３ｅｅ９／ＭＭＡＥと同様のＭＮ＋およびＭＮ－細胞系への結合プロフィールを示した。

【０１９９】

同様の結果が抗体１Ｅ４および１ａａ１免疫コンジュゲートについて得られ（それぞれ、図１０ｂおよび１０ｃ）、それらはＭＮ＋細胞への結合を示したが、ＭＮ－細胞にはそうでなかった。

【０２００】

抗体内在化

Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓにより測定した場合に、３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、ＭＮ発現細胞（ＰＣ３ｍｍ２）により選択的に内在化されたが、ＭＮ陰性細胞（ＤＬＤ１）ではそうでなかった（図１１ａ）。同様に、１Ｅ４免疫コンジュゲートは、ＭＮ＋細胞（ＰＣ３ｍｍ２）により内在化されるが、ＭＮ－（ＤＬＤ１）細胞ではそうでないことが見出された（図１１ｂ）。

【０２０１】

免疫沈降

特異性をさらに研究するために、ビオチンで選択的に標識したＭＮ＋（Ｐｃ３ｍｍ２）およびＭＮ－（ＤＬＤ－１）細胞系の細胞溶解物と３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗体部分（３ｅｅ９）および基準抗体Ｇ２５０を包含する様々な候補抗体をインキュベーションした。抗体と細胞タンパク質との間の複合体を免疫沈降させ、そして酵素結合ストレプトアビジンで発色させる免疫ブロットを用いて共沈した抗原を視覚化した。Ｇ２５０および３ｅｅ９／ＭＭＡＥの３ｅｅ９抗体は両方とも選択的に結合し、そしてＭＮ＋細胞からＭＮと同じサイズの単一バンドと共免疫沈降した（図１２）。３ｅｆ２、５ａａ３および５Ａ６のようなより低い特異性の抗体は、ＭＮに加えていくつかの他のタンパク質を共免疫沈降した。

【０２０２】

細胞毒性

インビトロ細胞毒性アッセイを実施した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、ＭＮ発現ＰＣ３ｍｍ２細胞に対して高度に細胞毒性を有するが（ＥＣ５０＝５０ｎＭ）、ＭＮ陰性ＭＩＡＰａｃａ２細胞に対してはそうでないことが見出された（図１３ａ）。１ｕＭほどの高い用量でさえＭＮ陰性細胞の１０％未満の死滅しか見られなかった。１Ａ４免疫コンジュゲートもまた、インビトロ細胞毒性アッセイにおいてＭＮ＋細胞（ＰＣ３ｍｍ２およびＭａＴｕ）に対して選択的に細胞毒性を有するが、ＭＮ－細胞（ＭＩＡＰａｃａ２およびＤＬＤ１）に対してはそうでないことが見出された（図１３ｂ）。さらに、１ａａ１免疫コンジュゲートは、インビトロ細胞毒性アッセイにおいてＭＮ＋細胞（ＰＣ３ｍｍ２）に対して選択的に細胞毒性を有するが、ＭＮ－細胞（ＭＩＡＰａｃａ２）に対してはそうでないことが見出された（図１３ｃ）。

【０２０３】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥにより送達される細胞毒性薬ＭＭＡＥは、Ｇ２／Ｍ停止をもたらす細胞有糸分裂中の紡錘体形成を妨げるチューブリン阻害剤である。３ｅｅ９／ＭＭＡＥでのＭＮ発現細胞（Ｐｃ３ｍｍ２）およびＭＮ非発現細胞（Ｈ４６０）の処置の効果を図１４に示す。チューブリンは、蛍光標識抗体で染色される。未処置の細胞は正常な紡錘体形成を示し、一方、処置したＭＮ発現細胞はＭＭＡＥとのチューブリン結合および正常な紡錘体形成の阻止に起因する断片化繊維を示した。ＭＮ非発現細胞において活性は見られなかった。これらの研究は、抗体薬剤コンジュゲート３ｅｅ９／ＭＭＡＥが標的化チューブリン破壊によって細胞を殺すことを裏付けた。

【実施例１２】

【０２０４】

免疫コンジュゲートのインビボ活性

皮下移植したヒト異種移植片癌モデルに対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥのインビボ薬理学

３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、間欠スケジュールで静脈内経路によって投与した場合に無胸腺マウスにおける多数のヒト異種移植片腫瘍モデルの増殖への有意なそして一貫した抗腫瘍効果を示す。３ｅｅ９／ＭＭＡＥのインビボ抗腫瘍効果を６つの異なるヒト異種移植片腫瘍モデルにおいて調べた。これらのモデルは、メス無胸腺ＮＣｒ（ｎｕ／ｎｕ）マウス（Ｔａｃｏｎｉｃ，ＮＹ）へのヒト腫瘍細胞の皮下移植によって樹立した。評価したヒト腫瘍異種移植片モデルには、ＭａＴｕヒト乳癌モデル、ＨＴ－２９およびＣｏｌｏ－２０５ヒト結腸直腸癌（ＣＲＣ）モデル、ＰＣ３ＭＭ２前立腺癌モデル、ＨＣＴ－１５多剤耐性（Ｐ－ｇｐ）ＣＲＣモデルおよびＭｉａＰａＣａ２ヒト膵臓モデルが包含された。ＰＢＳを賦形剤として使用し、そして投与溶液は毎日新たに調製した。投与容量は０．１ｍＬ／１０ｇ（１０ｍＬ／ｋｇ）であった。

【０２０５】

各腫瘍の長さおよび幅を週に２～３回電子カリパスを用いて測定し、そして腫瘍重量（ｍｇ）を［長さ（ｍｍ）ｘ幅（ｍｍ）^{2}］／２の式に基づいて計算した。研究経過を通して得られる毎日の観察を包含する全てのデータは、抗腫瘍データ収集システム（ＡＤＡＳ）において記録した。最大耐容用量（ＭＴＤ）は、２０％より大きい死亡率および／もしくは２０％の正味の体重減少をもたらさない最も高い用量として定義される。腫瘍増殖阻害（ＴＧＩ）は（１－Ｔ／Ｃ）ｘ１００として計算され、ここで、Ｔ＝最後の投与後の処置群からの最終腫瘍重量、そしてＣ＝最後の投与後のコントロール群からの最終腫瘍重量。さらに、抗腫瘍効能は、それらの最初のサイズの≦５０％を有する腫瘍として定義される応答（もしくは応答物（ｒｅｓｐｏｎｄｅｒ）もしくは退縮）の発生率として測定した。応答が永続的と見なされるには７日の最小期間が必要とされる。

【０２０６】

ＭａＴｕ異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効能

ヒト乳房異種移植片、ＭａＴｕ細胞を１０％のＦＢＳを補足したＲＰＭＩにおいて接着培養物として維持した。ＮＣｒヌードマウス（８～１２週齢）に０．１ｍＬの８０％マトリゲル／２０％ＨＢＳＳ中５ｘ１０^{6}の細胞を右横腹に皮下接種した。腫瘍が～１８０ｍ

ｇの平均サイズに達すると（７日）、処置を開始した。ＢＡＹ　７９－４６２０（３ｅｅ９－ＩＣ）を１、３および１０ｍｇ／ｋｇの用量で４日ごとに１回ｉ．ｖ．投与した（Ｑ４Ｄｘ３）。コントロールマウスは、ＰＢＳもしくは１０ｍｇ／ｋｇの用量の非連結モノクローナル抗体で処置した。

【０２０７】

各動物の健康状態の毎日の検査を行った。各実験群は１０匹のマウスからなり、そして投与容量は０．１ｍＬ／１０ｇ体重であった。各腫瘍の長さおよび幅を週に２～３回電子カリパスを用いることにより測定し、そして腫瘍重量（ｍｇ）を［長さ（ｍｍ）ｘ幅（ｍｍ）^{2}］／２の式に基づいて計算した。研究経過を通して得られる毎日の観察を包含する全てのデータを記録した。腫瘍増殖阻害（ＴＧＩ）は１－Ｔ／Ｃｘ１００として計算され、ここで、Ｔ＝処置群からの最終腫瘍重量、そしてＣ＝コントロール群からの最終腫瘍重量。

【０２０８】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥは調べた全ての用量で良好な耐容性を示し、全ての処置動物は有意な体重減少を示さなかった。ＭａＴｕ腫瘍モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの代表的な効能を図１５に例示する。未処置および賦形剤処置コントロール群の両方からの腫瘍は、全ての動物において次第に増大した。コントロールおよび賦形剤群における動物の平均倍加時間は１１．２日であった。投与の最後に、３ｅｅ９／ＭＭＡＥは調べた全ての用量で強い抗腫瘍効能を示した。さらに特に、ＢＡＹ７９－４６２０（３ｅｅ９－ＩＣ）は、それぞれ、１、３および１０ｍｇ／ｋｇで６７、７２および７８％のＴＧＩをもたらした。比較して、非連結３ｅｅ９　ｍＡｂは、この乳房異種移植片腫瘍の増殖を阻害することにおいて有意な効果がなかった。

【０２０９】

既定の投与処方計画（Ｑ４Ｄｘ３）の完了後に、腫瘍増殖遅延および退縮への３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効果を決定した。図１５に示されるように、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの処置は有意な腫瘍増殖遅延および退縮をもたらした。調べた最も低い用量（１ｍｇ／ｋｇ）で、処置の中止後に、腫瘍は～２週間安定なままであり、そしてその後に再び増殖し始めた。全体で、３０％の腫瘍が１ｍｇ／ｋｇのこの処置に応答した。比較して、１００％の動物が３および１０ｍｇ／ｋｇで調べた場合に応答した。注目すべきは、処置の中止後～３ヶ月後でさえ、それぞれ、３および１０ｍｇ／ｋｇ群において３および１つの腫瘍のみが再増殖の徴候を示し、７０および９０％の動物が処置の中止後～９０日後でさえ腫瘍のないままであることを示した。

【０２１０】

モノクローナルＩｇＧ１　１Ｅ４は、細胞毒性薬に連結した場合に、３０ｍｇ／ｋｇの免疫コンジュゲートで投与すると、ヒト乳房異種移植片、ＭａＴｕに対して有意な抗腫瘍効果をもたらし、一方、非連結抗体は効果がなかった（図１６）。同じプロトコルを使用するが、抗体１ａａ１（図１７）、３ｅｅ９および５ａａ３の連結形態を代用するさらなる実験は、同様な結果を与えた。さらに、３ｅｅ９の連結形態を使用する場合、ＨＴ－２９およびＣｏｌｏ－２０５ヒト結腸直腸癌異種移植片モデルおよびＰＣ３－ｍｍ２、ヒト前立腺異種移植片モデルを包含する様々な組織学的タイプ由来の他の異種移植片モデルにおいて抗腫瘍効果が見られた。これらのデータは、腫瘍への細胞毒性薬送達の媒体としてのＭＮタンパク質に対する抗体の治療有用性を示す。

【実施例１３】

【０２１１】

ＭａＴｕ異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの治療指数決定

３ｅｅ９／ＭＭＡＥの最大耐容用量（ＭＴＤ）、最小有効用量（ＭＥＤ）および治療指数（ＴＩ）をＭａＴｕ異種移植片腫瘍保有マウスを用いて決定した。ＴＩは、ＭＥＤで割ったＭＴＤの比率として定義される。３ｅｅ９／ＭＭＡＥを合計３回の注射にわたって４日目ごとに１回静脈内投与した（Ｑ４Ｄｘ３）。３ｅｅ９／ＭＭＡＥを０．６２５、１．２５、２．５、５．０、１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇの用量レベルで投与した。コン

トロールマウスは、ＰＢＳもしくは６０ｍｇ／ｋｇの用量の非連結モノクローナル抗体で処置した。６０ｍｇ／ｋｇで投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、この処置に応答して１０％の死亡率および～２０％の体重減少があったので、ＭＴＤであると思われた。全ての他の処置群は、良好な耐容性を示した。

【０２１２】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍活性を図１８に提示する。投与の最後に、０．６２５および１．２５ｍｇ／ｋｇの用量の３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、それぞれ、６２および８１％の阻害をもたらした。２．５、５、１０、３０および６０ｍｇ／ｋｇの用量は、腫瘍増殖のより大きい阻害（～９０％）をもたらし、腫瘍の大部分は退縮を示し始めた。認められるデータに基づき、３ｅｅ９／ＭＭＡＥのＭＥＤは０．６２５ｍｇ／ｋｇであった。既定の投与処方計画（Ｑ４Ｄｘ３）の完了後に、腫瘍増殖遅延および退縮への３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効果を決定した。０．６２５ｍｇ／ｋｇの用量では腫瘍退縮は見られなかった。対照的に、１．２５ｍｇ／ｋｇに応答して８０％の動物が腫瘍退縮を示した。さらに、２．５ｍｇ／ｋｇ以上の用量で、１００％の動物が処置に応答した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥの治療指数は、～９６であると決定された。

【実施例１４】

【０２１３】

ＨＴ－２９異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効能

ヒトＣＲＣ異種移植片、ＨＴ－２９細胞を０．１ｍＬのＨＢＳＳ中５ｘ１０^{6}の細胞で右横腹に皮下接種した。腫瘍が～１２０ｍｇの平均サイズに達すると（５日）、処置を開始した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥを０．６２５、１．２５、２．５、５．０、１０ｍｇ／ｋｇの用量で４日ごとに１回ｉ．ｖ．投与した（Ｑ４Ｄｘ３）。コントロールマウスは、ＰＢＳもしくは１０ｍｇ／ｋｇの用量の非連結モノクローナル抗体で処置した。さらに、ＭＭＡＥを０．１、０．２および１ｍｇ／ｋｇの用量で遊離の薬剤として評価した。０．１および０．２ｍｇ／Ｋｇの用量のＭＭＡＥは、それぞれ、５および１０ｍｇ／Ｋｇの３ｅｅ９／ＭＥＡＥ上に存在するものと同等量のこの薬剤に相当する。

【０２１４】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥは調べた全ての用量で良好な耐容性を示し、全ての処置動物は有意な体重減少を示さなかった。同様に、より低い用量のＭＭＡＥ、すなわち、０．１および０．２ｍｇ／ｋｇもまた有意でないわずかな体重減少で良好な耐容性を示した。しかしながら、１ｍｇ／ｋｇの最高用量で、５０％の死亡率が認められ、残りの動物は激しい体重減少を示し、従って有毒であると見なされた。

【０２１５】

ＨＴ－２９腫瘍モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥおよび遊離のＭＭＡＥの代表的な効能を図１９に例示する。未処置および賦形剤処置コントロール群の両方からの腫瘍は、全ての動物において次第に増大した。コントロールおよび賦形剤群における動物の平均倍加時間は６．４日であった。投与の最後に、３ｅｅ９／ＭＭＡＥは調べた全ての用量で強い抗腫瘍効能を示した。さらに特に、０．６２５、１．２５、２．５、５および１０ｍｇ／ｋｇの用量の３ｅｅ９／ＭＭＡＥは，それぞれ、５４、７２、９７、１００および１００％のＴＧＩをもたらした。それに対して、０．２ｍｇ／ｋｇの遊離のＭＭＡＥは６０％の有意なＴＧＩをもたらし、一方、０．１ｍｇ／ｋｇはこの異種移植片モデルの増殖を阻害することにおいて有意な効果がなかった。腫瘍応答に関して、１．２５ｍｇ／ｋｇで投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥは退縮を示す２０％の動物をもたらした。より高い用量で、腫瘍応答はいっそう大きく、２．５ｍｇ／ｋｇは９０％の退縮を示し、そして５および１０ｍｇ／ｋｇは１００％の応答を誘導した。対照的に、遊離のＭＭＡＥは上記に定義されるようないかなる腫瘍応答を誘導しなかった。

【０２１６】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効果はまた、様々なスケジュール、すなわち、合計２回の投与わたって週に１回の投与（Ｑ７Ｄｘ２、図２０）および病期診断時に単一の投与（Ｑ１Ｄｘ１、図２１）においても評価した。両方のスケジュールにおいて、３ｅｅ９／ＭＭ

ＡＥを０．６２５、１．２５、２．５、５および１０ｍｇ／ｋｇで投与した。スケジュールにかかわらず、３ｅｅ９／ＭＭＡＥはこのＣＲＣ異種移植片モデルにおける増殖を阻害することにおいて非常に有効であった。

【０２１７】

以下の表２は、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能を要約する。抗腫瘍効能は、Ｑ４Ｄｘ３スケジュールにおいて３ｅｅ９／ＭＭＡＥに認められるものと非常に類似し、調べたスケジュールにおいて、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能がスケジュール非依存性であると思われることを示した。

【０２１８】

【表２】

表2

3ee9／MMAEの抗腫瘍効能

化合物	用量（mg／kg）	処置スケジュール	%阻害（1－T／D）＊100（18日）	パーセント退縮
コントロール	N／A	N／A	N／A	0
PBS	0	Q4Dx3	－17	0
3ee9 Ab	10	Q4Dx3	－11	0
3EE9IC	0. 625	Q4Dx3	54	0
3EE9IC	1. 25	Q4Dx3	72	2
3EE9IC	2. 5	Q4Dx3	97	9
3EE9IC	5	Q4Dx3	100	10
3EE9IC	10	Q4Dx3	100	10
3EE9IC	0. 625	Q7Dx2	48	0
3EE9IC	1. 25	Q7Dx2	71	0
3EE9IC	2. 5	Q7Dx2	92	4
3EE9IC	5	Q7Dx2	96	7
3EE9IC	10	Q7Dx2	100	10
3EE9IC	0. 625	Q1Dx1	42	0
3EE9IC	1. 25	Q1Dx1	48	0
3EE9IC	2. 5	Q1Dx1	93	5
3EE9IC	5	Q1Dx1	98	8
3EE9IC	10	Q1Dx1	100	10
MMAE	1	Q4Dx3	有毒	N／A
MMAE	0. 1	Q4Dx3	27	0
MMAE	0. 2	Q4Dx3	60	0

【実施例１５】

【０２１９】

ＰＣ３ｍｍ２およびＣｏｌｏ－２０５異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効能

３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍活性を次にヒト前立腺（ＰＣ－３ｍｍ２）およびＣＲＣ（

Ｃｏｌｏ－２０５）腫瘍異種移植片に対して評価した。メスＮＣｒ　ｎｕ／ｎｕマウスに５ｘ１０^{6}のＰＣ３ｍｍ２もしくはＣｏｌｏ－２０５細胞のいずれかを皮下に（ｓ．ｃ．）移植した。腫瘍が約１２５～１５０ｍｇの平均サイズのものになると処置を開始した。マウスの一般的な健康をモニターし、そして毎日記録した。腫瘍寸法および体重を処置の初日から開始して週に２回記録した。

【０２２０】

ＰＣ３ｍｍ２およびＣｏｌｏ－２０５研究において、３ｅｅ９／ＭＭＡＥをそれぞれ１、３、１０および３０ｍｇ／ｋｇそして１．２５、２．５、５および１０ｍｇ／ｋｇの用量で合計３回の注射にわたって４日目ごとに１回静脈内（ｉ．ｖ．）投与した（Ｑ４Ｄｘ３）。他の研究におけるように、３ｅｅ９／ＭＭＡＥは評価した全ての用量で良好な耐容性を示した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、１０および３０ｍｇ／ｋｇの用量レベルで投与した場合に、樹立したＰＣ３ＭＭ２前立腺腫瘍の増殖を阻害し、１００％の動物が応答を示した（図２２）。１および３ｍｇ／ｋｇのより低い用量で、４５～５０％のＴＧＩが投与の最後で認められたように、中程度の効果のみが見られた。しかしながら、２０％の動物は３ｍｇ／ｋｇ群において応答を示した。

【０２２１】

同様に、Ｃｏｌｏ－２０５　ＣＲＣ異種移植片モデルにおいて、３ｅｅ９／ＭＭＡＥは腫瘍増殖を阻害することにおいて非常に有効であった（図２３）。投与の最後に、＞９０％のＴＧＩが５および１０ｍｇ／ｋｇの用量について認められ、そして＞７０％のＴＧＩが２．５ｍｇ／ｋｇの用量に応答して見られた。３ｅｅ９／ＭＭＡＥの最も低い用量、１ｍｇ／ｋｇは、このＣＲＣモデルに対して比較的効果がなかった。退縮に関して、５および１０ｍｇ／ｋｇで投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥはそれぞれ４０および８０％の応答をもたらした。

【実施例１６】

【０２２２】

ＨＣＴ－１５異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効能

多剤耐性モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効果を調べるために、メスＮＣｒ　ｎｕ／ｎｕマウスに５ｘ１０^{6}のＨＣＴ－１５細胞を皮下に（ｓ．ｃ．）移植した。ＨＣＴ－１５は、Ｐ－糖タンパク質（Ｐ－ｇｐ）を過剰発現する多剤耐性（ＭＤＲ）系統である。そのようなものとして、この細胞系は多剤耐性表現型を示し、そしてタキソール$^{(R)}$、ドキソルビシンおよびエトポシドに耐性を示す。マウスが～１５０ｍｇの平均重量を有する腫瘍を樹立すると３ｅｅ９／ＭＭＡＥ、タキソールおよびゲムシタビンを投与した。ゲムシタビン、Ｐ－ｇｐ基質ではないピリミジンアナログは、陽性コントロールとして使用した。予想されるように、ゲムシタビン（１２０ｍｇ／ｋｇ，ｉ．ｐ．，ＱＤｘ１０）は、このＭＤＲモデルにおいて非常に有効であった（図２４）。対照的に、３ｅｅ９／ＭＭＡＥ（ＭＭＡＥはＰ－ｇｐの既知の基質である）およびタキソール$^{(R)}$は、いかなる有意な抗腫瘍効果ももたらすことができなかった。

【実施例１７】

【０２２３】

ｈｕＭＮ－ＭＩＡＰａｃａ２およびＭＩＡＰａｃａ２異種移植片モデルにおける３ｅｅ９／ＭＭＡＥの効能

ＭＮ発現と抗腫瘍効能との間の関係をよりよく理解するために、低ＭＮ発現膵臓モデル、ＭＩＡＰａＣａ２および高ＭＮ発現ｈｕＭＮ－ＭＩＡＰａＣａ２モデルを用いて異種移植片効能研究を行った。この後者の系統は、ＭＮを安定に発現するようにＭＩＡＰａＣａ２系統を設計することにより得られた。３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、この低ＭＮ発現ＭＩＡＰａＣａ２系統の増殖を阻害することにおいてわずかな効果しかなかった（図２５）。１０ｍｇ／ｋｇで投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥのみが５０％のＴＧＩをもたらした。対照的に、有意な抗腫瘍活性がｈｕＭＮ－ＭＩＡＰａＣａ２モデルに対して３ｅｅ９／ＭＭＡＥに見られ、ここで、投与の最後に、２．５、５および１０ｍｇ／ｋｇの用量はそれぞれ６３、８２および９４％のＴＧＩをもたらした。さらに、１０ｍｇ／ｋｇの用量は１００％の

応答を誘導し、腫瘍においてＭＮレベルを過剰発現することにより感受性の大きな変化があることを示した。

【実施例１８】

【０２２４】

Ｃｏｌｏ－２０５異種移植片モデルにおけるゼローダ(R)との組み合わせ

他の癌化学療法剤と併せて３ｅｅ９／ＭＭＡＥを使用することの実現可能性を調べた。ゼローダ(R)は、転移性結腸直腸癌を有する患者の一次治療として用いられる。３ｅｅ９／ＭＭＡＥおよびゼローダ(R)を使用する併用療法の活性および耐容性を評価した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、Ｑ４Ｄｘ３スケジュールでそして１．２５、２．５および１０ｍｇ／ｋｇの用量レベルでｉ．ｖ．投与した。ゼローダ(R)は、２５０および５００ｍｇ／ｋｇの用量レベルで毎日１回９日間経口投与した。２．５および１０ｍｇ／ｋｇで単独で投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、強い腫瘍増殖阻害をもたらした（それぞれ、７３および９６％のＴＧＩ）（図２６ａ）。しかしながら、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの１．２５ｍｇ／ｋｇ群は比較的効果がなく、３１％のＴＧＩのみをもたらした。２５０および５００ｍｇ／ｋｇの用量レベルで単独で投与したゼローダ(R)もまた、それぞれ、７８および８６％の強いＴＧＩをもたらした。

【０２２５】

応答に関して、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの１０ｍｇ／ｋｇ群は８０％の応答率を誘導し、一方、ゼローダの両方の用量群における０％の動物が任意の退縮を示した。全ての組み合わせ処置群は良好な耐容性を示し、そして腫瘍増殖の有意な阻害ならびに応答率をもたらした。これら２つの薬剤を組み合わせることによるＴＧＩおよび腫瘍応答を詳述する定量的データを図２６ａおよび２６ｂ、ならびに以下の表３に示す。調べた用量において、ゼローダ(R)と組み合わせた３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍活性は、単一の薬剤として投与した３ｅｅ９／ＭＭＡＥもしくはゼローダ(R)のいずれかのものよりはるかに優れていた。最後に、耐容性に関して、これらの治療薬の投与は不都合な反応なしに良好な耐容性を示した。

【０２２６】

【表３】

表3

ゼローダ®と組み合わせたBAY 79－4620(3ee9－IC)の抗腫瘍活性

処置	スケジュール	用量 mg／kg ／注射	%阻害 (T／C) (17日)	%体重減少(17日)	%退縮
未処置	–	–	–	0.3	0
79-4620(3ee9cj)	Q4DX3;IV	1.25	30.6	0.5	0
79-4620(3ee9cj)	Q4DX3;IV	2.5	73	0.1	0
79-4620(3ee9cj)	Q4DX3;IV	10	96.2	0.9	80
ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q1DX9;PO	250	78	-0.5	0
ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q1DX9;PO	500	86.1	-5.6	0
ｾﾞﾛｰﾀﾞ(250mg/kg)					
79-4620 (3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	1.25	92.1	-2	50
79-4620(3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	2.5	91.4	-0.9	60
79-4620(3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	10	97.5	-0.4	100
ｾﾞﾛｰﾀﾞ(500mg/kg)					
79-4620(3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	1.25	94.2	-0.3	70
79-4620(3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	2.5	95.7	-3.2	90
79-4620(3ee9cj)+ ｾﾞﾛｰﾀﾞ	Q4DX3;IV/Q1 DX9;PO	10	97.3	-1.4	100

【実施例１９】

【０２２７】

両側に移植したヒト異種移植片癌モデルに対する３ｅｅ９　ｍＡｂのインビボ分布／腫瘍

局在性　３ｅｅ９／ＭＭＡＥのｍＡｂ成分のインビボ分布および腫瘍局在性を決定するために、高および低ＭＮ発現の両方を示す腫瘍の両側移植を受けたマウスにおいてＣＲＩ　Ｍａｅｓｔｒｏ™を用いて非浸襲性インビボ画像化研究を行った。マルチスペクトル収集および分析を有するＭａｅｓｔｒｏ™インビボ画像化システム（ＣＲＩ，Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）を自己蛍光バックグラウンドを除くように設計する。Ｍａｂ　ＢＡＹ　７９－４６２０の３ｅｅ９、Ｍ７５（ＭＮを認識するマウスモノクローナル）およびコントロールヒトＩｇＧをＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７５０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃａｔ＃Ａ２００１１）と製造業者の説明書に従って連結した。タンパク質／ＡＦ７５０（ｍｏｌ／ｍｏｌ）の比率は、３ｅｅ９については１／５．９、ヒトＩｇＧについては８．９、そしてＭ７５については６．０であった。

【０２２８】

各蛍光標識抗体の注射の１２日前に、Ｈａｒｌａｎ　Ｂａｌｂ／ＣヌードにＭＩＡＰａＣａ－２（低ＭＮ発現；５０％のマトリゲル中７．５ｘ１０^{6}細胞）を右横腹に皮下に、そしてｈｕＭＮ－ＭＩＡＰａＣａ２（ＭＮでトランスフェクションした安定な細胞系；５０％のマトリゲル中５ｘ１０^{6}細胞）を左横腹に皮下に移植した。４μｇの連結抗体を各動物に０日（移植後１２日）に注射した。４日、５日および１０日に画像化を行った。麻酔し（１００ｍｇ／ｋｇのケタミン／１０ｍｇ／ｋｇのキシラジン、ｉ．ｐ．）そして画像化システム内部に置いた動物を用いてデータを集めた。マルチスペクトル画像キューブ（一連の画像）は、近赤外（ＮＩＲ）範囲を含む、６８０～９５０ｎｍのスペクトル範囲の全体にわたって１０ｎｍごとの間隔の画像で得られた。

【０２２９】

各画像は、５秒間感光させた。Ｍａｅｓｔｒｏソフトウェアを用いてスペクトルキューブからフォールスカラー画像を合成し、そしてＩｍａｇｅＰｒｏ　Ｐｌｕｓ　６．０を用いて可視の明るさにスケーリングした。スケーリングは全ての画像に対して同一であり、最も明るい画像は飽和レベルをわずかに下まわった。大部分の蛍光標識抗体は、肝臓および膀胱に局在する傾向がある。４～５日後に、シグナルの大部分は次に肝臓および膀胱から減少し、そして腫瘍において安定する。５日に撮った画像は、最も高いシグナル：バックグラウンド比をもたらした（図２７）。５日後に、ｈＩｇＧを注射した動物から生成されるシグナルはほとんどなく、ｈＩｇＧが腫瘍組織に局在することができなかったことを示す。対照的に、Ｍ７５および３ｅｅ９は両方とも高ＭＮ発現（ｈＭＮ－ＭＩＡＰａＣａ２）腫瘍に特異的に局在した。同じ動物における低ＭＮ発現ＭＩＡＰａＣａ２腫瘍では局在性は見られなかった。

【実施例２０】

【０２３０】

インビボ作用機序

３ｅｅ９／ＭＭＡＥのインビボ作用機序を研究するために腫瘍を５ｘ１０^{6}のＨＴ－２９細胞でマウスの右横腹で皮下に移植した。８日後に、ＨＴ－２９腫瘍を保有する無胸腺マウスを賦形剤でもしくは１．２５および５ｍｇ／ｋｇ（Ｑ１Ｄｘ１）で３ｅｅ９／ＭＭＡＥで処置した。３ｅｅ９／ＭＭＡＥの投与後４時間そして１、３および５日で腫瘍を集め、そしてホルマリンにおいて固定した。次に、サンプルをパラフィンに包埋し、５μｍで切片にし、脱パラフィンし、そしてマウス抗体：抗α／β－チューブリン、抗ホスホ－ヒストンＨ３およびＤＮＡを用いてヒト組織の蛍光免疫組織化学の標準的なプロトコルを使用して染色した。次に、スライドを蛍光顕微鏡下で観察し、そして代表的な画像を３つの別個のカラーチャンネルを通して撮った。

【０２３１】

３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、４ｈｒサンプルでは細胞機序に影響を与えることにおいてほとんど効果がなかった。しかしながら、１日までに、増加した数の細胞がＧ２／Ｍ停止にあり、そして多極紡錘体が明らかに見られた。さらに、減少したレベルのチューブリン染色を観察することができた。次に、これらの効果は３日および５日のサンプルにおいて非常に増幅された。実際に、５日に３ｅｅ９／ＭＭＡＥの５ｍｇ／ｋｇ用量群におけるほとん

ど全ての細胞は、処置により非常に影響を受けた（図２８）。これらのデータは、３ｅｅ９／ＭＭＡＥがチューブリン阻害により癌細胞の増殖に影響を及ぼし、Ｇ２／Ｍ停止およびアポトーシスをもたらしたことを明らかに示す。

【０２３２】

以下の表４は、３ｅｅ９／ＭＭＡＥの挙動プロフィールを要約する。

【０２３３】

【表４】

表4

3ee9／MMAEプロフィール

アッセイ	3ee9／MMAEの結果
親和性(Kd)	3．6nM
細胞結合(FACS):MN＋／MN－	＋＋＋／－
内在化:MN＋／MN－	＋＋＋／－
細胞毒性:MN＋／MN－(ec50)	50nM／＞1μM
免疫沈降	特異的
IHC	特異的
インビボ分布	正規
インビボ活性:MED	1mg／kg
インビボ活性:MTD	60mg／kg

【実施例２１】

【０２３４】

安定なＣＨＯ細胞発現系を用いる３ｅｅ９軽および重ＣＤＲ可変領域に基づく抗ＭＮ　ＩｇＧの発現ベクター構築、トランスフェクション、発現および精製

発現ベクター３ｅｅ９$_{Ｈ＋Ｌ}$ｐＣＭＶ$_{ＵＣＯＥ}$８の構築

ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９（実施例１～３に従って得られる）からのカッパおよび重ＣＤＲ可変領域（それぞれ、配列番号：１２６および１２５）を以下のようにベクターＨ＋ＬｐａｔｔＢ（ＭＬ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に挿入した。３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９からの約３５０塩基対のＥｃｏＲＶ－ＢｓｉＷＩ制限酵素フラグメント（前述の実施例、例えば実施例１～３に従って調製する）をＨ＋ＬｐａｔｔＢのＥｃｏＲＶ－ＢｓｉＷＩ制限酵素部位に挿入してベクター３ｅｅ９ｋａｐｐａｐＡｔｔＢを生成せしめた。次に、３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９からの約３５０塩基対のＭｆｅＩ－ＢｌｐＩ制限酵素フラグメントを３ｅｅ９ｋａｐｐａｐＡｔｔＢのＥｃｏＲＩ－ＢｌｐＩ制限酵素部位に挿入して３ｅｅ９Ｈ＋ＬｐａｔｔＢを生成せしめた。次に、Ｇａｔｅｗａｙ　ＢＰクロナーゼＩＩ酵素ミックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃａｔ．＃１１７８９－１００）を用いて３ｅｅ９重および軽コーディング配列（それぞれ、配列番号：１２６および１２５）をｐＤＯＮＲ２２１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃａｔ．＃１２５３６－０１７）と組換えてベクター３ｅｅ９Ｈ＋ＬｐＥＮＴＲを生成せしめた。ベクター３ｅｅ９$_{Ｈ＋Ｌ}$ｐＣＭＶ$_{ＵＣＯＥ}$８は、Ｇａｔｅｗａｙ　ＬＲクロナーゼＩＩ酵素ミックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃａｔ．＃１１７９１－１００）を用いて３ｅｅ９Ｈ＋ＬｐＥＮＴＲとｐＣＭＶ＿ＵＣＯＥ８＿ＤＥＳＴとの間の組換えにより生成された。

【０２３５】

ｐＣＭＶ＿ＵＣＯＥ８＿ＤＥＳＴの構築は、下記のとおりであった。Ｇａｔｅｗａｙベクター転化カセット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；ｃａｔ＃１１８２８－０２９）をｐＣＥＴ９０６のＳｍａＩ部位に挿入してベクターｐＣＥＴ９０６＿ｇｗを生成せしめた。ベクタ

ーｐＣＥＴ９０６はＭＬ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手し、そして引用することにより本明細書に組み込まれる、Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ．ａｌ．，ＢＭＣ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（２００５），５：１７に完全に記述された。次に、ｐＣＥＴ９０６＿ｇｗからの約２９００塩基対のＡｇｅＩ制限酵素フラグメントをｐＣＥＴ１０１５のＡｇｅＩ部位にクローン化してｐＣＭＶ＿ＵＣＯＥ８＿ＤＥＳＴを生成せしめた。ベクターｐＣＥＴ１０１５もまたＭＬ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手し、そしてそれはＷｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．，上記に記述される。ベクターｐＣＭＶ＿ＵＣＯＥ８＿ＤＥＳＴは、ｃｃｄＢ毒素遺伝子に耐性であるエシェリキア・コリ株（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（ｃａｔ＃：Ｃ７５１０－０３）から「Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ ｃｃｄＢ Ｓｕｒｖｉｖａｌ Ｔ１細胞」として販売されるもののような）において増やした。３ｅｅ９$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８のインサートの完全なヌクレオチド配列、すなわち、ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９から得られる、それぞれ、配列番号：１２６および１２５のカッパおよび重ＣＤＲ可変領域を含んでなるヒトＩｇＧ抗ＭＮ抗体をコードする完全なヌクレオチド配列を図２９に示す。

【０２３６】

細胞クローン３ｅｅ９．２５の単離

ＣＨＯ－Ｓ細胞をベクター３ｅｅ９$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８でトランスフェクションするために、８ｍＭのＬ－グルタミンおよびＨＴ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で完全にしそしてＰｅｎＳｔｒｅｐを欠く２ｍＬのＣＤ ＣＨＯ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ＃１０７４３－０２９）に６０μｇのＤＮＡを希釈した。次に、２ｍｌのＣＤ ＣＨＯ完全培地を２５０ｍｌのエルレンマイヤーフラスコに加えた。次に、１５０μＬのＤＭＲＩＥ－Ｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ｃａｔ＃１０４５９－０１４）をフラスコに加え、そしてＲＴで１０分間インキュベーションした。次に、希釈したＤＮＡを希釈したＤＭＲＩＥ－Ｃと混合し、５％CO_2でフラッシュし、そしてＲＴで３０分間インキュベーションした。インキュベーション中に、５ｘ１０^{6}ｃ／ｍＬで４ｍｌのＣＨＯ－Ｓ細胞（２ｘ１０^{7}の総細胞）をＣＤ ＣＨＯ完全（Ｐ／Ｓなし）において調製した。インキュベーション後に、細胞をＤＮＡ－ＤＭＲＩＥ－Ｃ複合体を有するフラスコに加え、そして次に穏やかに回転させて混合した。次に、フラスコを５％CO_2でフラッシュし、そして１２５ｒｐｍで３７℃で４ｈｒ振盪した。次に、Ｐｅｎ Ｓｔｒｅｐを有さない３２ｍｌのＣＤ ＣＨＯ完全培地をフラスコに加え、５％CO_2でフラッシュし、そして次にシェーカー（３７℃）に一晩戻した。２４ｈｒ後に、細胞を計数し、沈降させ、そしてプレーティングに適切な細胞密度で２０％のならし培地および抗生物質（１２．５μｇ／ｍｌのピューロマイシン）を有するＣＤ ＣＨＯ完全と５．５ｍＬ／ＬのＰｅｎＳｔｒｅｐに再懸濁した。細胞を９６ウェルプレートにおいて１００、３００、９００および２７００細胞／ウェルでプレーティングした。次に、プレートを５％CO_2インキュベーターにおいて約３週間インキュベーションした。プレートを乱さないように注意した。

【０２３７】

プレート上のウェルの２０％未満において単一のコロニーを含有するウェルを有するプレートから個々のクローンを広げた。細胞は、ウェル当たり１ｍｌの選択培地で非組織処理２４ウェルプレートに広げた。細胞を約１週間インキュベーションし、その間に５００μＬの新しい培地を必要に応じて加えた。抗体発現を単一希釈で試験して発現しないクローンを除いた。クローンは、１：５希釈（９５ｕＬのＴＢＳ／ｔｗｅｅｎに５ｕＬの上清）を用いて二重反復でＥＬＩＳＡにより試験した。０．１未満のＯＤ（光学密度）を与えるクローンを除いた。陽性クローンを非組織処理６ウェルプレートに広げた。次に、５ｍＬの細胞を４ｘ１０^{4}細胞／ｍＬで接種した。４日のインキュベーション後にタンパク質発現をＥＬＩＳＡにより決定した。クローンは、１：５０、１：１００、１：２００および１：４００の希釈を用いて試験した。クローン３ｅｅ９．２５は、最も高い分泌抗体濃度を示した。３ｅｅ９．２５細胞を２ｘ１０^{5}細胞／ｍＬで接種して１２５ｍＬのエルレンマイヤーシェーカーフラスコに移して細胞を懸濁培養に適応させた。

【０２３８】

抗ＭＮ　ＩｇＧの発現

トランスフェクションしたＣＨＯ－Ｓ細胞をＷａｖｅ　１０リットルバイオリアクター（Ｗａｖｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，３００　Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｓｑｕａｒｅ　Ｄｒｉｖｅ，Ｓｏｍｅｒｓｅｔ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ，０８８７３，ＵＳＡ）に５００，０００細胞／ｍｌで接種した。細胞を５０％ＣＤ－ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１０７４３）、５０％Ｓｉｇｍａ　ＣＨＯ培地ナンバー５（Ｓｉｇｍａ　０３６３）、１％ＦＣＳ、１ｘＨＴサプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１１０６７－０３０）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１５１４０－１２２）、８ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　２５０３０－０８１）および１２．５μｇ／ｍｌピューロマイシン（ＢＤ　６３１３０５）において３７℃で５％CO_2雰囲気下で２５ｒｐｍで振盪するバイオリアクターで７日間培養した。発酵期間の最後に、使用済みの培養培地を遠心分離により集め、そしてＩｇＧ精製の前に無菌濾過した（０．２μＭ）。

【０２３９】

抗ＭＮ　ＩｇＧの精製.

典型的に、Ｐｒｅｐ－Ｓｃａｌｅ　ＴＦＦ－２　３０ｋＤカードリッジ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて１０～２０ＬのＩｇＧ含有細胞培養培地を２～５倍に濃縮した。１Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌバッファー、ｐＨ　７．５を濃縮した培地に５０ｍＭの最終濃度になるように加えた。次に、５．０ＭのＮａＣｌを１５０ｍＭの最終濃度になるように加えた。典型的に、濃縮した培地をＰＢＳ、ｐＨ７．４で平衡化した３０ｍＬのタンパク質セファロースカラム上に載せた。０．１％のＴｗｅｅｎ　２０および１ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳ　ｐＨ７．４でカラムを洗浄した。次に、カラムをＰＢＳで洗浄し、そして１００ｍＭのグリシンバッファーｐＨ３．０で溶出した。収集すると、画分を１Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ　ｐＨ７．８でｐＨ７．５に中和した。精製されたＩｇＧを透析によりＰＢＳに移し、そして濾過（０．２μＭ）により滅菌した。最終精製抗体調製物を１～５ｍｇ／ｍＬの間に調整し、クーマシーブルーで染色したＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルにより決定した場合に≧９５％の純度を示し、その際にタンパク質はＭｒ＝５０ｋＤａの重鎖およびＭｒ　２５ｋＤａの軽鎖に対応する２本のバンドとして移動し、１ＥＵ／ｍｇタンパク質未満の内毒素レベルおよび１０％未満のタンパク質凝集体をＳＥＣ　ＨＰＬＣにより決定した場合に有した。調製物はまた、表面プラズモン共鳴、ＦＡＣＳによるＭＮ発現細胞への結合、および自動画像化（Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓ）により決定されるようなＭＮ発現細胞への内在化によるＭＮ抗原結合の機能性Ｑ．Ｃ．にも供した。２０Ｌの合わせた発酵は、典型的に５０～７５％の全体的回収で１グラムの精製タンパク質をもたらした。ＡＢＩ　Ｐｒｏｃｉｓｅ　４９４　ＨＴシーケンサーを用いる精製された全長３ｅｅ９抗体の最終調製物の２５５ｐｍｏｌのＮ末端シークエンシングは、成熟カッパ軽鎖の３６８ｐｍｏｌの以下の予想配列：ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴ－ＲＡＳＱＤＩＮＮＹＬＳＷＹＱＱＫＰ－をもたらした。これは、ｍＡｂ　３ｅｅ９の成熟Ｖカッパ１軽鎖に対応するＮ末端配列と同じである（配列番号：１４６）。重鎖はエドマンシークエンシングにより検出されず、その配列がブロックされることを示した。

＊＊＊

【０２４０】

このように本発明の好ましい態様を詳細に記述したが、本発明の精神もしくは範囲からそれることなしにその多数の明白なバリエーションが可能であるように上記の段落により定義される本発明は上の記述に記載される特定の詳細に限定されるものではないことが理解されるべきである。

【０２４１】

以下に本発明の主な特徴と態様を列挙する。

【０２４２】

１．　抗原結合部位が少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：

（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５

７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４３】
２．　抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４４】
３．　抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４５】
４．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４６】
５．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。

【０２４７】
６．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４８】
７．　抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２４９】
８．　抗体がＩｇＧである１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５０】
９．　抗体がＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＭ　Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体もしくは多重特異性抗体である１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５１】
１０．　抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５２】
１１．　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５３】
１２．　１．に記載の抗体もしくはその抗体フラグメントおよび１つもしくはそれ以上の製薬学的補助剤を含んでなる組成物。
【０２５４】
１３．　配列同一性が約８５％より大きい１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５５】
１４．　配列同一性が約９０％より大きい１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５６】
１５．　配列同一性が約９５％より大きい１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５７】
１６．　配列同一性が約９９％より大きい１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０２５８】
１７．　細胞毒性薬に連結した特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有

するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
ＭＮタンパク質に対して反応性の組成物。
【０２５９】
１８．　抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる１７．に記載の組成物。
【０２６０】
１９．　抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる１７．に記載の組成物。
【０２６１】
２０．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる１７．に記載の組成物。
【０２６２】
２１．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる１７．に記載の組成物。
【０２６３】
２２．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；

（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる１７．に記載の組成物。

【０２６４】

２３．　細胞毒性薬が：モノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログ、モノメチルアウリスタチン－Ｆもしくはその機能性アナログ、アプリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン－１、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ＳＮ－３８、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロキシウリジン（ＦＵｄＲ）、３’，５’－Ｏ－ジオレオイル－ＦｕｄＲ（ＦＵｄＲ－ｄＯ）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、Ｌ－アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、ＰＳＩ－３４１、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ベルケイド、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、ｒａｐＬＲ１、ＤＮアーゼＩ、ブドウ球菌エンテロトキシン－Ａ、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素、シュードモナス菌内毒素およびその組み合わせよりなる群から選択される１７．に記載の組成物。

【０２６５】

２４．　細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである１７．に記載の組成物。

【０２６６】

２５．　抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する１７．に記載の組成物。

【０２６７】

２６．　抗体がＩｇＧである１７．に記載の組成物。

【０２６８】

２７．　抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭアイソタイプ、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である１７．に記載の組成物。

【０２６９】

２８．　抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される１７．に記載の組成物。

【０２７０】
２９．　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである１７．に記載の組成物。
【０２７１】
３０．　抗癌剤および細胞毒性薬に連結した特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
ＭＮ関連癌を有する患者を処置するための組成物。
【０２７２】
３１．　抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる３０．に記載の組成物。
【０２７３】
３２．　抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる３０．に記載の組成物。
【０２７４】
３３．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる３０．に記載の組成物。
【０２７５】
３４．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；

（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる３０．に記載の組成物。
【０２７６】
３５．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる３０．に記載の組成物。
【０２７７】
３６．　抗癌剤がブレオマイシン、ドセタキセル（タキソテール）、ドキソルビシン、エダトレキセート、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド、フィナステリド（プロスカー）、フルタミド（ユーレキシン）、ゲムシタビン、（ジェムザール）、ゲフィチニブ（ｇｅｎｉｔｉｎｉｂ）（イレッサ）、酢酸ゴセレリン（ゾラデックス）、グラニセトロン（カイトリル）、イマチニブ（グリーベック）、イリノテカン（カンプト／カンプトサル）、オンダンセトロン（ゾフラン）、パクリタキセル（タキソール）、ペグアスパラガーゼ（ｐｅｇａｓｐａｒａｇａｓｅ）（オンキャスパー）、塩酸ピロカルピン（サラジェン）、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン）、インターロイキン－２（プロロイキン）、リツキシマブ（リツキサン）、トポテカン（ハイカムチン）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トリアピン、ビンクリスチン、酒石酸ビノレルビン（ナベルビン）および治療抗体もしくはそのフラグメントよりなる群から選択される３０．に記載の組成物。
【０２７８】
３７．　抗癌剤がアンジオスタチン、ベバシズマブ（アバスチン(R)）、ソラフェニブ（ネクサバール(R)）、バキュロスタチン（ｂａｃｕｌｏｓｔａｔｉｎ）、カンスタチン、マスピン、抗ＶＥＧＦ抗体もしくはペプチド、抗胎盤成長因子抗体もしくはペプチド、抗Ｆｌｋ－１抗体、抗Ｆｌｔ－１抗体もしくはペプチド、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン１２、ＩＰ－１０、Ｇｒｏ－β、トロンボスポンジン、２－メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、ＣＭ１０１、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンジオポエチン２、インターフェロン－アルファ、ハービマイシンＡ、ＰＮＵ１４５１５６Ｅ、１６Ｋプロラクチンフラグメント、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、ＴＮＰ－４７０、エンドスタチン、パクリタキセル、アククチン（ａｃｃｕｔｉｎ）、シドフォビル、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ＡＧＭ－１４７０、血小板第４因子およびミノサイクリンよりなる群から選択される抗血管新生剤である３０．に記載の組成物。
【０２７９】
３８．　抗癌剤がタモキシフェン、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡよりなる群から選択される多剤耐性表現型を阻止するかもしくは抑制する薬剤である３０．に記載の組成物。

【０２８０】
３９．　細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである３０．に記載の組成物。
【０２８１】
４０．　細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである３１．のいずれか一つに記載の組成物。
【０２８２】
４１．　抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する３０．に記載の組成物。
【０２８３】
４２．　抗体がＩｇＧである３０．に記載の組成物。
【０２８４】
４３．　抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭアイソタイプ、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である３０．に記載の組成物。
【０２８５】
４４．　抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される３０．に記載の組成物。
【０２８６】
４５．　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである３０．に記載の組成物。
【０２８７】
４６．　配列同一性が約８５％より大きい３０．に記載の組成物。
【０２８８】
４７．　配列同一性が約９０％より大きい３０．に記載の組成物。
【０２８９】
４８．　配列同一性が約９５％より大きい３０．に記載の組成物。
【０２９０】
４９．　配列同一性が約９９％より大きい３０．に記載の組成物。
【０２９１】
５０．　癌が充実性腫瘍の形態である３０．に記載の組成物。
【０２９２】
５１．　充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する５０．に記載の組成物。
【０２９３】
５２．　疑わしい罹患組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルを対応する健常組織もしくは細胞におけるＭＮのレベルと比較することを含んでなり、ここで、疑わしい罹患組織もしくは細胞における異常なＭＮレベルはＭＮ関連疾患の指標であり、該比較する段階は１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメントで罹患組織および健常組織におけるＭＮのレベルを検出することをさらに含んでなる、異常なＭＮレベルを特徴とするＭＮ関連疾患を診断する方法。
【０２９４】
５３．　ＭＮ関連疾患が癌である５２．に記載の方法。
【０２９５】
５４．　癌が充実性腫瘍の形態である５２．に記載の方法。
【０２９６】
５５．　充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する５２．に記載の方法。

【０２９７】
５６．　比較する段階が
　ａ）健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；
　ｂ）疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質のレベルを検出する段階；および
　（ｃ）（ａ）および（ｂ）からのＭＮタンパク質のレベルを比較する段階
をさらに含んでなり、ここで、健常組織におけるＭＮタンパク質のレベルと比較した場合に疑わしい罹患組織におけるＭＮタンパク質の上昇したレベルはＭＮ関連疾患の存在を示す５２．に記載の方法。
【０２９８】
５７．　検出する段階が核画像化モダリティ（ｎｕｃｌｅａｒ　ｉｍａｇｉｎｇ　ｍｏｄａｌｉｔｙ）により成し遂げられる５２．に記載の方法。
【０２９９】
５８．　核画像化モダリティがＳＰＥＣＴもしくはＰＥＴである５７．に記載の方法。
【０３００】
５９．　１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメントおよびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【０３０１】
６０．　１７．に記載の組成物およびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【０３０２】
６１．　３０．に記載の組成物およびＭＮ関連疾患を処置する方法においてキットを使用するための１組の説明書を含んでなるキット。
【０３０３】
６２．　配列同一性が約８５％より大きい１７．に記載の組成物。
【０３０４】
６３．　配列同一性が約９０％より大きい１７．に記載の組成物。
【０３０５】
６４．　配列同一性が約９５％より大きい１７．に記載の組成物。
【０３０６】
６５．　配列同一性が約９９％より大きい１７．に記載の組成物。
【０３０７】
６６．　特にＭＮタンパク質に対する抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメントの治療的に有効な量を投与することを含んでなり、ここで、抗原結合部位は少なくとも１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３を含み：
　（ａ）該ＣＤＲ１は配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７、１０８および配列番号：５７、５８、５９、６０、６１、６２、７７、８０、８１、８６、８７、８８、８９、９８、９９、１０４、１０７もしくは１０８のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；
　（ｂ）該ＣＤＲ２は配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９、１１０および配列番号：６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７８、８２、８３、９０、９１、９２、９３、１００、１０１、１０５、１０９もしくは１１０のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択され；そして
　（ｃ）該ＣＤＲ３は配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１、１１２および配列番号：７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７９、８４、８５、９４、９５、９６、９７、１０２、１０３、１０６、１１１もしくは１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される、
患者におけるＭＮの異常なレベルを特徴とするＭＮ関連疾患を処置する方法。

【０３０８】
６７．　抗原結合部位が配列番号：５７～８５および配列番号：５７～８５のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される重鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる６６．に記載の方法。
【０３０９】
６８．　抗原結合部位が配列番号：８６～１１２および配列番号：８６～１１２のいずれかに約８０％より大きい配列同一性を有するアミノ酸配列よりなる群から選択される軽鎖可変領域ＣＤＲを含んでなる６６．に記載の方法。
【０３１０】
６９．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３、７０、８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４、７１、１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５、７２、１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６、７３、１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７、７４、８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８、７５、８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９、７６、９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８、７９、８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２、８４、９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３、８５、１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組のＣＤＲ配列を含んでなる６６．に記載の方法。
【０３１１】
７０．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：５７、６３および７０；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：５８、６４および７１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：５９、６５および７２；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：６０、６６および７３；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：６１、６７および７４；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：６１、６８および７５；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：６２、６９および７６；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：７７、７８および７９；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：８０、８２および８４；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：８１、８３および８５
よりなる群から選択される１組の重鎖ＣＤＲ配列を含んでなる６６．に記載の方法。
【０３１２】
７１．　抗原結合部位が：
（ａ）［３ｅｅ９］配列番号：８９、９３および９７；
（ｂ）［３ｅｆ２］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｃ）［１ｅ４］配列番号：１０７、１０９および１１１；
（ｄ）［３ａ４］配列番号：１０８、１１０および１１２；
（ｅ）［３ａｂ４］配列番号：８７、９１および９５；
（ｆ）［３ａｈ１０］配列番号：８８、９２および９６；
（ｇ）［３ｂｂ２］配列番号：９８、１００および１０２；
（ｈ）［１ａａ１］配列番号：８６、９０および９４；
（ｉ）［５ａ６］配列番号：９９、１０１および１０３；ならびに
（ｊ）［５ａａ３］配列番号：１０４、１０５および１０６
よりなる群から選択される１組の軽鎖ＣＤＲ配列を含んでなる６６．に記載の方法。
【０３１３】
７２．　抗体もしくは抗体フラグメントが約０．１５ｎＭ～約５０ｎＭの解離定数でＭＮタンパク質に結合する６６．に記載の方法。

【０３１４】
７３．　抗体がＩｇＧである６６．に記載の方法。
【０３１５】
７４．　抗体もしくは抗体フラグメントがＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡもしくはＩｇＭ、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ジアボディ、線状抗体、一本鎖抗体、生体特異性抗体、キメラ抗体または多重特異性抗体である６６．に記載の方法。
【０３１６】
７５．　抗体もしくは抗体フラグメントがヒト化される６６．に記載の方法。
【０３１７】
７６．　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が非ヒトである６６．に記載の方法。
【０３１８】
７７．　配列同一性が約８５％より大きい６６．に記載の方法。
【０３１９】
７８．　配列同一性が約９０％より大きい６６．に記載の方法。
【０３２０】
７９．　配列同一性が約９５％より大きい６６．に記載の方法。
【０３２１】
８０．　配列同一性が約９９％より大きい６６．に記載の方法。
【０３２２】
８１．　抗体もしくは抗体フラグメントが細胞毒性薬に連結される６６．の方法。
【０３２３】
８２．　細胞毒性薬が：モノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログ、モノメチルアウリスタチン－Ｆもしくはその機能性アナログ、アプリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン－１、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ＳＮ－３８、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロキシウリジン（ＦＵｄＲ）、３’，５’－Ｏ－ジオレオイル－ＦｕｄＲ（ＦＵｄＲ－ｄＯ）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、Ｌ－アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、ＰＳＩ－３４１、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ベルケイド、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、ｒａｐＬＲ１、ＤＮアーゼＩ、ブドウ球菌エンテロトキシン－Ａ、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素、シュードモナス菌内毒素およびその組み合わせよりなる群から選択される８１．に記載の方法。
【０３２４】
８３．　細胞毒性薬がモノメチルアウリスタチン－Ｅもしくはその機能性アナログである８２．に記載の方法。

【０３２５】
８４．　抗癌剤を共投与することをさらに含んでなる６６．に記載の方法。
【０３２６】
８５．　抗癌剤がブレオマイシン、ドセタキセル（タキソテール）、ドキソルビシン、エダトレキセート、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド、フィナステリド（プロスカー）、フルタミド（ユーレキシン）、ゲムシタビン（ジェムザール）、ゲフィチニブ（イレッサ）、酢酸ゴセレリン（ゾラデックス）、グラニセトロン（カイトリル）、イマチニブ（グリーベック）、イリノテカン（カンプト／カンプトサル）、オンダンセトロン（ゾフラン）、パクリタキセル（タキソール）、ペグアスパラガーゼ（オンキャスパー）、塩酸ピロカルピン（サラジェン）、ポルフィマーナトリウム（フォトフリン）、インターロイキン－２（プロロイキン）、リツキシマブ（リツキサン）、トポテカン（ハイカムチン）、トラスツズマブ（ハーセプチン）、トリアピン、ビンクリスチン、酒石酸ビノレルビン（ナベルビン）および治療抗体もしくはそのフラグメントよりなる群から選択される８４．に記載の方法。
【０３２７】
８６．　抗癌剤がタモキシフェン、ベラパミルおよびサイクロスポリンＡよりなる群から選択される多剤耐性表現型を阻止するかもしくは抑制する薬剤である８４．に記載の方法。
【０３２８】
８７．　ＭＮ関連疾患が癌である６６．に記載の方法。
【０３２９】
８８．　癌が充実性腫瘍癌である８７．に記載の方法。
【０３３０】
８９．　充実性腫瘍が乳房、気管、肺、脳、生殖器官、消化管、結腸、尿路、腎臓、食道、頸部、目、肝臓、皮膚、頭、首、甲状腺および副甲状腺にあるかもしくは由来する８８．に記載の方法。
【０３３１】
９０．　抗原結合部位が：
（ａ）配列番号：１３３の重鎖可変領域および配列番号：１３４の軽鎖可変領域；
（ｂ）配列番号：１３５の重鎖可変領域および配列番号：１３６の軽鎖可変領域；
（ｃ）配列番号：１３７の重鎖可変領域および配列番号：１３８の軽鎖可変領域；
（ｄ）配列番号：１３９の重鎖可変領域および配列番号：１４０の軽鎖可変領域；
（ｅ）配列番号：１４１の重鎖可変領域および配列番号：１４２の軽鎖可変領域；
（ｆ）配列番号：１４３の重鎖可変領域および配列番号：１４４の軽鎖可変領域；
（ｇ）配列番号：１４５の重鎖可変領域および配列番号：１４６の軽鎖可変領域；
（ｈ）配列番号：１４７の重鎖可変領域および配列番号：１４８の軽鎖可変領域；
（ｉ）配列番号：１４９の重鎖可変領域および配列番号：１５０の軽鎖可変領域；ならびに
（ｊ）配列番号：１５１の重鎖可変領域および配列番号：１５２の軽鎖可変領域
よりなる群から選択される１対の重鎖可変および軽鎖可変領域を含有する１．に記載の抗体もしくは抗体フラグメント。
【０３３２】
９１．　配列番号：１５３のヌクレオチド配列によりコードされる抗ＭＮ　ＩｇＧ抗体。
【図面の簡単な説明】
【０３３３】
【図１ａ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のＤＮＡ配列を示す。
【図１ｂ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のＤＮＡ配列を示す。
【図１ｃ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のＤＮＡ配列を示す。
【図１ｄ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のＤＮＡ配列を示す。
【図２ａ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のタンパク質配列を示す。

【図２ｂ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のタンパク質配列を示す。
【図２ｃ】抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）のタンパク質配列を示す。
【図３ａ】特定の抗体軽および重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図３ｂ】特定の抗体軽および重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図３ｃ】特定の抗体軽および重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図３ｄ】特定の抗体軽および重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図３ｅ】特定の抗体軽および重鎖可変領域のＤＮＡ配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図４ａ】特定の抗体軽（ＶＬ）および重（ＶＨ）鎖可変領域のタンパク質配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図４ｂ】特定の抗体軽（ＶＬ）および重（ＶＨ）鎖可変領域のタンパク質配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図４ｃ】特定の抗体軽（ＶＬ）および重（ＶＨ）鎖可変領域のタンパク質配列を示し、その各々はＣＤＲおよびフレームワーク領域の両方を含有する。
【図５】本発明のＭＮ抗体のＭＮ結合特性を示す。
【図６】抗ＭＮ抗体とのインキュベーションによりもたらされるＭＮ被覆プレートへの腫瘍細胞接着の阻止を示す。
【図７】抗ＭＮモノクローナル抗体１ｅ４を含んでなる免疫コンジュゲートでの処置に起因するＭａＴｕ腫瘍を含んでなる異種移植片モデルにおけるインビボ抗腫瘍活性を示す。
【図８】その表面上にＭＮタンパク質を発現するＰＣ３ｍｍ２細胞系への抗ＭＮ抗体の結合のＦＡＣＳ測定を示す。
【図９】抗体コンジュゲート（ＭＭＡＥに連結した抗ＭＮ抗体）を図式的に示す。
【図１０ａ】ＭＮ＋（ＭａＴｕ）細胞に結合するがＭＮ－（ＤＬＤ）細胞に結合しない３ｅｅ９／ＭＭＡＥを表すＦＡＣＳプロットを示す。
【図１０ｂ】ＭＮ＋（ＰＣ３ｍｍ２）細胞に結合するがＭＮ－（ＤＬＤ）細胞に結合しない１Ｅ４免疫コンジュゲートを表すＦＡＣＳプロットを示す。
【図１０ｃ】ＭＮ＋（ＰＣ３ｍｍ２）細胞に結合するがＭＮ－（ＤＬＤ）細胞に結合しない１ａａ１免疫コンジュゲートを表すＦＡＣＳプロットを示す。
【図１１ａ】ＭＮ＋細胞による３ｅｅ９／ＭＭＡＥの内在化およびＭＮ－細胞による内在化の欠如を表す免疫蛍光画像を示す。内在化した３ｅｅ９／ＭＭＡＥは、蛍光として示される。
【図１１ｂ】ＭＮ＋細胞による１Ｅ４免疫コンジュゲートの内在化およびＭＮ－細胞による内在化の欠如を表す免疫蛍光画像を示す。内在化した１Ｅ４免疫コンジュゲートは、蛍光として示される。
【図１２】ＭＮ抗体によるビオチニル化細胞表面タンパク質の特異的免疫沈降を表す免疫ブロットを示す。
【図１３ａ】ＭＮ＋細胞に対する、しかしＭＮ－細胞に対してはそうでない３ｅｅ９／ＭＭＡＥの細胞毒性をグラフで示す。
【図１３ｂ】ＭＮ＋細胞に対する、しかしＭＮ－細胞に対してはそうでない１Ｅ４免疫コンジュゲートの細胞毒性をグラフで示す。
【図１３ｃ】ＭＮ＋細胞に対する、しかしＭＮ－細胞に対してはそうでない１ａａ１免疫コンジュゲートの細胞毒性をグラフで示す。
【図１４】チューブリン阻害による３ｅｅ９／ＭＭＡＥの正常な紡錘体形成の阻止を表す免疫蛍光画像を示す。
【図１５】ＭａＴｕ異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。

【図１６】樹立したＭａＴｕ乳房腫瘍に対する１Ｅ４免疫コンジュゲートの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図１７】ＭａＴｕ異種移植片に対する１ａａ１免疫コンジュゲートの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図１８】ＭａＴｕ異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの治療指数（ＴＩ）をグラフで示す。
【図１９】ＨＴ－２９異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥおよび遊離のＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２０】Ｑ７Ｄｘ２スケジュールの後の、ＨＴ－２９異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２１】Ｑ１Ｄｘ１スケジュールの後の、ＨＴ－２９異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２２】ＰＣ３ｍｍ２異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２３】Ｃｏｌｏ－２０５異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２４】ＨＣＴ－１５異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２５】ＭＮ－（左側のグラフにおける）およびＭＮ＋（右側のグラフにおける）ＭＩＡＰａｃａ２異種移植片に対する３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２６ａ】様々な用量でのＣｏｌｏ－２０５　ＣＲＣ異種移植片に対するゼローダ(R)と組み合わせた３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２６ｂ】様々な用量でのＣｏｌｏ－２０５　ＣＲＣ異種移植片に対するゼローダ(R)と組み合わせた３ｅｅ９／ＭＭＡＥの抗腫瘍効能をグラフで示す。
【図２７】ｈｕＭＮ－ＭＩＡＰａｃａ２およびＭＩＡＰａｃａ２腫瘍における３ｅｅ９のインビボ局在性を表す免疫蛍光画像を示す。
【図２８】２つの用量でのＨＴ－２９　ＣＲＣ異種移植片におけるチューブリン重合の３ｅｅ９／ＭＭＡＥ阻害を表す（組織学的サンプルの）免疫蛍光画像を示す。
【図２９ａ】ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９（実施例１～３を参照）から得られる、それぞれ、配列番号：１２６および１２５のカッパおよび重ＣＤＲ可変領域を含んでなるヒトＩｇＧ抗ＭＮ抗体をコードする哺乳類発現ベクター３ｅｅ$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８（実施例２１を参照）のインサート領域の完全なヌクレオチド配列を示す。配列番号：１５３。
【図２９ｂ】ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９（実施例１～３を参照）から得られる、それぞれ、配列番号：１２６および１２５のカッパおよび重ＣＤＲ可変領域を含んでなるヒトＩｇＧ抗ＭＮ抗体をコードする哺乳類発現ベクター３ｅｅ$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８（実施例２１を参照）のインサート領域の完全なヌクレオチド配列を示す。配列番号：１５３。
【図２９ｃ】ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９（実施例１～３を参照）から得られる、それぞれ、配列番号：１２６および１２５のカッパおよび重ＣＤＲ可変領域を含んでなるヒトＩｇＧ抗ＭＮ抗体をコードする哺乳類発現ベクター３ｅｅ$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８（実施例２１を参照）のインサート領域の完全なヌクレオチド配列を示す。配列番号：１５３。
【図２９ｄ】ベクター３ｅｅ９ｐＭＯＲＰＨｘ９（実施例１～３を参照）から得られる、それぞれ、配列番号：１２６および１２５のカッパおよび重ＣＤＲ可変領域を含んでなるヒトＩｇＧ抗ＭＮ抗体をコードする哺乳類発現ベクター３ｅｅ$_{H+L}$ｐＣＭＶ$_{UCOE}$８（実施例２１を参照）のインサート領域の完全なヌクレオチド配列を示す。配列番号：１５３。

【図１ａ】

配列番号	CDR	DNA 配列	Fab 記号
	VH3-CDR1		
1	1	GGATTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGTCT	3ee9
2	2	GGATTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGCAT	3ef2
3	3	GGATTTACCTTTTCTAATAATGCTATGAAT	1e4
4	4	GGATTTACCTTTTCTGATTATTCTATTAAT	3a4
5	5	GGATTTACCTTTTCTTCTTATGGTATTTCT	3ab4, 3ah10
6	6	GGATTTACCTTTTCTAATTATGGTATTTCT	3bb2
	VH3-CDR2		
7	1	GGTATCTCTTCTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3ee9
8	2	GCTATCTCTTATTCTTCTAGCTCTACCTCTTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3ef2
9	3	GGTATCTCTTATGATTCTAGCAAGACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	1e4
10	4	AATATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3a4
11	5	GGTATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3ab4
12	6	TCTATCTCTTATTCTGGTAGCAATACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3ah10
13	7	GCTATCTCTTATTATGGTAGCAATACCTATTATGCGGA TAGCGTGAAAGGC	3bb2
	VH3-CDR3		
14	1	ACTGGTTCTCCTGGTACTTTTATGCATGGTGATCAT	3ee9
15	2	CTTTCTTATACTGGTTTTGCTGTT	3ef2
16	3	CTTACTTATACTGGTGCTTATCGT	1e4
17	4	TTTAAGTATTCTGGTGGTTCTGATTCT	3a4
18	5	CTTAAGCCTTATCGTCATAAGAATGGTTGGTTTGATTA T	3ab4
19	6	ATGAAGCCTATGCGTGGTTATTCTGGTGCTGTT	3ah10
20	7	CTTAAGGGTGGTTCTGGTTTTGTT	3bb2

図 1a

【図１ｂ】

配列番号	CDR	DNA 配列	Fab 記号
	VH1b-CDR1		
21	1	GGATATACCTTTACTACTAATTATATGCAT	1aa1
	VH1b-CDR2		
22	1	ATTATCAATCCGCATAATGGCTCTACGTCTTACGCGCA GAAGTTTCAGGGC	1aa1
	VH1b-CDR3		
23	1	GGTCGTTATTTTCTTATGGATGTT	1aa1
	VH5-CDR1		
24	1	GGATATTCCTTTTCTAAGTATTGGATTGGT	5a6
25	2	GGATATTCCTTTACTGGTTATATTTCT	5aa3
	VH5-CDR2		
26	1	ATTATCTATCCGACTGATAGCTATACCCGTTATTCTCC GAGCTTTCAGGGC	5a6
27	2	ATTATCTATCCGGGTGATAGCTATACCAATTATTCTCC GAGCTTTCAGGGC	5aa3
	VH5-CDR3		
28	1	ACTCATGGTTATTATAAGAATGGTCGTATGGATGTT	5a6
29	2	TATTCTGGTCCTAATTGGGATGTTATGGATTCT	5aa3
	Vk1-CDR1		
30	1	AGAGCGAGCCAGAATATTCTTTCTTATCTGAAT	1aa1
31	2	AGAGCGAGCCAGAATATTTCTAATTATCTGAAT	3ab4
32	3	AGAGCGAGCCAGGATATTTCTAATCGTCTGGCT	3ah10
33	4	AGAGCGAGCCAGGATATTAATAATTATCTGTCT	3ee9

図 1b

【図１ｃ】

配列番号	CDR	DNA 配列	Fab 記号
	VLk1-CDR2		
34	1	TATGCTGCTTCTTCTTTGCAAAGC	1aa1
35	2	CATAAGGTTTCTAATTTGCAAAGC	3ab4
36	3	TATGATGCTAATTCTTTGCAAAGC	3ah10
37	4	TATGGTGCTTCTAATTTGCAAAGC	3ee9
	VLk1-CDR3		
38	1	CAGCAGTATGGTTCTGTTCCT	1aa1
39	2	CTTCAGTATGATGATTTTCCTCGT	3ab4
40	3	TTTCAGTATTCTGGTCCT	3ah10
41	4	CAGCAGTATTATGGTCGTCCTACT	3ee9
	VLk2-CDR1		
42	1	AGAAGCAGCCAAAGCCTGGTTTATTCTAATGGCAATAC TACTCTGTCT	3bb2
43	2	AGAAGCAGCCAAAGCCTGGTTCATTCTAATGGCTATAA TTATCTGTCT	5a6
	VLk2-CDR2		
44	1	TATGGTGTTTCTAATCGTGCCAGT	3bb2
45	2	TATCTTGGTTCTAATCGTGCCAGT	5a6
	VLk2-CDR3		
46	1	CAGCAGTATAATTCTTTTCCTCGT	3bb2
47	2	CATCAGTATGGTGATTTTTCTGAT	5a6
	VLλ1-CDR1		
48	1	AGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTCTTATTATGTGAA T	5aa3
	VLλ1-CDR2		
49	1	CTTCTGATTTATGCTGATGATAAGCGTCCCTCA	5aa3

図 1c

【図１ｄ】

配列番号	CDR	DNA 配列	Fab 記号
	VLλ1-CDR3		
50	1	CAGTCTTATGATTCTACTAAGGATGATTCT	5aa3
	VLλ3-CDR1		
51	1	AGCGGCGATAATCTTGGTTCTTATTATGTTCAT	1e4, 3ef2
52	2	AGCGGCGATAATCTTCCTGATTTTTATGTTCAT	3a4
	VLλ3-CDR2		
53	1	CTTGTGATTTATGATGATAATAATCGTCCCTCA	1e4, 3ef2
54	2	CTTGTGATTTCTGAGGATAATAAGCGTCCCTCA	3a4
	VLλ3-CDR3		
55	1	CAGTCTTATGATTTTGGTAAGGTT	1e4, 3ef2
56	2	TCTACTTATGGTTATACTTATTCTTATTCT	3a4

図 1d

【図２ａ】

配列番号	CDR	アミノ酸配列	Fab 記号
	VH3-CDR1		
57	1	GFTFSSYGMS	3ee9
58	2	GFTFSSYGMH	3ef2
59	3	GFTFSNNAMN	1e4
60	4	GFTFSDYSIN	3a4
61	5	GFTFSSYGIS	3ab4, 3ah10
62	6	GFTFSNYGIS	3bb2
	VH3-CDR2		
63	1	GISSLGSTTYYADSVKG	3ee9
64	2	AISYSSSSTSYADSVKG	3ef2
65	3	GISYDSSKTYYADSVKG	1e4
66	4	NISYSGSSTYYADSVKG	3a4
67	5	GISYSGSSTYYADSVKG	3ab4
68	6	SISYSGSNTYYADSVKG	3ah10
69	7	AISYYGSNTYYADSVKG	3bb2
	VH3-CDR3		
70	1	TGSPGTFMHGDH	3ee9
71	2	LSYTGFAV	3ef2
72	3	LTYTGAYR	1e4
73	4	FKYSGGSDS	3a4
74	5	LKPYRHKNGWFDY	3ab4
75	6	MKPMRGYSGAV	3ah10
76	7	LKGGSGFV	3bb2
	VH1b-CDR1		
77	1	GYTFTTNYMH	1aa1
	VH1b-CDR2		
78	1	IINPHNGSTSYAQKFQG	1aa1
	VH1b-CDR3		
79	1	GRYFLMDV	1aa1
	VH5-CDR1		
80	1	GYSFSKYWIG	5a6
81	2	GYSFTGYIS	5aa3

図 2a

【図２ｂ】

配列番号	CDR	アミノ酸配列	Fab 記号
	VH5-CDR2		
82	1	IIYPTDSYTRYSPSFQG	5a6
83	2	IIYPGDSYTNYSPSFQG	5aa3
	VH5-CDR3		
84	1	THGYYKNGRMDV	5a6
85	2	YSGPNWDVMDS	5aa3
	VLk1-CDR1		
86	1	RASQNILSYLN	1aa1
87	2	RASQNISNYLN	3ab4
88	3	RASQDISNRLA	3ah10
89	4	RASQDINNYLS	3ee9
	VLk1-CDR2		
90	1	YAASSLQS	1aa1
91	2	HKVSNLQS	3ab4
92	3	YDANSLQS	3ah10
93	4	YGASNLQS	3ee9
	VLk1-CDR3		
94	1	QQYGSVP	1aa1
95	2	LQYDDFPR	3ab4
96	3	FQYSGP	3ah10
97	4	QQYYGRPT	3ee9
	VLk2-CDR1		
98	1	RSSQSLVYSNGNTTLS	3bb2
99	2	RSSQSLVHSNGYNYLS	5a6
	VLk2-CDR2		
100	1	YGVSNRAS	3bb2
101	2	YLGSNRAS	5a6
	VLk2-CDR3		
102	1	QQYNSFPR	3bb2
103	2	HQYGDFSD	5a6

図 2b

【図２ｃ】

配列番号	CDR	アミノ酸配列	Fab 記号
	VLλ1-CDR1		
104	1	SGSSSNIGSYYVN	5aa3
	VLλ1-CDR2		
105	1	LLIYADDKRPS	5aa3
	VLλ1-CDR3		
106	1	QSYDSTKDDS	5aa3
	VLλ3-CDR1		
107	1	SGDNLGSYYVH	1e4, 3ef2
108	2	SGDNLPDFYVH	3a4
	VLλ3-CDR2		
109	1	LVIYDDNNRPS	1e4, 3ef2
110	2	LVISEDNKRPS	3a4
	VLλ3-CDR3		
111	1	QSYDFGKV	1e4, 3ef2
112	2	STYGYTYSYS	3a4

図 2c

【図３ａ】

配列番号	抗体鎖	DNA 配列	Fab 記号
113	VH1b	GAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCG GGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGA TATACCTTTACTACTAATTATATGCATTGGGTCCGCC AAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATTA TCAATCCGCATAATGGCTCTACGTCTTACGCGCAGAA GTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAG CATTAGCACCGCGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCG TAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGG TCGTTATTTTCTTATGGATGTTTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCAGC	1aa1
114	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGAATATTCTTTCTTATCTGAATTGGTACC AGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTA TGCTGCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCG TTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTG ACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTT ATTATTGCCAGCAGTATGGTTCTGTTCCTACCTTTGG CCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG	1aa1
115	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTAATAATGCTATGAATTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTA TCTCTTATGATTCTAGCAAGACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTT ACTTATACTGGTGCTTATCGTTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCAGC	1e4
116	VL3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTT GCACCAGGTCAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATCTTGGTTCTTATTATGTTCATTGGTACCAGC AGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATG ATGATAATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTT TAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGAC CATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTA TTATTGCCAGTCTTATGATTTTGGTAAGGTTGTGTTT GGCGGCGGCACGAAGTTAAC	1e4

図 3a

【図３ｂ】

配列番号	抗体鎖	DNA 配列	Fab 記号
117	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTGATTATTCTATTAATTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTATGTGAGCAATA TCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTT AAGTATTCTGGTGGTTCTGATTCTTGGGGCCAAGGCA CCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3a4
118	VL3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTT GCACCAGGTCAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATCTTCCTGATTTTTATGTTCATTGGTACCAGC AGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTCTG AGGATAATAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCT TTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGA CCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATT ATTATTGCTCTACTTATGGTTATACTTATTCTTATTCT GTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC	3a4
119	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATTTCTTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTA TCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTT AAGCCTTATCGTCATAAGAATGGTTGGTTTGATTATT GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3ab4
120	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGAATATTTCTAATTATCTGAATTGGTACCC AGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTCA TAAGGTTTCTAATTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCGT TTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTA TTATTGCCTTCAGTATGATGATTTTCCTCGTACCTTT GGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG	3ab4

図 3b

【図３ｃ】

配列番号	抗体鎖	DNA 配列	Fab 記号
121	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATTTCTTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCTCTA TCTCTTATTCTGGTAGCAATACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATG AAGCCTATGCGTGGTTATTCTGGTGCTGTTTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3ah10
122	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGGATATTTCTAATCGTCTGGCTTGGTACC AGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTA TGATGCTAATTCTTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCG TTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTG ACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGACTT ATTATTGCTTTCAGTATTCTGGTCCTACCTTTGGCCA GGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG	3ah10
123	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTAATTATGGTATTTCTTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTA TCTCTTATTATGGTAGCAATACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTT AAGGGTGGTTCTGGTTTTGTTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3bb2
124	Vk2	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCCTGCCA GTGACTCCGGGCGAGCCTGCGAGCATTAGCTGCAGA AGCAGCCAAAGCCTGGTTTATTCTAATGGCAATACTA CTCTGTCTTGGTACCTTCAAAAACCAGGTCAAAGCCC GCAGCTATTAATTTATGGTGTTTCTAATCGTGCCAGT GGGGTCCCGGATCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGTGTGGAAGCTG AAGACGTGGGCGTGTATTATTGCCAGCAGTATAATTC TTTTCCTCGTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAA ATTAAACGTACG	3bb2

図 3c

【図３ｄ】

配列番号	抗体鎖	DNA 配列	Fab 記号
125	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGTCTTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTA TCTCTTCTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACT GGTTCTCCTGGTACTTTTATGCATGGTGATCATTGGG GCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3ee9
126	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGGCAGGATATTAATAATTATCTGTCTTGGTACC AGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATTTA TGGTGCTTCTAATTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCG TTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTG ACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTT ATTATTGCCAGCAGTATTATGGTCGTCCTACTACCTT TGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG	3ee9
127	VH5	GAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGA TATTCCTTTTCTAAGTATTGGATTGGTTGGGTGCGCC AGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATTA TCTATCCGACTGATAGCTATACCCGTTATTCTCCGAG CTTTCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAG CATTAGCACCGCGTATCTTCAATGGAGCAGCCTGAA AGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCGCGTAC TCATGGTTATTATAAGAATGGTCGTATGGATGTTTGG GGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	5a6
128	Vk2	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCCTGCCA GTGACTCCGGGCGAGCCTGCGAGCATTAGCTGCAGA AGCAGCCAAAGCCTGGTTCATTCTAATGGCTATAATT ATCTGTCTTGGTACCTTCAAAAACCAGGTCAAAGCCC GCAGCTATTAATTTATCTTGGTTCTAATCGTGCCAGT GGGGTCCCGGATCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC ACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGTGTGGAAGCTG AAGACGTGGGCGTGTATTATTGCCATCAGTATGGTGA TTTTTCTGATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAA ATTAAACGTACG	5a6

図 3d

【図３ｅ】

配列番号	抗体鎖	DNA 配列	Fab 記号
129	VH5	GAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGA TATTCCTTTACTGGTTATATTTCTTGGGTGCGCCAAG CCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATTATCT ATCCGGGTGATAGCTATACCAATTATTCTCCGAGCTT TCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCAT TAGCACCGCGTATCTTCAATGGAGCAGCCTGAAAGC GAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCGCGTTATTCT GGTCCTAATTGGGATGTTATGGATTCTTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	5aa3
130	VL1	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGC GCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCGGC AGCAGCAGCAACATTGGTTCTTATTATGTGAATTGGT ACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACTTCTGA TTTATGCTGATGATAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGG ATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGA GCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAG CGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATTCTACTAAGGA TGATTCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC	5aa3
131	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGCATTGGGTGCGCC AAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTATGTGAGCGCTA TCTCTTATTCTTCTAGCTCTACCTCTTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGT GCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTT TCTTATACTGGTTTTGCTGTTTGGGGCCAAGGCACCC TGGTGACGGTTAGCTCAGC	3ef2
132	VL3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTT GCACCAGGTCAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATCTTGGTTCTTATTATGTTCATTGGTACCAGC AGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATG ATGATAATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTT TAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGAC CATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTA TTATTGCCAGTCTTATGATTTTGGTAAGGTTGTGTTT GGCGGCGGCACGAAGTTAAC	3ef2

図 3e

【図４ａ】

配列番号	抗体鎖	タンパク質配列	Fab 記号
133	VH1b	ELVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTNYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPHNGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRYFLMD VWGQGTLVTVSS	1aa1
134	Vk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNILSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYGSVPTFGQGTKVE IKRT	1aa1
135	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNAMN WVRQAPGKGLEWVSGISYDSSKTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYTGA YRWGQGTLVTVSS	1e4
136	VL3	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSYYVHWY QQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGKVVFGGGTKL TVL	1e4
137	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSINW VRQAPGKGLEYVSNISYSGSSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFKYSGGS DSWGQGTLVTVSS	3a4
138	VL3	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLPDFYVHWY QQKPGQAPVLVISEDNKRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAEDEADYYCSTYGYTYSYSVFGGGTKL	3a4
139	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGISW VRQAPGKGLEWVSGISYSGSSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLKPYRHK NGWFDYWGQGTLVTVSS	3ab4
140	Vk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISNYLNW YQQKPGKAPKLLIHKVSNLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFAVYYCLQYDDFPRTFGQGTKV EIKRT	3ab4
141	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGISW VRQAPGKGLEWVSSISYSGSNTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMKPMRG YSGAVWGQGTLVTVSS	3ah10
142	Vk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNRLAW YQQKPGKAPKLLIYDANSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCFQYSGPTFGQGTKVEI KRT	3ah10

図 4a

【図４ｂ】

配列番号	抗体鎖	タンパク質配列	Fab 記号
143	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGISW VRQAPGKGLEWVSAISYYGSNTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLKGGSGF VWGQGTLVTVSS	3bb2
144	Vk2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGN TTLSWYLQKPGQSPQLLIYGVSNRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYNSFPRTF GQGTKVEIKRT	3bb2
145	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSW VRQAPGKGLEWVSGISSLGSTTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGSPGTF MHGDHWGQGTLVTVSS	3ee9
146	Vk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLSW YQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYYGRPTTFGQGTKV EIKRT	3ee9
147	VH5	ELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSKYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPTDSYTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARTHGYYKNG RMDVWGQGTLVTVSS	5a6
148	Vk2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGY NYLSWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCHQYGDFSDTF GQGTKVEIKRT	5a6
149	VH5	ELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTGYISWVR QAPGKGLEWMGIIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGPNWDVM DSWGQGTLVTVSS	5aa3
150	VL1	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSYYVN WYQQLPGTAPKLLIYADDKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDSTKDDSVFGG GTKL	5aa3
151	VH3	ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEYVSAISYSSSSTSYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLSYTGFA VWGQGTLVTVSS	3ef2

図 4b

【図４ｃ】

配列番号	抗体鎖	タンパク質配列	Fab 記号
152	VL3	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSYYVHWY QQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGKVVFGGGTKL	3ef2

図 4c

【図５】

抗体	使用した抗体の形態	HKB-11 細胞において発現される精製ヒトMNへのELISA結合	Sf9 細胞において発現される精製ヒトMNへのELISA結合	HKB-11 細胞において発現される精製ヒトMNに対する結合親和性 Kd (M)
1aa1	純粋な Fab	陽性	陽性	1.5 x 10-10
1aa1	純粋な IgG1	陽性	ND[1]	4.9 x 10-8
1e4	純粋な Fab	陽性	ND	1.4 x 10-9
1e4	純粋な IgG1	陽性	ND	1.0 x 10-9
3a4		陽性	陽性	
3ab4	純粋な Fab	陽性	陽性	5.0 x 10-8
3ah10	純粋な Fab	陽性	ND	1.6 x 10-8
3bb2	純粋な Fab	陽性	ND	2.7 x 10-8
3ee9	粗 Fab	陽性	陽性	1.6 x 10-8
3ee9	純粋な IgG1	陽性	ND	5.9 x 10-9
5a6	粗 Fab	陽性	陽性	3.4 x 10-9
5aa3	粗 Fab	陽性	陽性	2.5 x 10-8
3ef2	粗 Fab	陽性	陽性	4.1 x 10-9

[1]ND = 決定されない

図 5

【図８】

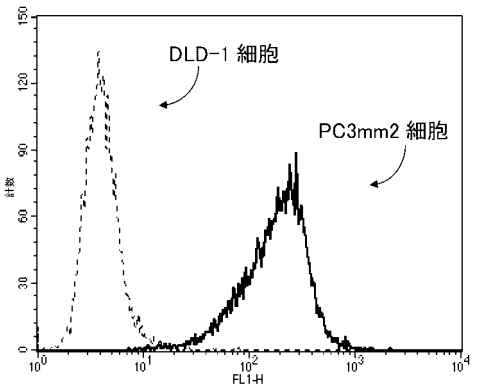


図 8

【図２９ａ】

AATTGGAGGCTACAGTCAGTGGAGAGGACTTTCACTGACTGACTGACTGCGTCTCAACCT
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGTCTAGAGGGCACCATGGTGTTGCAGAC
CCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGATATCCAGATGAC
CCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGAG
CGAGCCAGGATATTAATAATTATCTGTCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGA
AACTATTAATTTATGGTGCTTCTAATTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCT
CTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGG
TTTATTATTGCCAGCAGTATTATGGTCGTCCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTG
AAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
TGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGTCTAAAGC
AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGCGGCCGCGCCTCGACTGTGCCTT
CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG
CCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT
GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGATGCTTATCGCCACGTTCGGC
GCGCCGTCGACGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATT
AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
GACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAA
GTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTC
CAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
GAGGTCTAT

図 29a

【図２９ｂ】

ATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAT
ACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCT
TCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGGAATTGGTGGAAAGC
GGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGAT
TTACCTTTTCTTCTTATGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGT
GGGTGAGCGGTATCTCTTCTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC
GTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGC
GTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTGGTTCTCCTGGTACTTTTATGC
ATGGTGATCATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGT
CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC
ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GAGGATTGGGAAGACAATA

図 29b

【図２９ｃ】

GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCCTC
ACGTGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCCCTACAGAGACGACTGACTGACTGAC
TGGAAAGAGGAAGGGCTGGAAGAGGAAGGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC
GGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC
CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACG
AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA
TACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT
TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
CCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG
TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGG
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC
GCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC
TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC
TATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAAC
TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC
AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTC
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
CATGTTGT

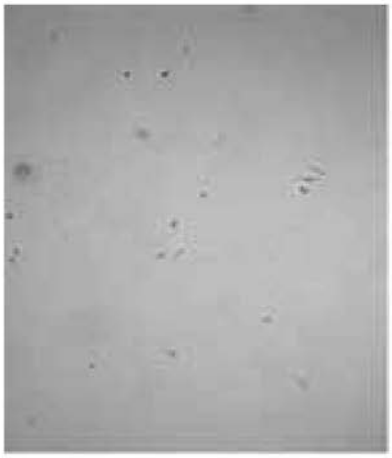
図 29c

【図２９ｄ】

GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAG
TGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAA
GATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCG
CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTT
ACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG
AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC
AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTA
TTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTT
TCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGT
CTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCG
GGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCAT
AAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATT
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGAT
AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAA
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCA
AATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCC
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAA
GCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCAC
CACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTAT
GCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGC
CATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGC
CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTC
CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG [配列番号:153]

図 29d

【図６】



抗-MN Mab 1e4



コントロール IgG



バッファー賦与剤

図 6

【図７】

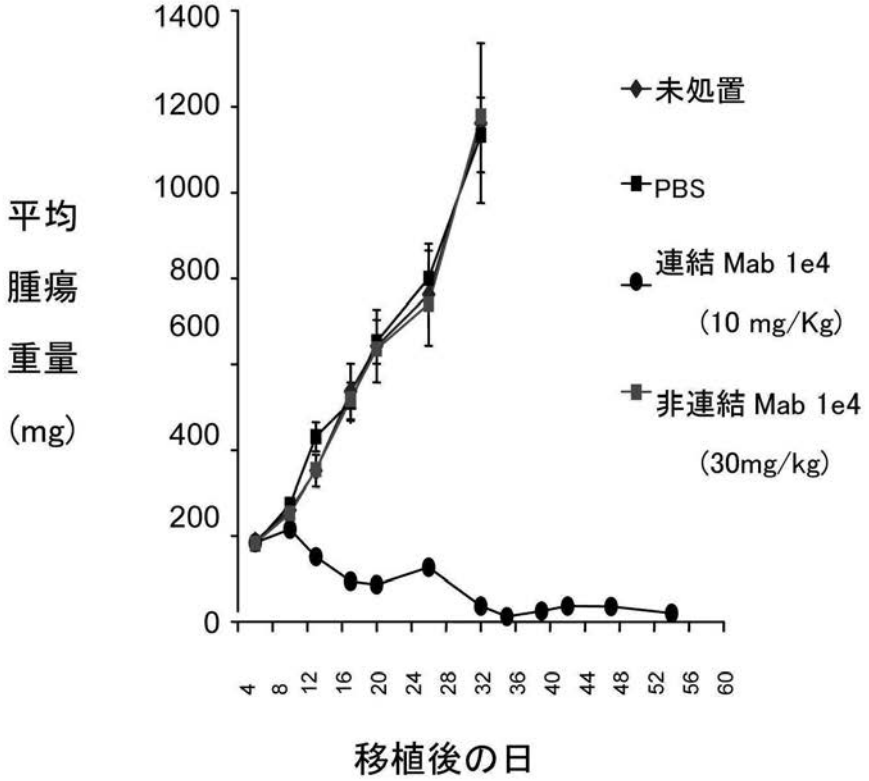

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
未処置
PBS
連結 Mab 1e4
(10 mg/Kg)
非連結 Mab 1e4
(30mg/kg)
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後の日

図 7

【図９】

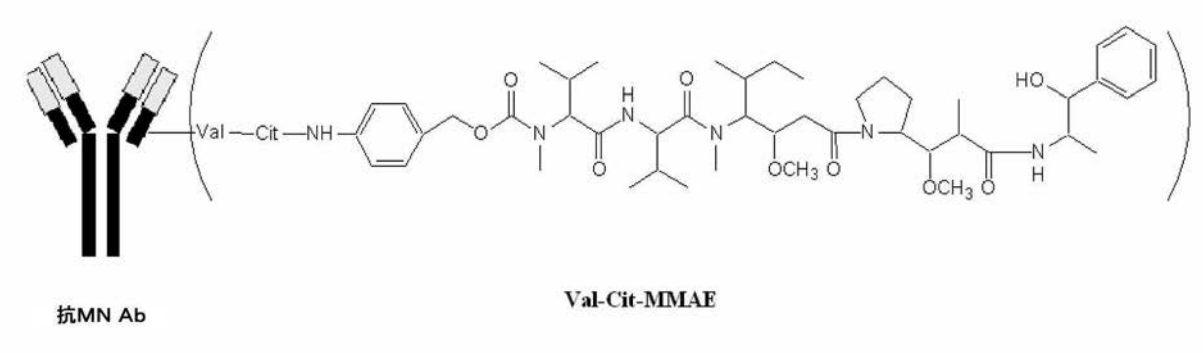

Val
Cit
NH
O
N
H
HO
OCH3
抗MN Ab
Val-Cit-MMAE

図 9

【図１０ａ】

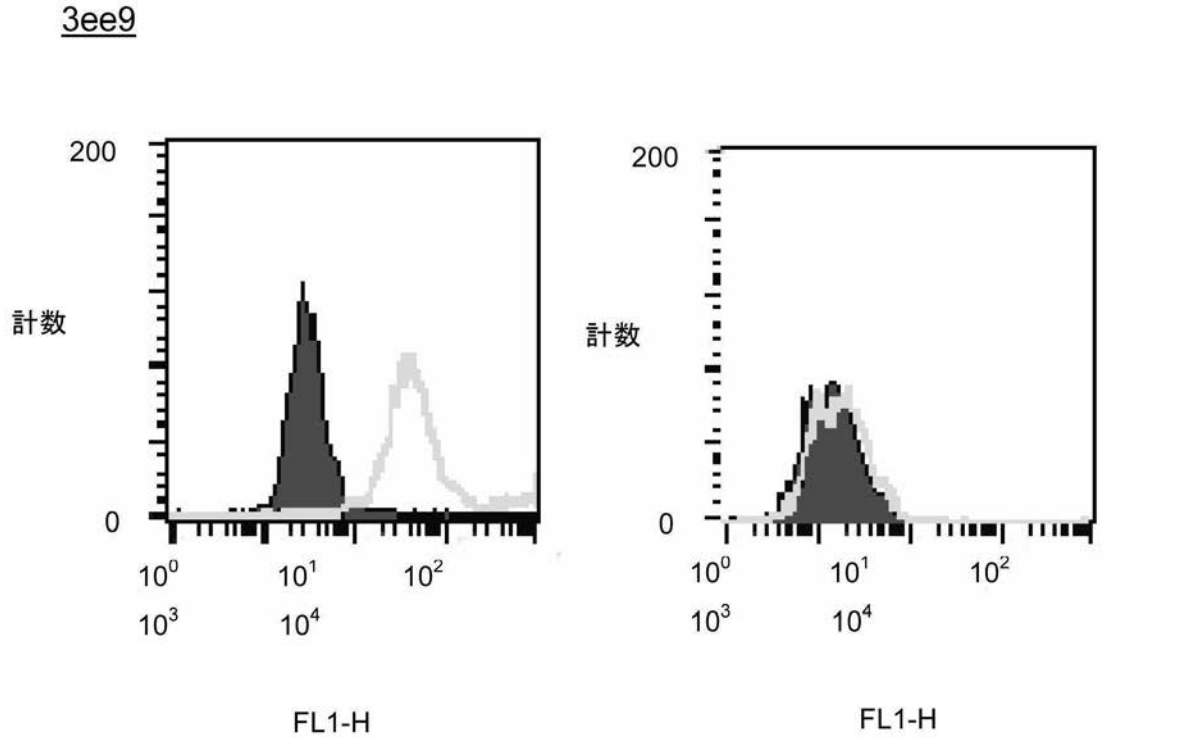


図 10a

【図１０ｂ】

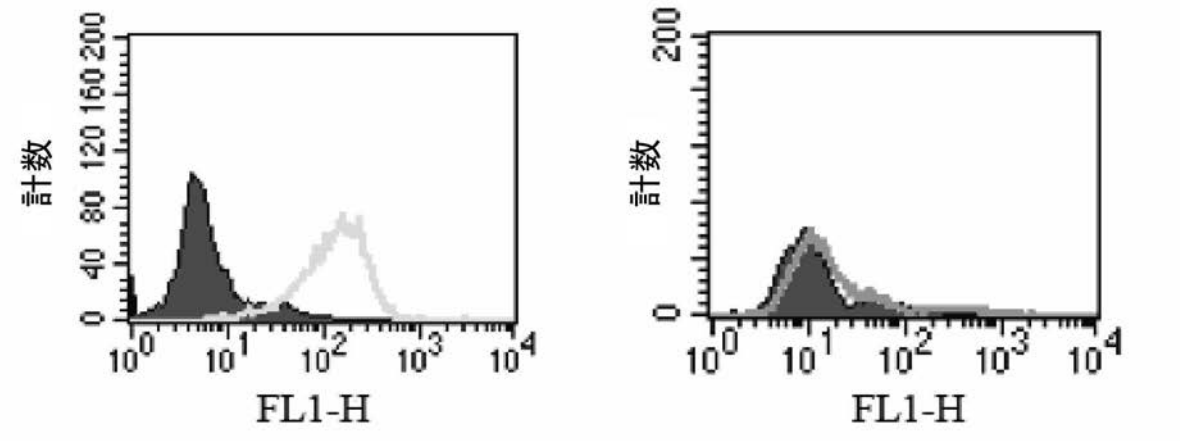


図 10b

【図１０ｃ】

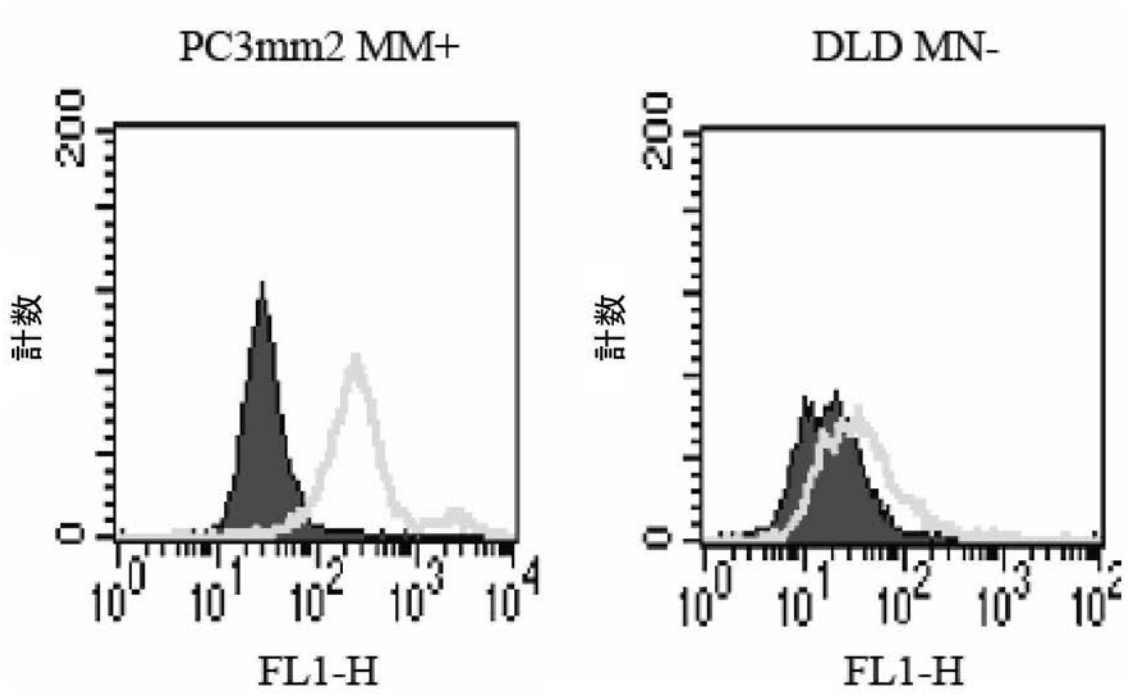


図 10c

【図１１ａ】

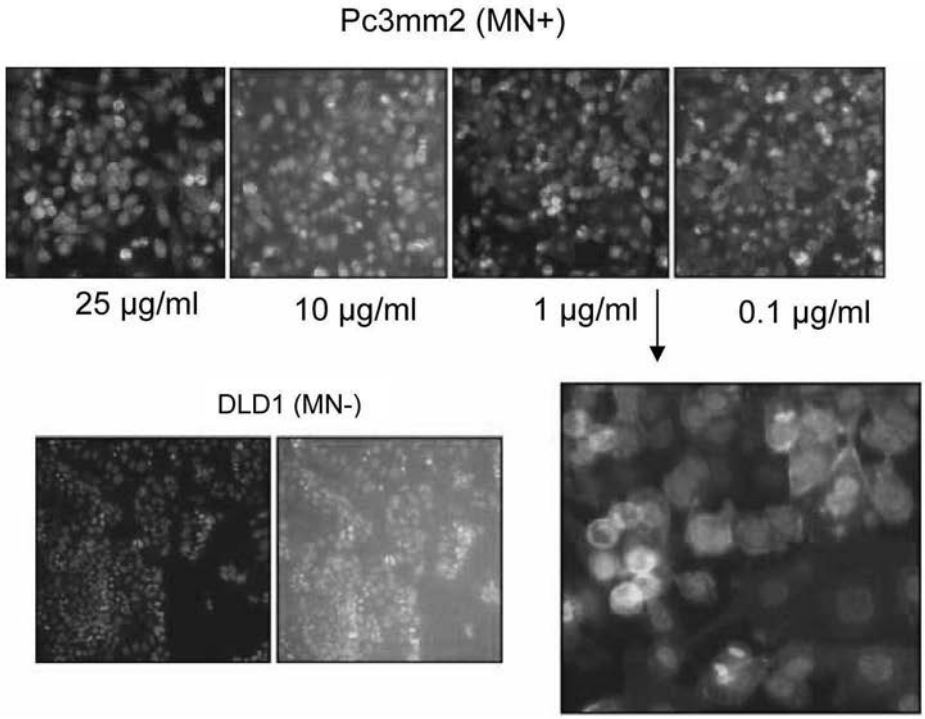


図 11a

【図１１ｂ】

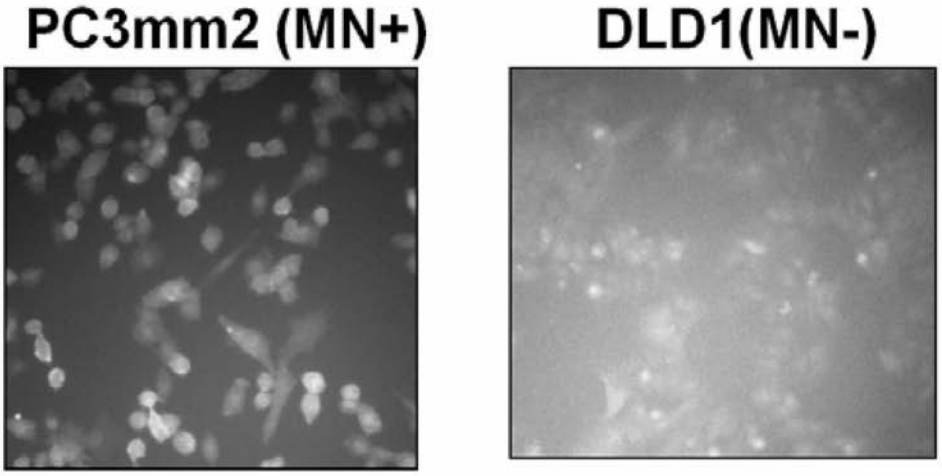


図 11b

【図１２】

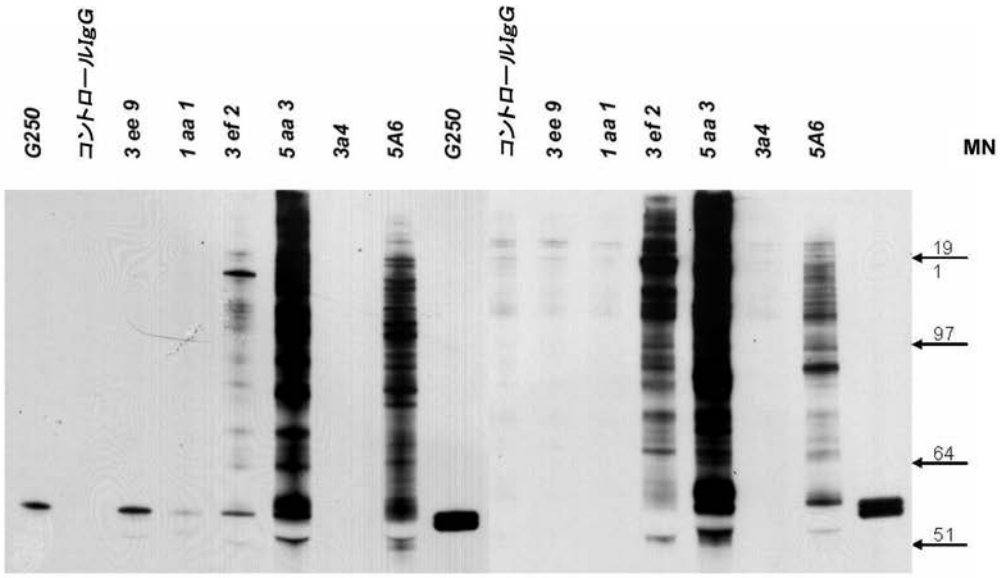


図 12

【図１３ａ】

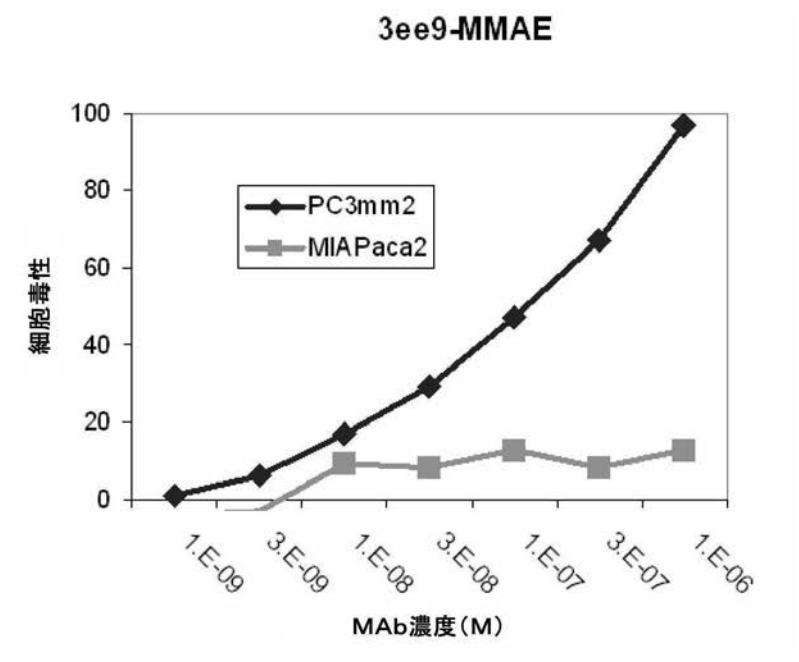


図 13a

【図１３ｂ】

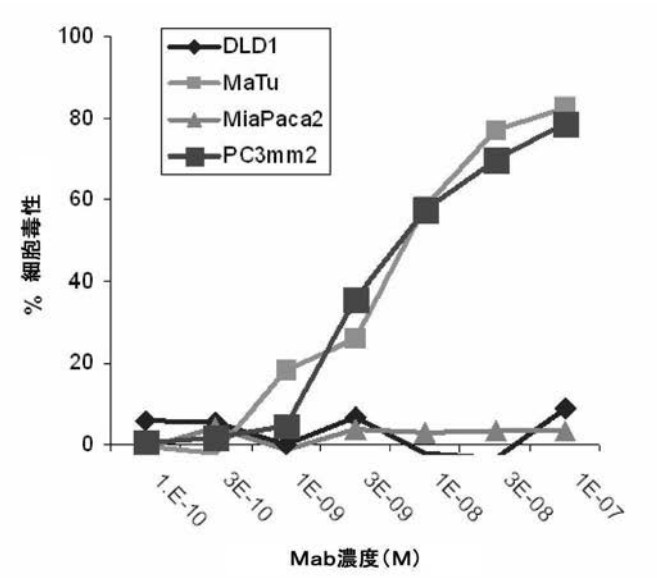


図 13b

【図１３ｃ】

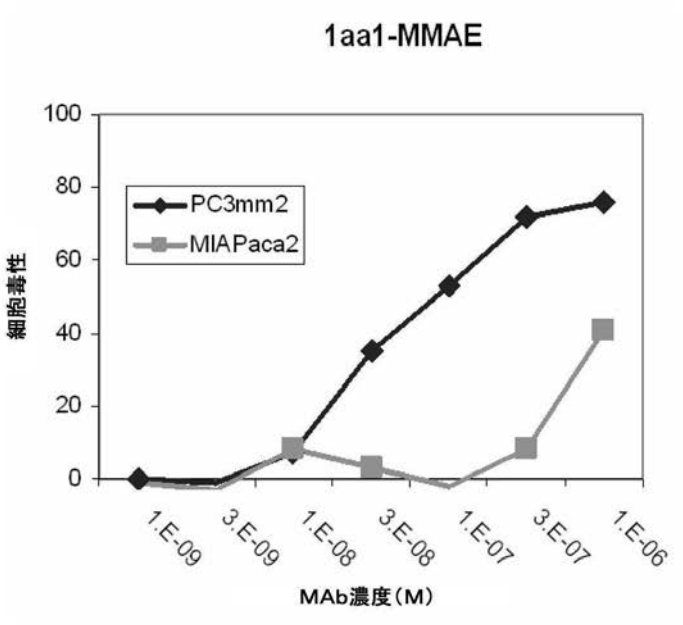

1aa1-MMAE
100
80
60
40
20
0
細胞毒性
PC3mm2
MIAPaca2
1.E-09
3.E-09
1.E-08
3.E-08
1.E-07
3.E-07
1.E-06
MAb濃度(M)

図 13c

【図１４】

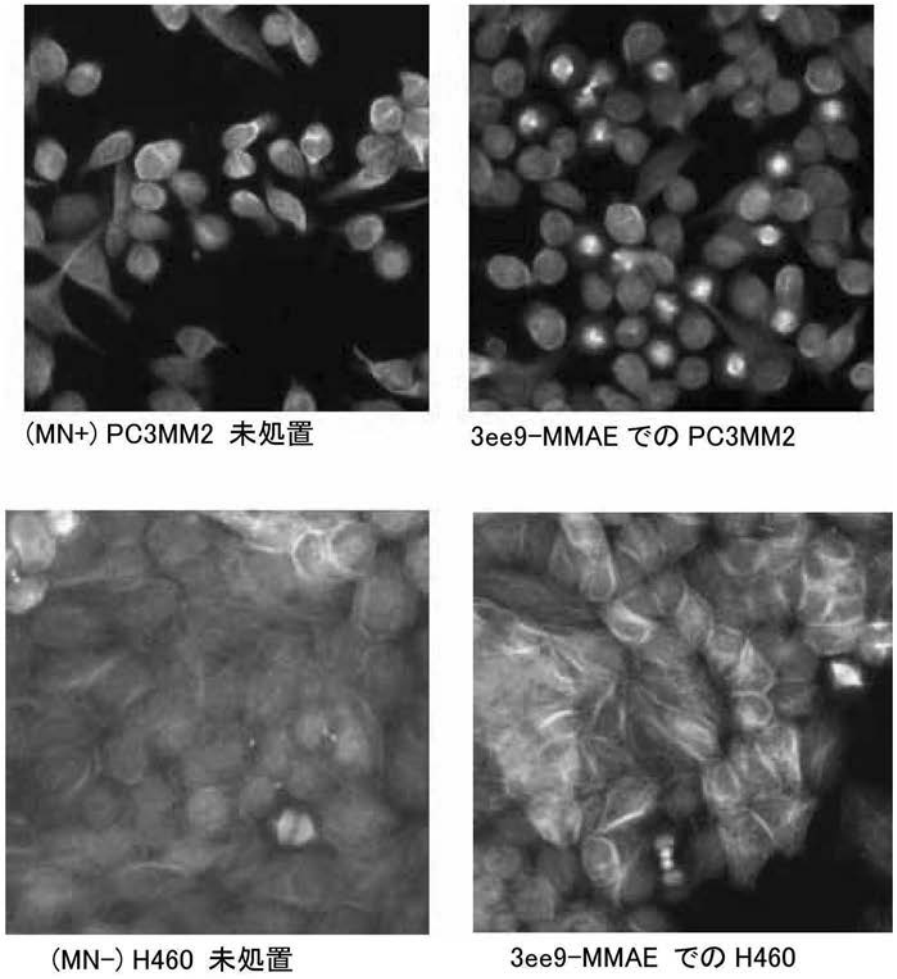

(MN+) PC3MM2 未処置
3ee9-MMAE での PC3MM2
(MN−) H460 未処置
3ee9-MMAE での H460

図 14

【図１５】

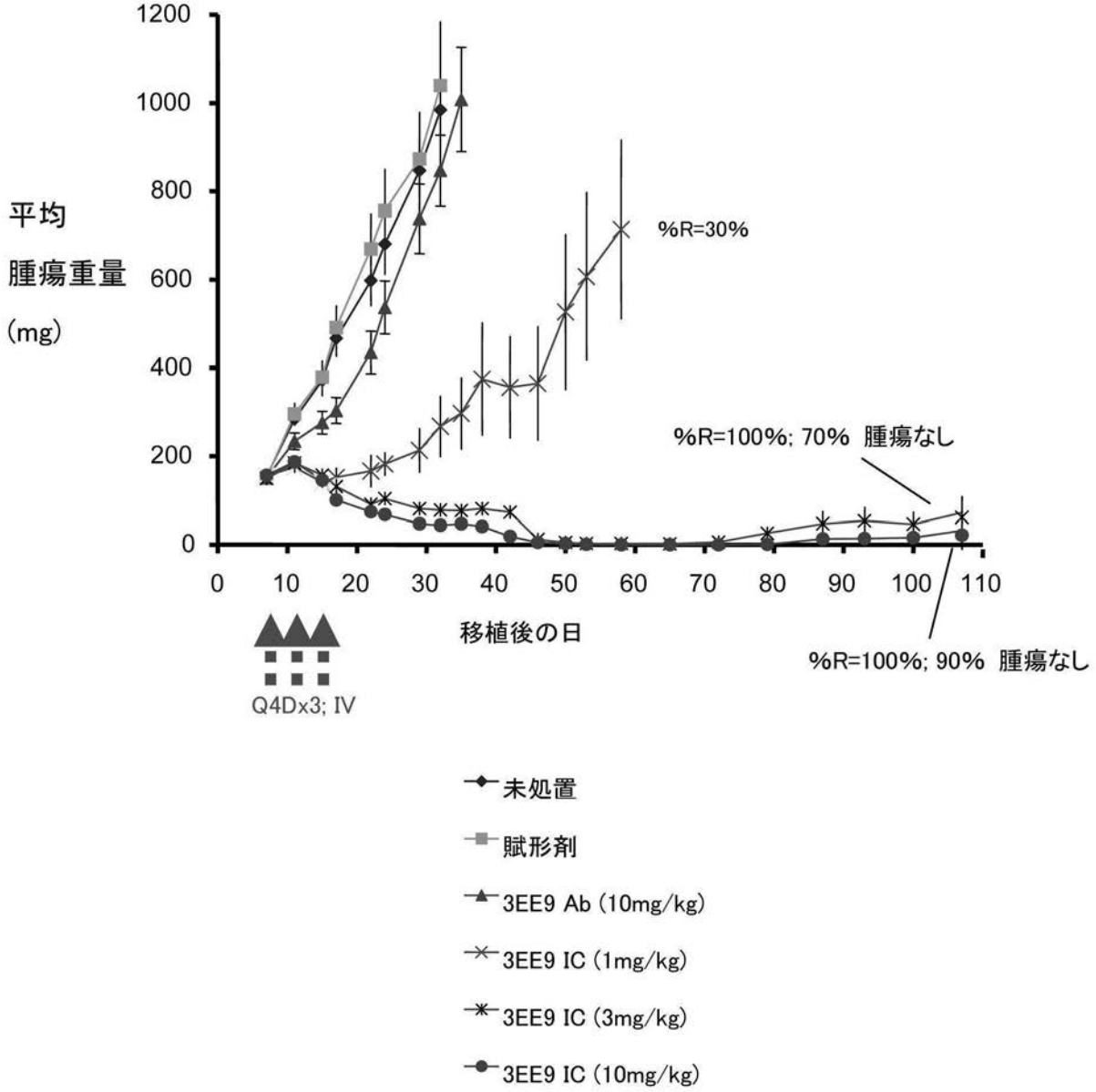

1200
1000
800
600
400
200
0
平均
腫瘍重量
(mg)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
移植後の日
%R=30%
%R=100%; 70% 腫瘍なし
%R=100%; 90% 腫瘍なし
Q4Dx3; IV
未処置
賦形剤
3EE9 Ab (10mg/kg)
3EE9 IC (1mg/kg)
3EE9 IC (3mg/kg)
3EE9 IC (10mg/kg)

図 15

【図１６】

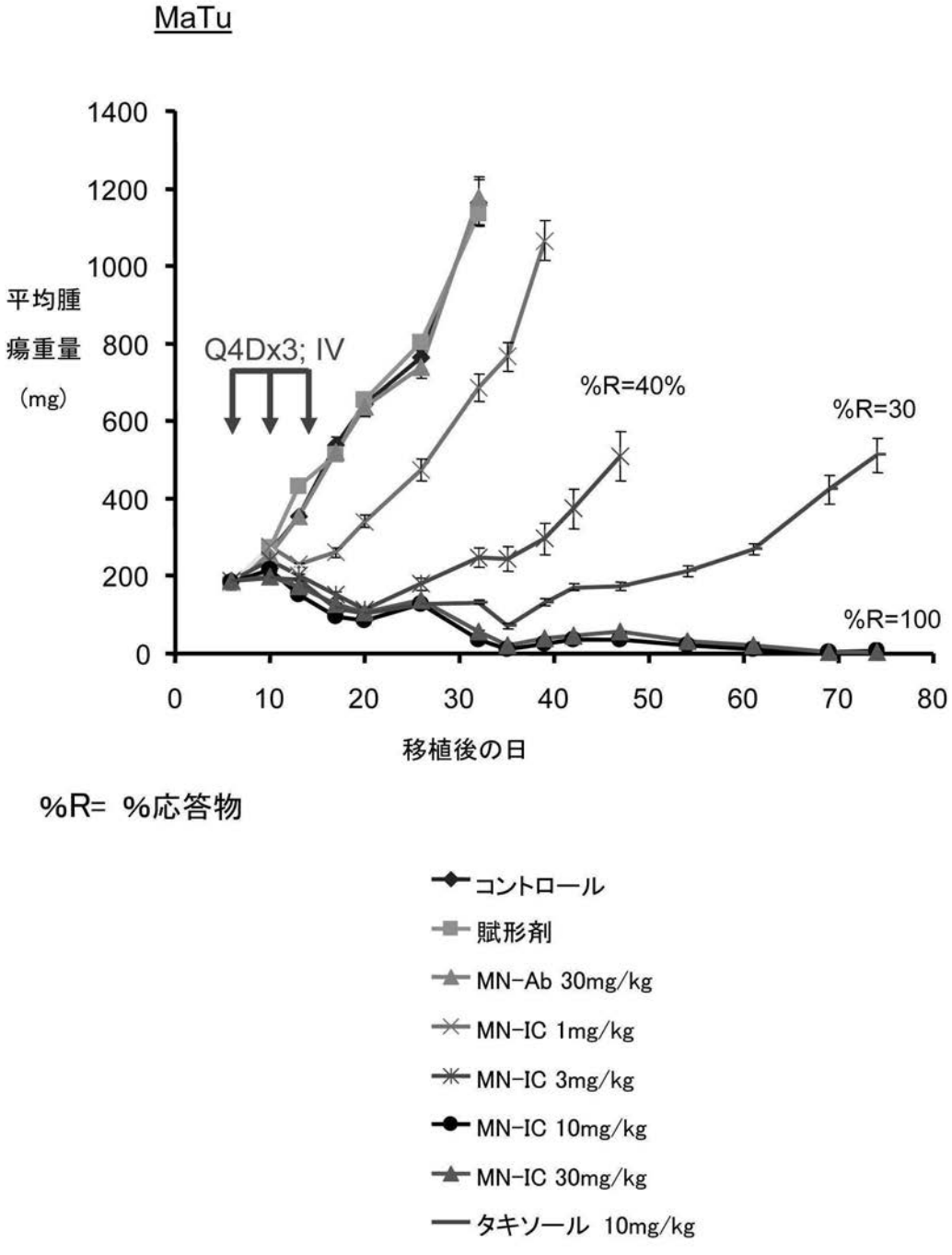

MaTu
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
平均腫瘍重量（mg）
Q4Dx3; IV
%R=40%
%R=30
%R=100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
移植後の日
%R= %応答物
コントロール
賦形剤
MN-Ab 30mg/kg
MN-IC 1mg/kg
MN-IC 3mg/kg
MN-IC 10mg/kg
MN-IC 30mg/kg
タキソール 10mg/kg

図 16

【図１７】

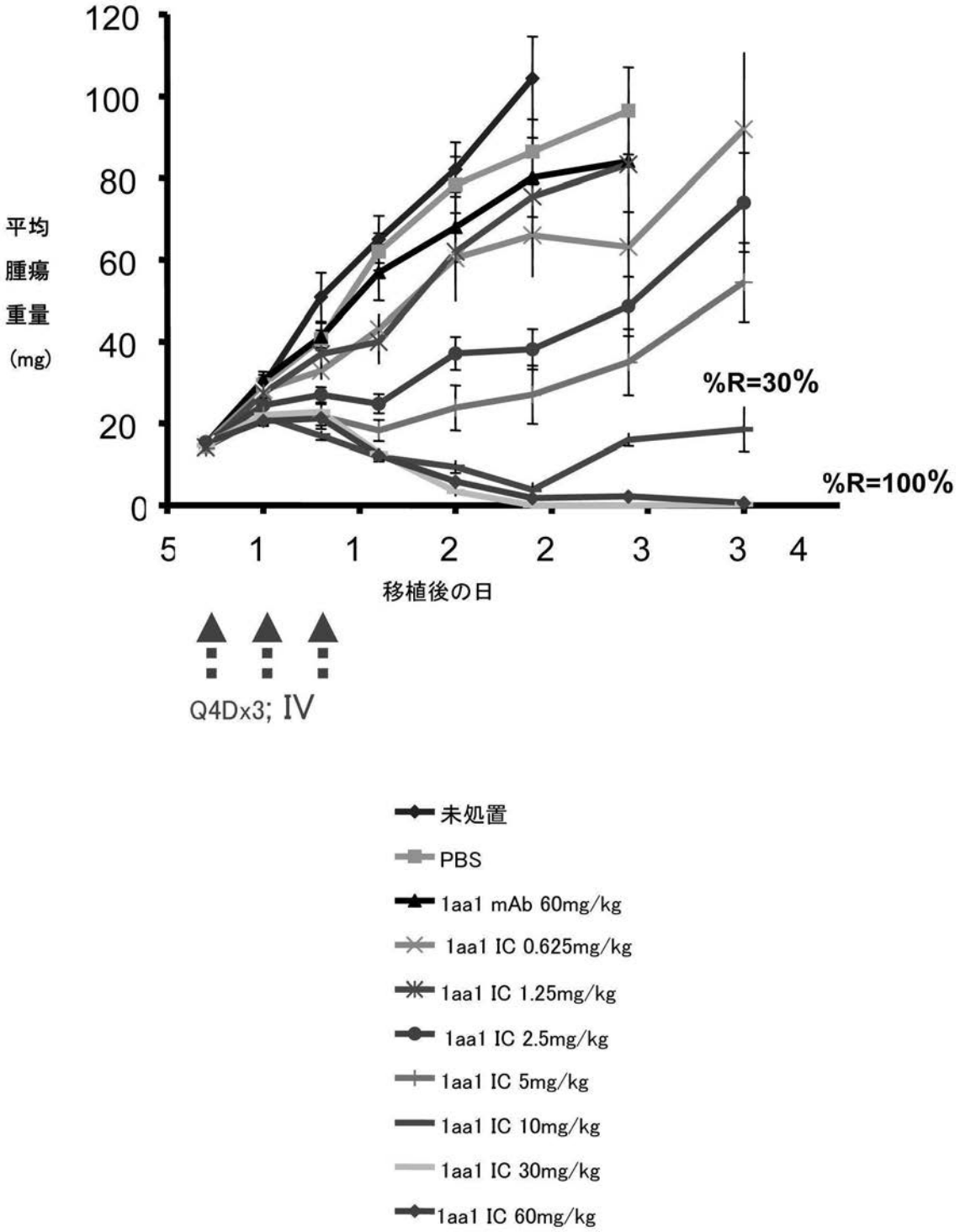

120
100
80
60
40
20
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
%R=30%
%R=100%
5
1
1
2
2
3
3
4
移植後の日
Q4Dx3; IV
未処置
PBS
1aa1 mAb 60mg/kg
1aa1 IC 0.625mg/kg
1aa1 IC 1.25mg/kg
1aa1 IC 2.5mg/kg
1aa1 IC 5mg/kg
1aa1 IC 10mg/kg
1aa1 IC 30mg/kg
1aa1 IC 60mg/kg

図 17

【図１８】

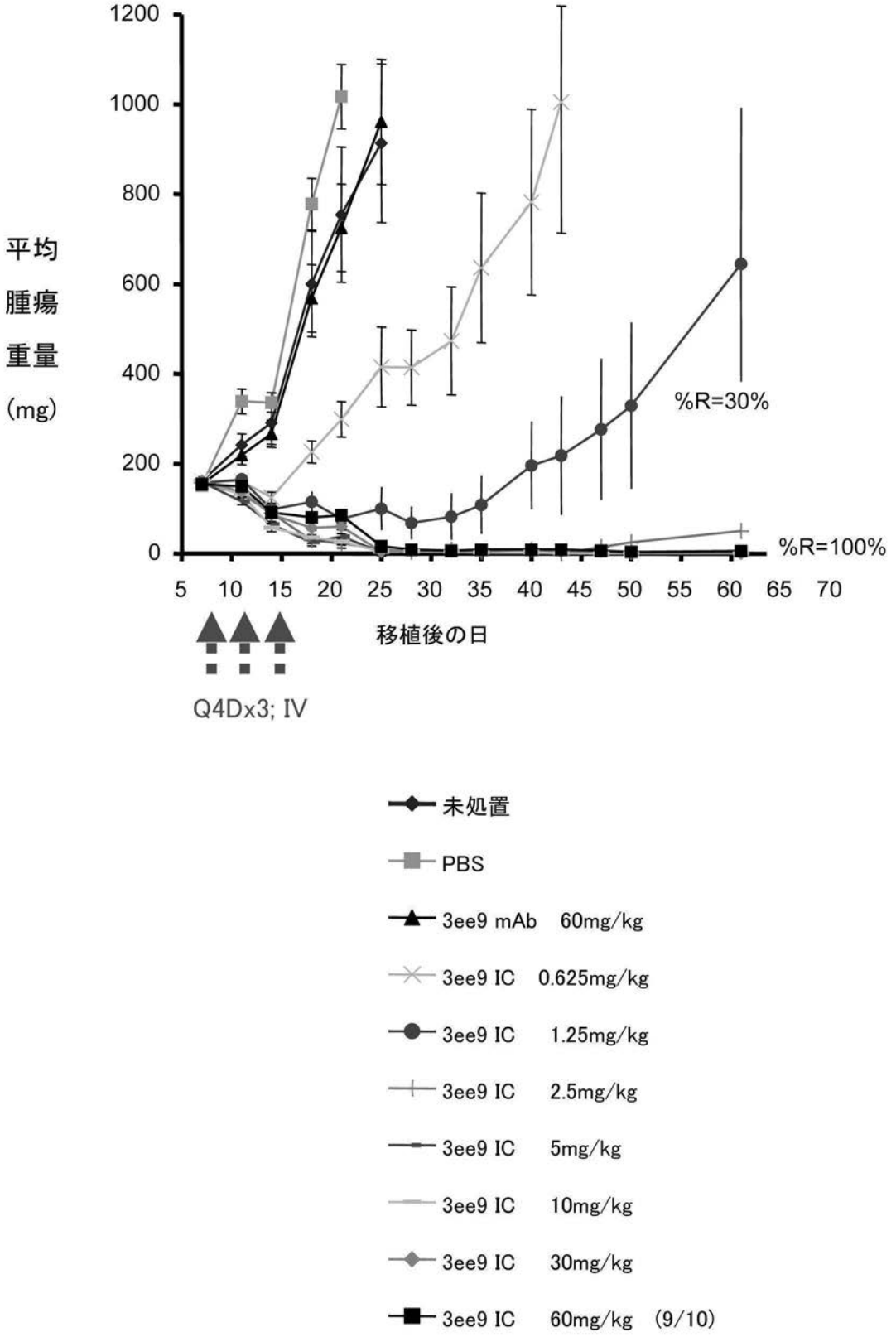

平均
腫瘍
重量
(mg)
1200
1000
800
600
400
200
0
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
移植後の日
%R=30%
%R=100%
Q4Dx3; IV
未処置
PBS
3ee9 mAb 60mg/kg
3ee9 IC 0.625mg/kg
3ee9 IC 1.25mg/kg
3ee9 IC 2.5mg/kg
3ee9 IC 5mg/kg
3ee9 IC 10mg/kg
3ee9 IC 30mg/kg
3ee9 IC 60mg/kg (9/10)

図 18

【図１９】

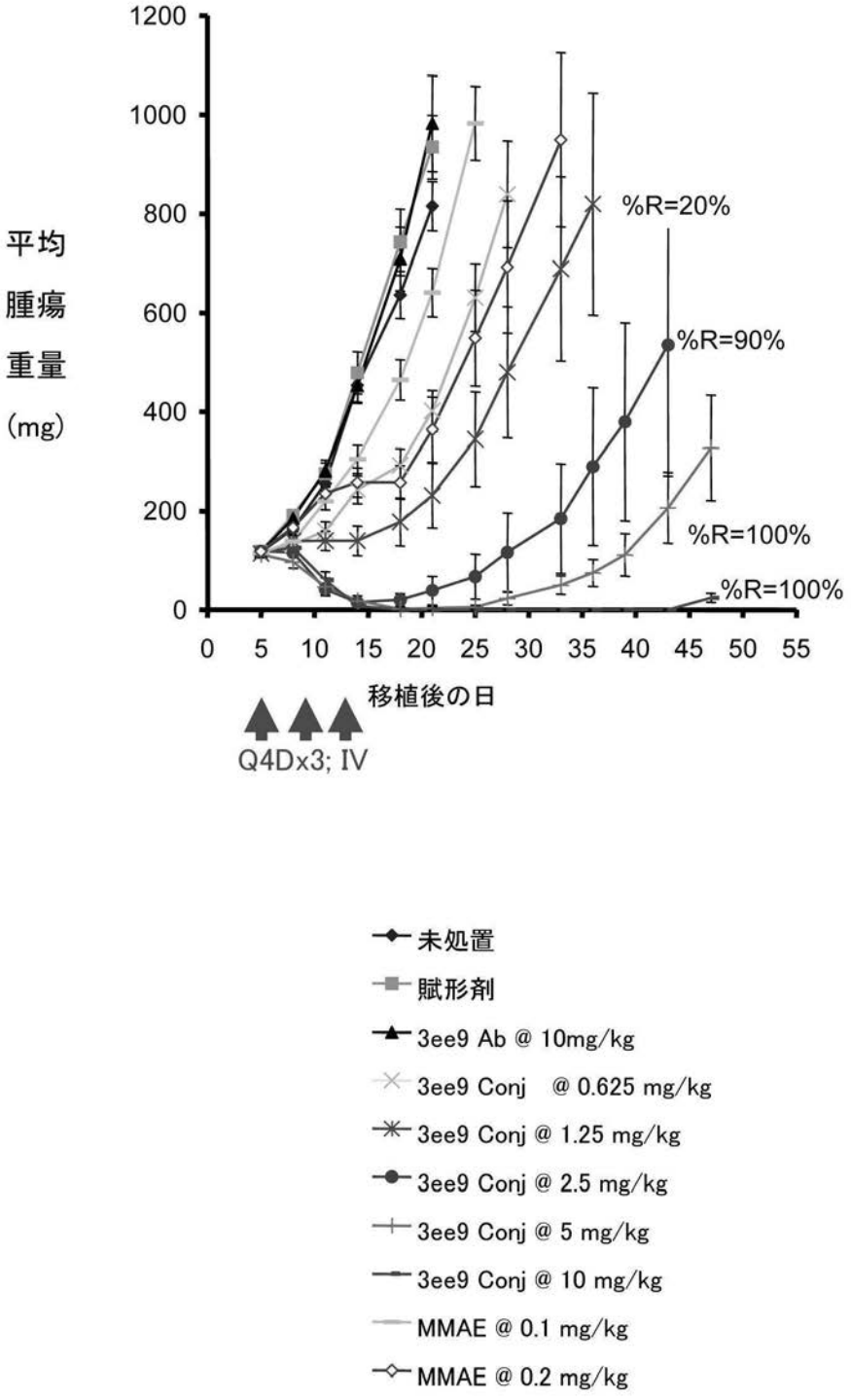

平均
腫瘍
重量
(mg)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
Q4Dx3; IV
%R=20%
%R=90%
%R=100%
%R=100%
未処置
賦形剤
3ee9 Ab @ 10mg/kg
3ee9 Conj @ 0.625 mg/kg
3ee9 Conj @ 1.25 mg/kg
3ee9 Conj @ 2.5 mg/kg
3ee9 Conj @ 5 mg/kg
3ee9 Conj @ 10 mg/kg
MMAE @ 0.1 mg/kg
MMAE @ 0.2 mg/kg

図 19

【図２０】

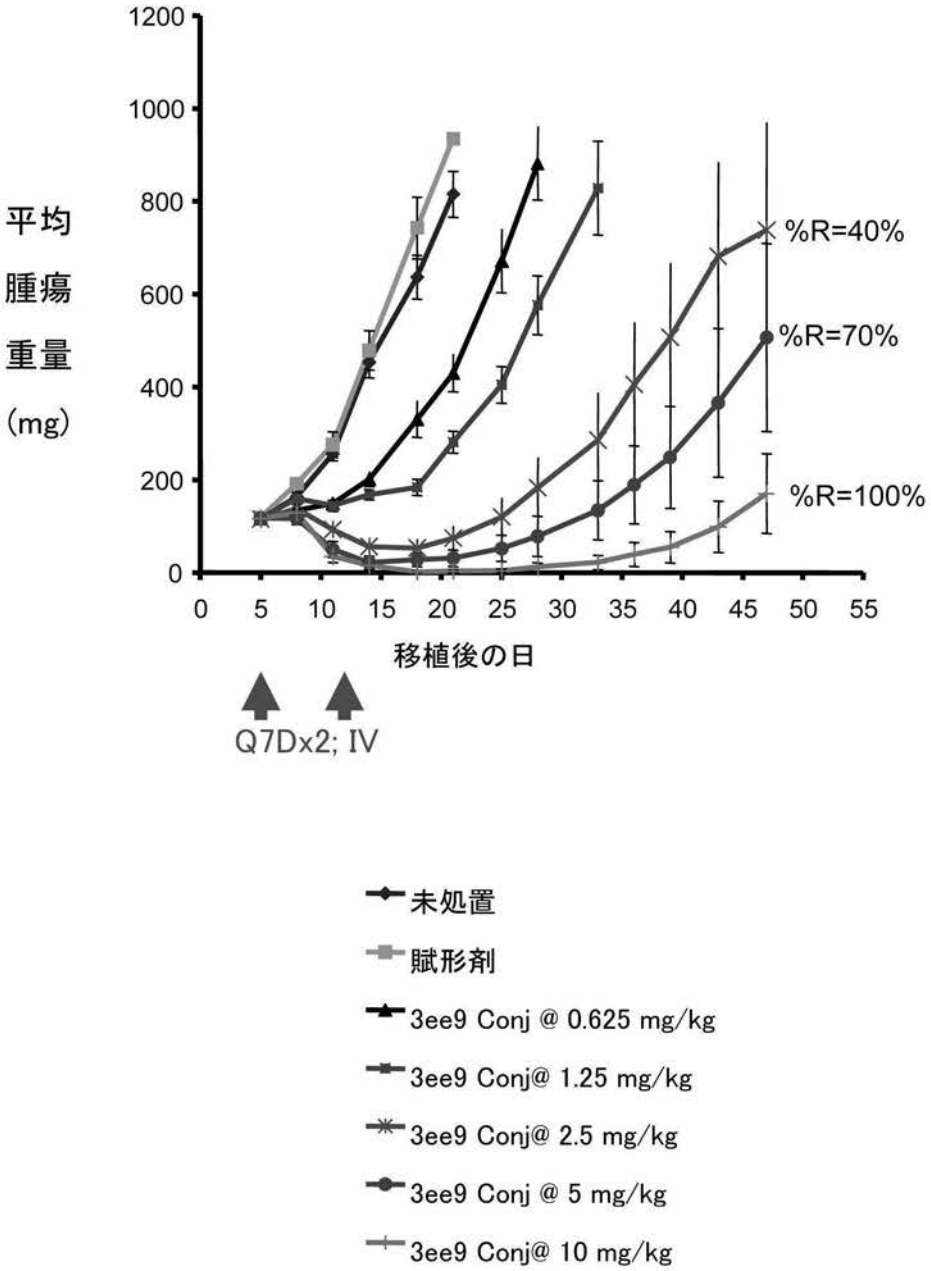

平均
腫瘍
重量
(mg)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
%R=40%
%R=70%
%R=100%
Q7Dx2; IV
未処置
賦形剤
3ee9 Conj @ 0.625 mg/kg
3ee9 Conj@ 1.25 mg/kg
3ee9 Conj@ 2.5 mg/kg
3ee9 Conj @ 5 mg/kg
3ee9 Conj@ 10 mg/kg

図 20

【図２１】

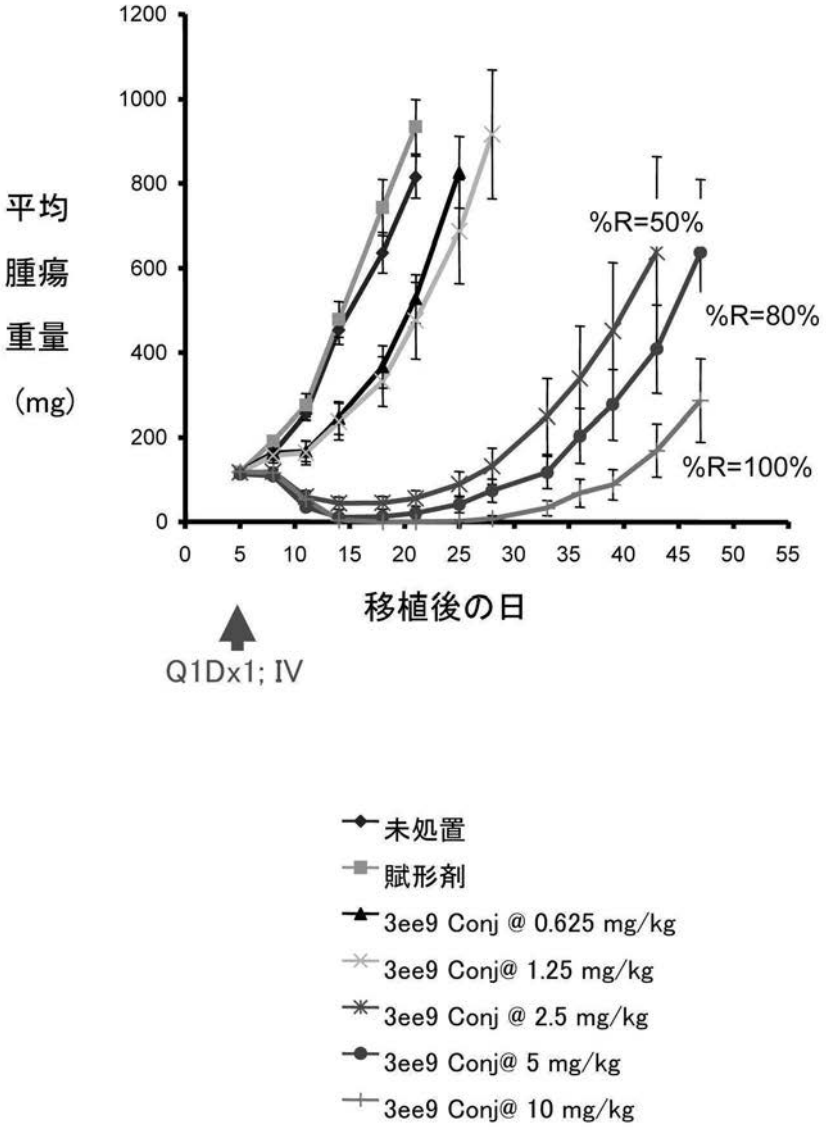

平均
腫瘍
重量
(mg)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
%R=50%
%R=80%
%R=100%
Q1Dx1; IV
未処置
賦形剤
3ee9 Conj @ 0.625 mg/kg
3ee9 Conj@ 1.25 mg/kg
3ee9 Conj @ 2.5 mg/kg
3ee9 Conj@ 5 mg/kg
3ee9 Conj@ 10 mg/kg

図 21

【図２２】

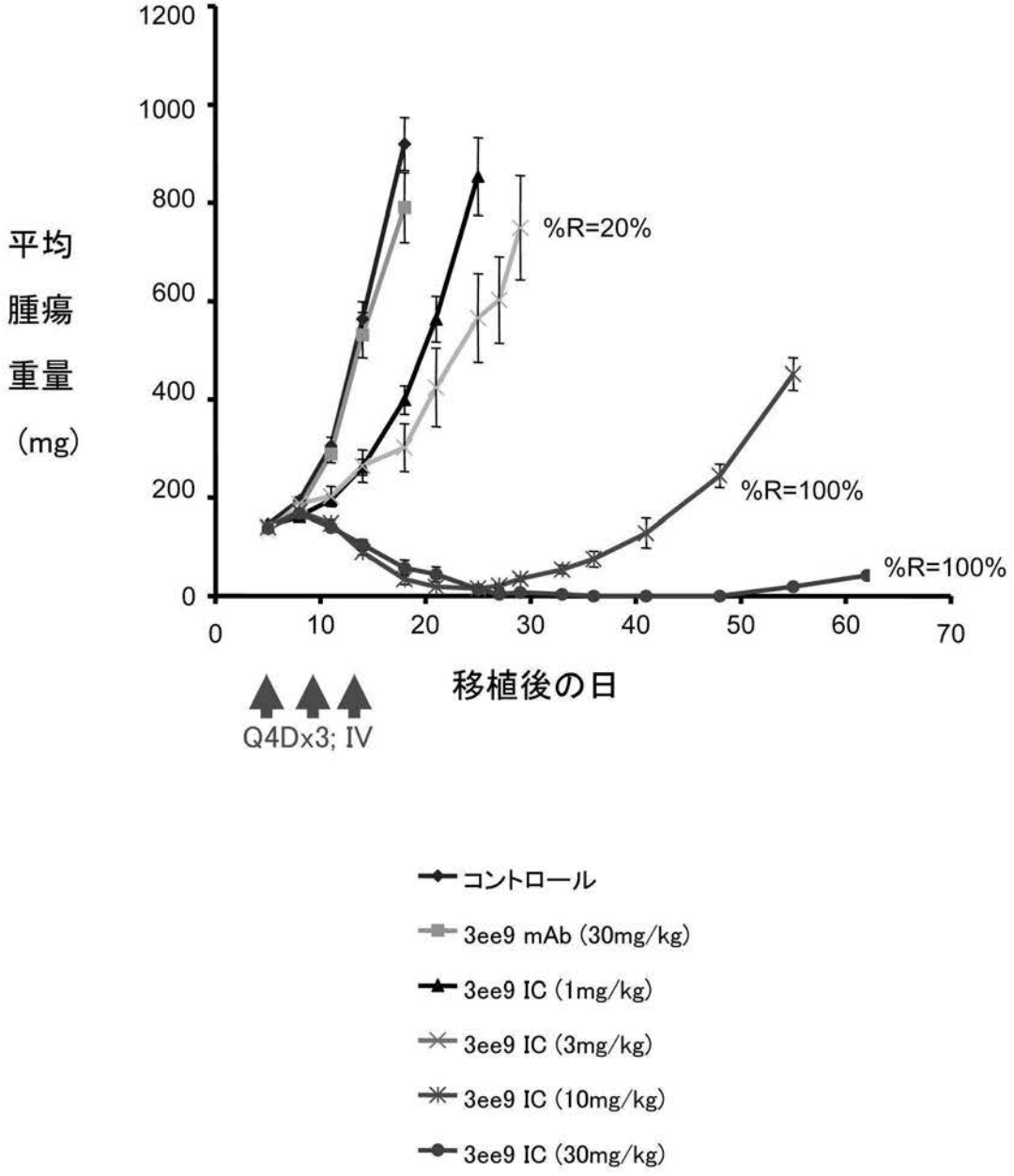

1200
1000
800
600
400
200
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
%R=20%
%R=100%
%R=100%
0
10
20
30
40
50
60
70
移植後の日
Q4Dx3; IV
コントロール
3ee9 mAb (30mg/kg)
3ee9 IC (1mg/kg)
3ee9 IC (3mg/kg)
3ee9 IC (10mg/kg)
3ee9 IC (30mg/kg)

図 22

【図２３】

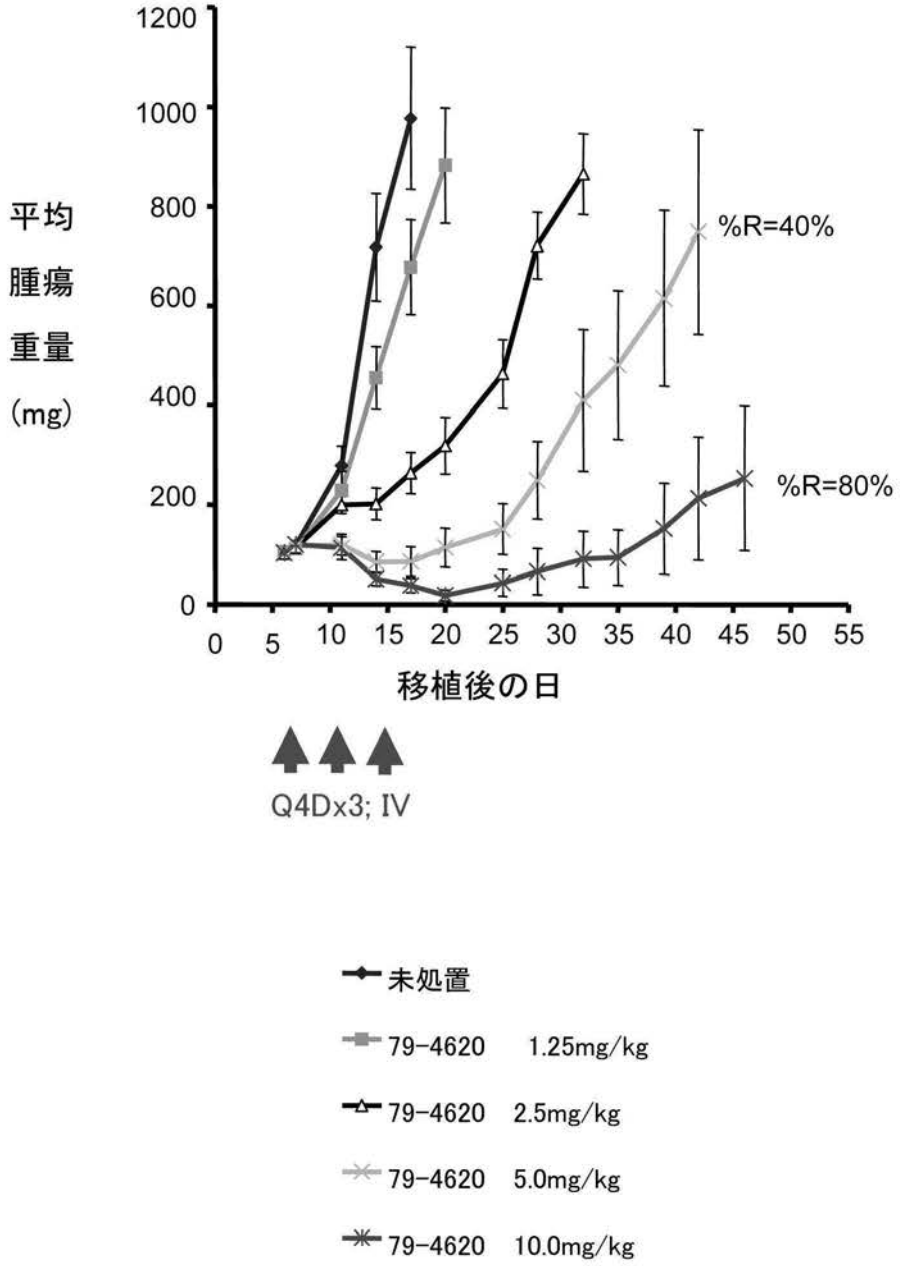
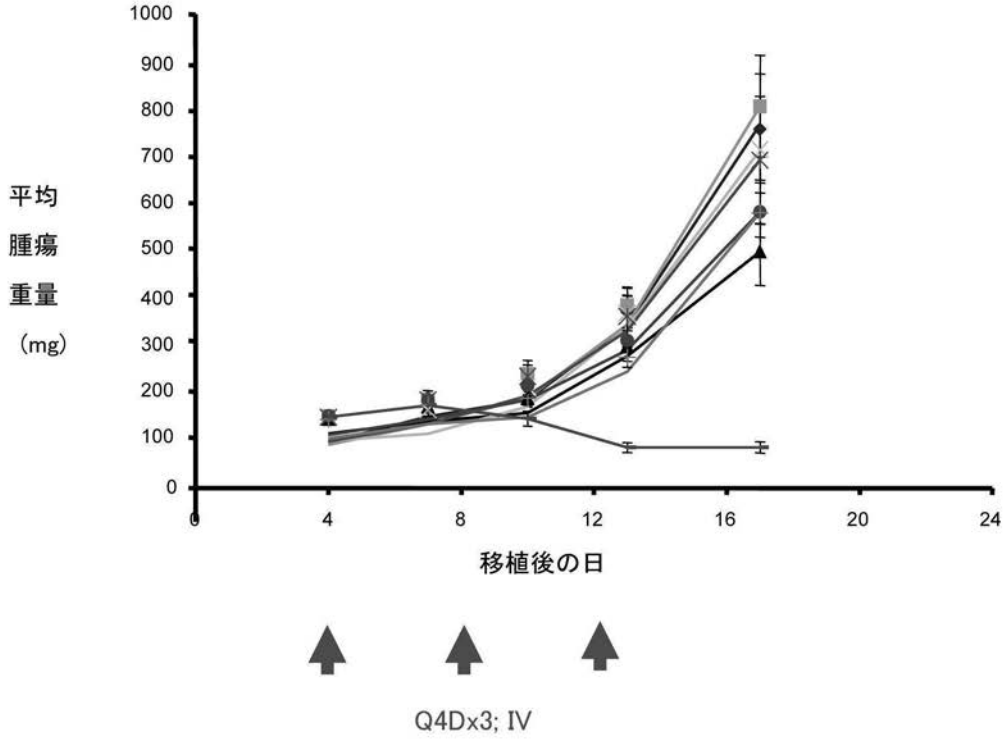

平均
腫瘍
重量
(mg)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
%R=40%
%R=80%
Q4Dx3; IV
未処置
79-4620 1.25mg/kg
79-4620 2.5mg/kg
79-4620 5.0mg/kg
79-4620 10.0mg/kg

図 23

【図２４】


1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
0
4
8
12
16
20
24
移植後の日
Q4Dx3; IV


未処置
PBS, IV, Q4Dx3
3ee9 MMAE @ 1.25 mg/kg, IV, Q4Dx3
3ee9 MMAE @ 2.5 mg/kg, IV, Q4Dx3
3ee9 MMAE @ 5 mg/kg, IV, Q4Dx3
3ee9 MMAE @ 10mg/kg, IV, Q4Dx3
タキソール @ 15 mg/kg, IV, Q4Dx3
ゲムシタビン @ 120 mg/kg, IP, Q4Dx3

図 24

【図２５】

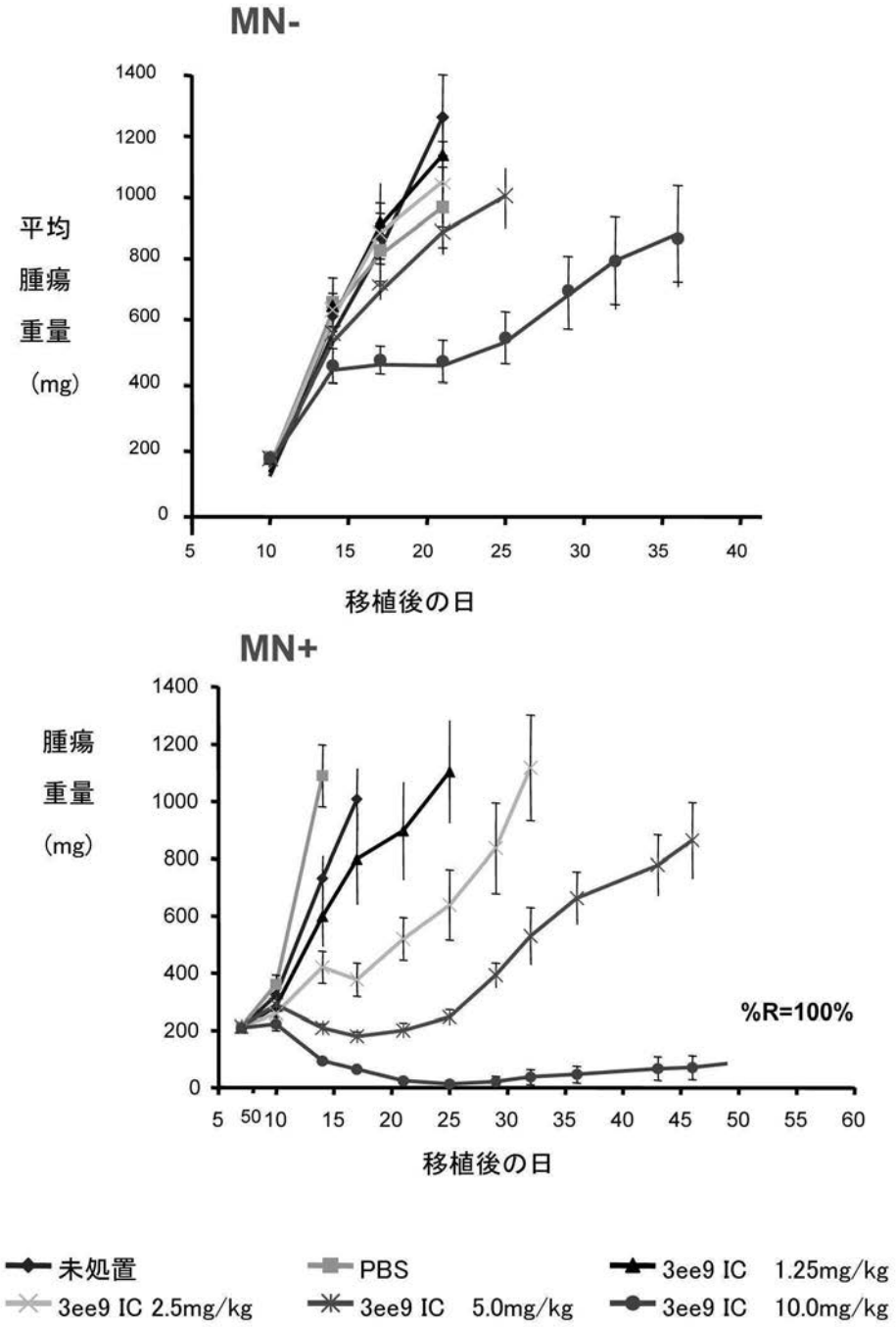
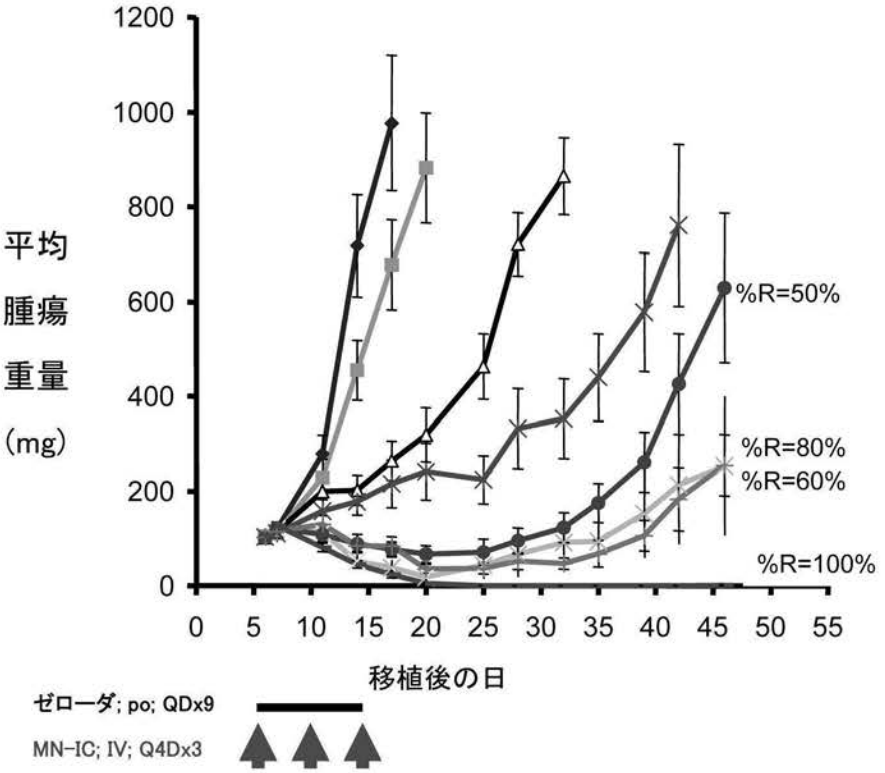

MN-
平均
腫瘍
重量
(mg)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
移植後の日
MN+
腫瘍
重量
(mg)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
%R=100%
5
50
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
移植後の日
未処置
PBS
3ee9 IC 1.25mg/kg
3ee9 IC 2.5mg/kg
3ee9 IC 5.0mg/kg
3ee9 IC 10.0mg/kg

図 25

【図２６ａ】


1200
1000
800
600
400
200
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
%R=50%
%R=80%
%R=60%
%R=100%
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
ゼローダ; po; QDx9
MN-IC; IV; Q4Dx3

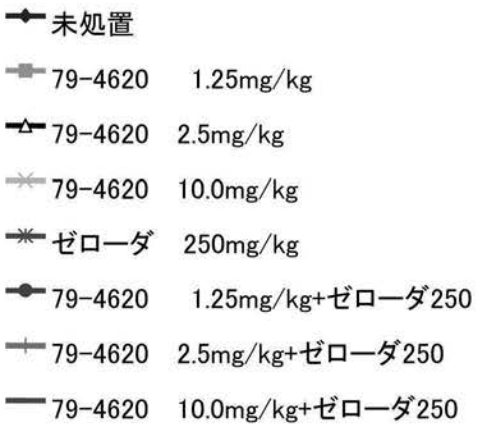

未処置
79-4620 1.25mg/kg
79-4620 2.5mg/kg
79-4620 10.0mg/kg
ゼローダ 250mg/kg
79-4620 1.25mg/kg+ゼローダ250
79-4620 2.5mg/kg+ゼローダ250
79-4620 10.0mg/kg+ゼローダ250

図 26a

【図２６ｂ】

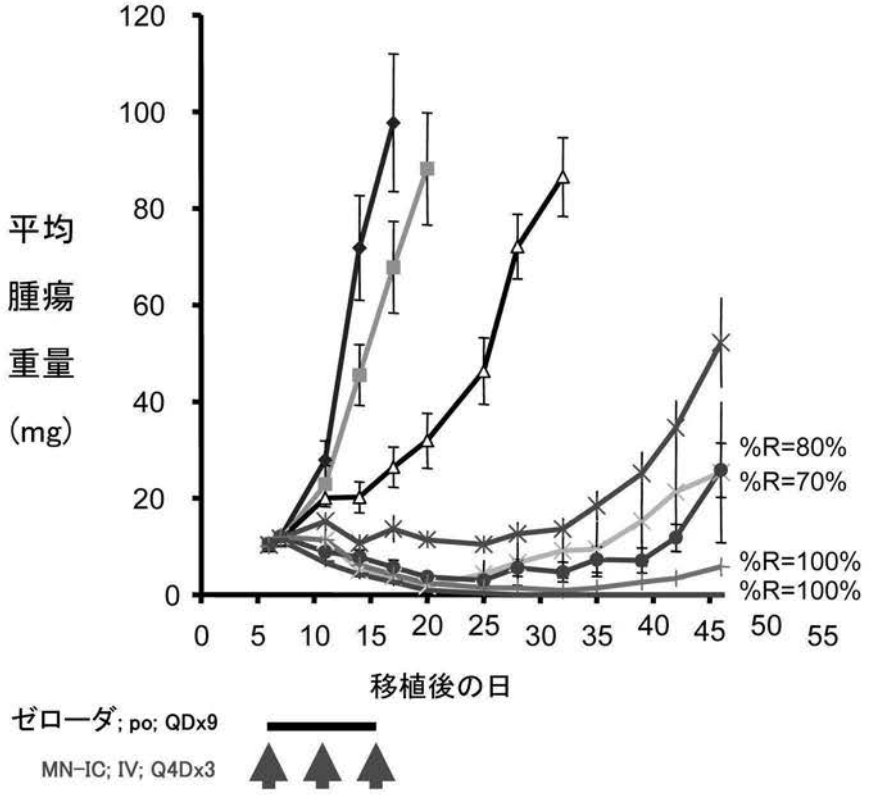

120
100
80
60
40
20
0
平均
腫瘍
重量
(mg)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
移植後の日
%R=80%
%R=70%
%R=100%
%R=100%
ゼローダ; po; QDx9
MN-IC; IV; Q4Dx3
未処置
79-4620 1.25mg/kg
79-4620 2.5mg/kg
79-4620 10.0mg/kg
ゼローダ 500mg/kg
79-4620 1.25mg/kg+ゼローダ 500
79-4620 2.5mg/kg+ゼローダ 500
79-4620 10.0mg/kg+ゼローダ 500

図 26b

【図２７】

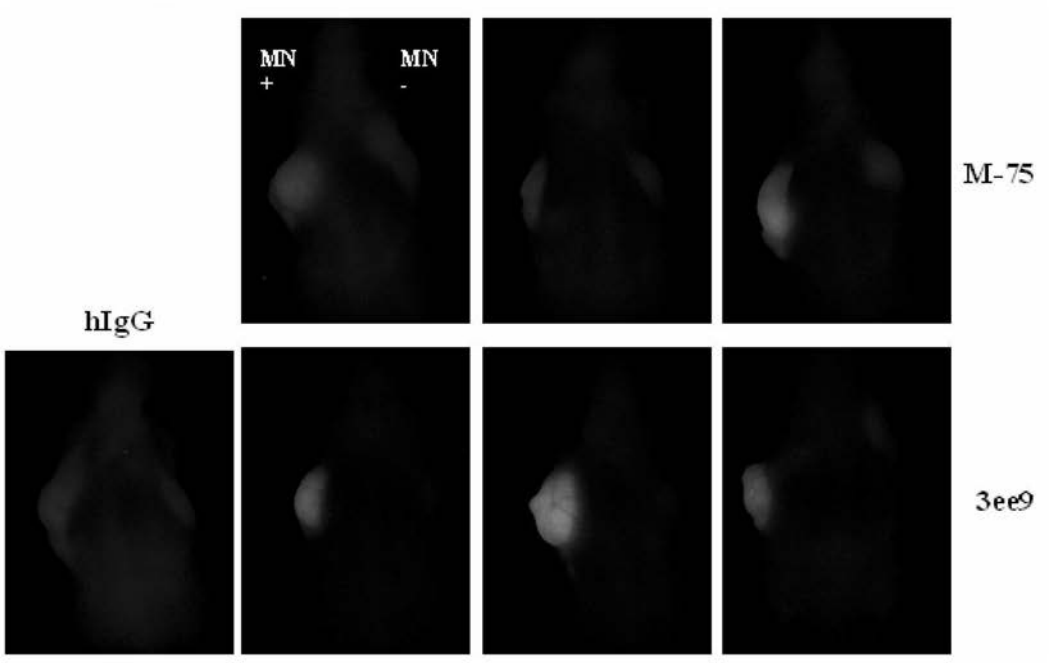


図 27

【図２８】

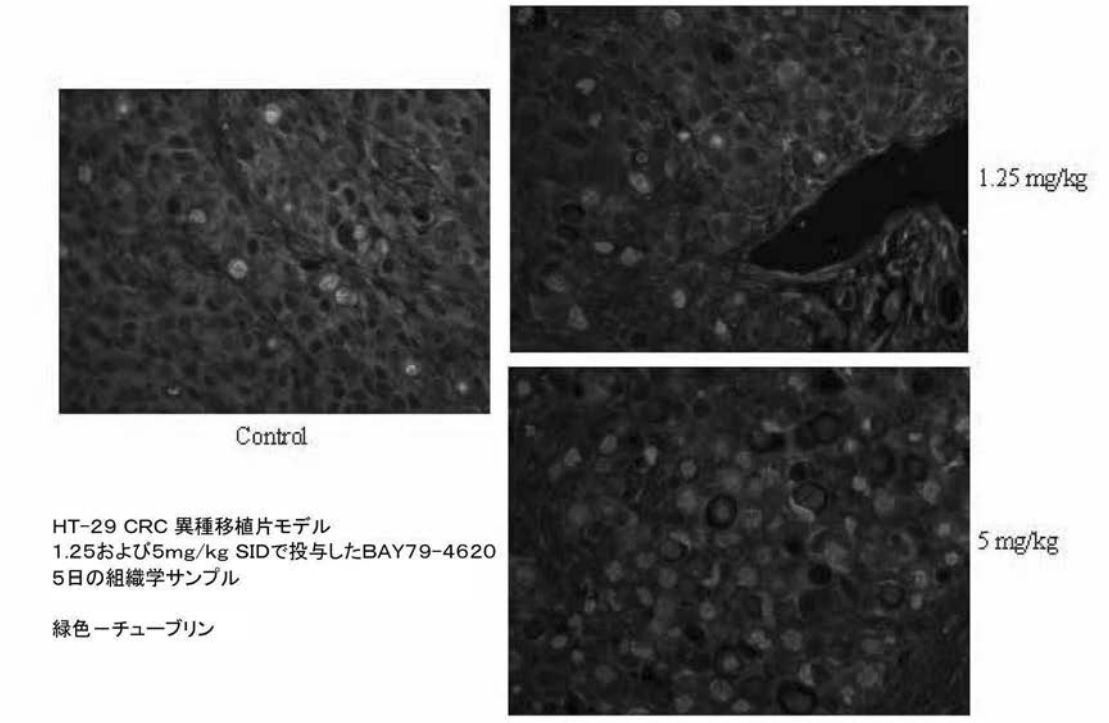


図 28

【配列表】
2012211153000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/02*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｃ	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(72)発明者　テイモシー・マツケイブ
アメリカ合衆国コネチカツト州０６４０５ブランフオード・ハワードアベニユー１４
(72)発明者　パメラ・トレイル
アメリカ合衆国ワシントン州９８０２０エドモンズ・グレンストリート９４５
(72)発明者　シヤー・ハー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４２２ブルーベル・キヤスカートロード８６５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA01 DA02 DA06 DA20 EA04 GA11 HA01 HA15
4B064 AG27 BJ12 CA02 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01 DA14
4C084 AA02 BA01 BA14 BA32 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA21 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 CC22 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA27 EA28 FA74