

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520810
(P2004-520810A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 31/537
A61K 31/7088
A61K 38/00
A61K 39/395

F 1

C12N 15/00
A61K 31/537
A61K 31/7088
A61K 39/395
A61K 39/395

A

E

T

テーマコード(参考)

4B024
4C076
4C084
4C085
4C086

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 241 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-522275 (P2002-522275) | (71) 出願人 | 596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・1 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年8月23日 (2001.8.23) | (74) 代理人 | 100109726 弁理士 園田 吉隆 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年2月24日 (2003.2.24) | (74) 代理人 | 100101199 弁理士 小林 義教 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/026626 | (72) 発明者 | アシュケナジ, アヴィ, ジェー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サンマテオ, タリータウン ストリート 1456 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/016602 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成14年2月28日 (2002.2.28) | | |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/US00/23328 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年8月24日 (2000.8.24) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/US00/32678 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年12月1日 (2000.12.1) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/US01/06520 | | |
| (32) 優先日 | 平成13年2月28日 (2001.2.28) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍の診断と治療のための組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の腫瘍の診断及び治療にとって有用な組成物、並びに哺乳動物の腫瘍の診断及び治療にこれら組成物を用いる方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；
 (b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；
 (d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (e) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；
 (f) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によりコードされるアミノ酸配列；又は
 (g) 表7に示す任意のA T C C 寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によりコードされるアミノ酸配列：

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

【請求項 2】

- (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；
 (b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；
 (d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (e) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列；
 (f) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によりコードされるアミノ酸配列；又は
 (g) 表7に示す任意のA T C C 寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によりコードされるアミノ酸配列：

を含んでなるポリペプチドに結合する請求項1の抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である請求項1の抗体。

【請求項 4】

抗体断片である請求項1の抗体。

【請求項 5】

キメラ又はヒト化抗体である、請求項1の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 6】

成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項 1 の抗体。

【請求項 7】

細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項 1 の抗体。

【請求項 8】

細胞毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項 7 の抗体。

【請求項 9】

細胞毒性剤が毒素である請求項 7 の抗体。

【請求項 10】

毒素がメイタンシノイド及びカリチエアミシンからなる群より選択される、請求項 9 の抗体。

【請求項 11】

毒素がメイタンシノイドである請求項 9 の抗体。

【請求項 12】

細菌で產生される請求項 1 の抗体。

【請求項 13】

C H O 細胞で產生される請求項 1 の抗体。

【請求項 14】

結合する細胞の死を誘導する請求項 1 の抗体。

【請求項 15】

検出可能に標識されている請求項 1 の抗体。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、哺乳動物の腫瘍の診断及び治療にとって有用な組成物、並びに哺乳動物の腫瘍の診断及び治療にこれら組成物を用いる方法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第 2 の主要な死亡原因である（B o r i n g ら， C A C a n c e l J . C l i n . , 4 3 : 7 [1 9 9 3] ）。癌は、増殖し腫瘍を形成する正常な組織に由来する異常、又は新生物細胞の増加、これらの新生物腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、並びに血液又はリンパ系を介して領域リンパ節、及び転移というプロセスを介して離間部位に拡散する悪性細胞の生成を特徴とする。癌の段階では、細胞は正常細胞が成長しない条件下で増殖する。癌は、様々な程度の侵襲性及び攻撃性によって特徴づけられる幅広い種類の形態で出現する。

【0003】

癌治療にとって効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一つ又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、特定の型の癌細胞の表面で特に過剰発現するポリペプチドの同定を探求してきた。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体に基づく治療を介する癌細胞を特異的に標的として破壊する能力のもとになる。この点から、抗体に基づく治療が、ある癌の治療において非常に効果的であることが証明されたことが知られている。例えば、ハーセブチン（登録商標）及びリタキサン（登録商標）（双方ともにジェネンテック社、サウス サンフランシスコ、カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセブチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター 2 (H E R 2) プロト - オンコジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組み換え D N A 誘導ヒト化モノクローナル抗体である。H E R 2 タンパク質の過剰発現は、原発性乳癌の 2 5 - 3 0 % で見られる。リタキサン（登録商標）は、正常及び悪性 B リンパ球の表面に見出された C D 2 0 抗原に対する遺伝子操作キメラマウス / ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方

10

20

30

40

50

は、C H O 細胞で組み換え操作によって產生される。

【 0 0 0 4 】

癌治療にとって効果的な細胞標的を発見する他の試みでは、研究者達は、一又は複数の正常非癌性細胞により作られ、分泌されるよりも高い発現レベルで特定タイプの癌細胞により作られ、分泌されるペプチドを探求し、同定してきた。このような分泌される因子は、しばしば正常細胞を超える成長有利性を癌細胞に与えるタンパク質であり、例えば血管形成因子、細胞付着因子、成長因子等の物を含む。このような分泌ポリペプチドのアンタゴニストの同定は、このような癌の治療のための効果的な治療薬として役立つことが期待される。更に、このような分泌因子の過剰発現の同定は、哺乳動物における特定の癌の診断に役立つであろう。

哺乳動物の癌治療における上記のような進歩にも関わらず、哺乳動物での腫瘍の存在を検出する能力のある診断薬、及び腫瘍性細胞成長を効果的に阻害するための治療薬は大いに必要とされている。従って、本発明の目的は、正常細胞又は他の異なる癌細胞と比較してある種の癌細胞で過剰発現させる細胞表層ポリペプチド又は正常細胞又は他の異なる癌細胞と比較してある種の癌細胞によって過剰発現される分泌ポリペプチドを同定すること、並びに哺乳動物の癌の診断的検出及び治療上の処置にとって有用な組成物を生成するために、それらポリペプチド及びそれらのコード化核酸を利用することである。

【 0 0 0 5 】

(本発明の概要)

A . 実施態様

本明細書において、出願人は、正常な非癌細胞の一つ又は複数の型の表面と比較して、癌細胞の一つ又は複数の型の表面でより多く発現する種々の細胞ポリペプチド（そしてこれらのコード化核酸又はその断片）の同定について初めて記載する。ここで、そのようなポリペプチドは、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド（「T A T」ポリペプチド）と呼ばれ、哺乳動物における癌治療及び診断の効果的な標的として機能することが期待される。

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

【 0 0 0 6 】

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

他の側面では、単離された核酸分子は、(a) ここで開示される完全長T A Tポリペプチドc D N Aのコード化配列、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くT A Tポリペプチドのコード化配列、膜貫通T A Tポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列で、シグナルペプチドを含む又は含まない、ここに開示される又はここに開示される完全長T A Tポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に明らかにされた断片であるコード化配列、又は(b) (a)のD N A分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%，91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 0 7 】

さらなる側面では、本発明は、(a) ここで開示されるA T C Cに寄託された任意のヒトタンパク質c D N Aの完全長コード化配列によってコードされる同じ成熟ポリペプチドを

コードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%，91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，又は99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。この点から、「完全長コード化配列」という用語は、ATCCへ寄託されたベクターへ挿入されているcDNAのTATポリペプチド-コード化ヌクレオチド配列を指す(しばしば、添付図面の開始及び終止コドンの間でそれを含んで示されている)。

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

【0008】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

他の実施態様では、本発明は上記において特定した任意の単離された核酸配列によりコードされる単離されたT A Tポリペプチドを提供する。

ある側面では、本発明は、ここに開示する完全長アミノ酸配列を有するT A Tポリペプチド、ここに開示するシグナルペプチドを欠くT A Tポリペプチドアミノ酸配列、シグナルペプチドを有するか又は有しないここに開示した膜貫通T A Tポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示する核酸配列の任意のもの、又はここに開示する完全長T A Tポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に明らかにされた断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%，91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたT A Tポリペプチドに関する。 10

【 0 0 1 0 】

さらなる側面では、本発明は、ここに開示されてA T C Cに寄託されたヒトタンパク質c DNAの任意のものによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%，91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%，又は99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたT A Tポリペプチドに関する。 20

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを持たない単離されたT A Tポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これを生成する方法もまたここに開示されていて、これらの方法には、T A Tポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含有するベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からT A Tポリペプチドを回収することを含む。 20

【 0 0 1 1 】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失したか又は膜貫通ドメインが不活性化しているいすれかの単離されたT A Tポリペプチドを提供する。これを生成する方法もまたここに開示されており、これらの方法には、T A Tポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からT A Tポリペプチドを回収することが含まれる。 30

本発明の他の実施態様では、本発明は、任意のここで記載されているポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。一例として、その宿主細胞はC H O細胞、大腸菌、又は酵母であり得る。任意のここに開示されているポリペプチドの生成工程がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現にとって適切な条件下で宿主細胞を培養すること、そして細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することが含まれる。

【 0 0 1 2 】

他の実施態様では、本発明は、異種(非-T A T)ポリペプチドに融合した、ここに開示の任意のT A Tポリペプチドを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのF c領域等の異種ポリペプチドと融合した任意のここに開示のT A Tポリペプチドを含む。 40

その他の実施態様では、本発明は、任意の上記又は下記のポリペプチドと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリチエアミシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞毒性剤、抗生素質、放射性同位体、核溶解性酵素等と随意的に共役し得る。本発明の抗体は、C H O細胞又は細菌細胞で随意的に產生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的として、本発明の抗体は、検出可能に標識され、個体支持体等に付着され得る 50

。

【 0 0 1 3 】

本発明の他の実施態様では、本発明は任意のここで開示されている抗体をコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供されている。一例として、この宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母であり得る。任意のここに記載されている抗体の生成に関する工程がさらに提供され、所望する抗体の発現にとって適切な条件下で宿主細胞を培養すること、そして細胞培養物からその所望する抗体を回収することが含まれる。

他の実施態様では、本発明は、上記の任意のもの又は下記のTATポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチド（「TAT結合オリゴペプチド」）を提供する。本発明のTAT結合オリゴペプチドは、例えばメイタンシノイド又はカリチェアミシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞毒性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と随意的に共役し得る。本発明のTAT結合オリゴペプチドは、CHO細胞又は細菌細胞で随意的に産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的として、本発明のTAT結合オリゴペプチドは、検出可能に標識され、固体支持体等に付着させられ得る。10

本発明の他の実施態様では、本発明は、任意のここで記載されているTAT結合オリゴペプチドをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供されている。一例として、この宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母であり得る。任意のここに記載されているTAT結合オリゴペプチドの生成に関する工程がさらに提供され、所望するオリゴペプチドの発現にとって適切な条件下で宿主細胞を培養すること、そして細胞培養からその所望するオリゴペプチドを回収することが含まれる。20

他の実施態様では、本発明は、上記の任意のもの又は下記のTATポリペプチドに好ましくは特異的に結合する小有機分子（「TAT結合有機分子」）を提供する。本発明のTAT結合有機分子は、例えばメイタンシノイド又はカリチェアミシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞毒性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と随意的に共役し得る。本発明のTAT結合有機分子は、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。診断の目的においては、本発明のTAT結合有機分子は、検出可能に標識され、固体支持体等に付着させられ得る。30

【 0 0 1 4 】

よりさらなる実施態様では、本発明は、担体との組み合わせである、ここに記載のTATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、ここに記載の抗TAT抗体、ここに記載のTAT結合オリゴペプチド、又はここに記載のTAT結合有機分子を含んでなる組成物に関する。随意的には、この担体は薬学的に許容可能な担体である。

さらにその他の実施態様では、本発明は、容器及び容器内の組成物を含む製造品に関し、その組成物には、ここに記載のTATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、ここに記載の抗TAT抗体、ここに記載のTAT結合オリゴペプチド、又はここに記載のTAT結合有機分子が含まれ得る。その製造品は、さらに随意的に、腫瘍の治療上の処置又は診断的検出のためのこの組成物の利用について言及する、容器に添付した標識、又は容器内に含まれる添付文書を含む。40

本発明のその他の実施態様は、TATポリペプチド、キメラTATポリペプチド、抗TATポリペプチド抗体、TAT結合オリゴペプチド、又はTAT結合有機分子に反応する症状の治療に有用な薬物の調製のための、ここに記載のTATポリペプチド、ここに記載のキメラTATポリペプチド、ここに記載の抗TATポリペプチド抗体、ここに記載のTAT結合オリゴペプチド、又はここに記載のTAT結合有機分子の用途に関する。50

【 0 0 1 5 】

B . さらなる実施態様

本発明のその他の実施態様は、TATポリペプチドを発現する癌細胞を死滅させる方法に関し、この方法には、癌細胞をTATポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は

小有機分子と接触させ、それによって癌細胞の死を引き起こすことが含まれる。場合によつては、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、TAT結合オリゴペプチド及びTAT結合有機分子は、例えは、メイタンシノイド又はカリチェアミシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞毒性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と随意的に結合し得る。本発明の方法に用いられる抗体及びTAT結合オリゴペプチドは、随意的に、CHO細胞又は細菌細胞で產生され得る。

本発明のさらにその他の実施態様は、哺乳動物のTATポリペプチド発現腫瘍を治療的に処置する方法に関し、この方法には、TATポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子の治療的に有効な量を哺乳動物へ投与、それによつて腫瘍の効果的な治療上の処置を生じさせることを含む。場合によつては、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、例えは、メイタンシノイド又はカリチェアミシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞毒性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と随意的に共役し得る。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、随意的に、CHO細胞又は細菌細胞で產生され得る。

本発明のさらにその他の実施態様は、TATポリペプチドを含むと思われる試料でTATポリペプチドの存在を確かめる方法に関し、この方法には、試料をTATポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子に曝して試料中でのTATポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合を確かめることができて、そのような結合の存在は、試料中のTATポリペプチドの存在を示す。場合によつては、この試料は、TATポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いるTAT結合抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、随意的に、検出可能なように標識され、固体支持体等に付着させられ得る。

【0016】

本発明のさらなる実施態様は、哺乳動物での腫瘍の存在を診断する方法に関し、この方法には、(a)前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び(b)同じ組織源の既知の正常細胞のコントロール試料からTATポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することが含まれ、コントロール試料と比較して、試験試料でのTATポリペプチドのより高いレベルの発現は、試験試料が得られた哺乳動物での腫瘍の存在を示す。本発明のその他の実施形態は、哺乳動物での腫瘍の存在を診断する方法に関し、この方法には、(a)哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料をTATポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は小有機分子と接触させること、及び(b)試験試料中の、抗体、オリゴペプチド又は小有機分子とTATポリペプチドの間で形成される複合体を検出することが含まれ、複合体の形成は、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によつては、用いられた抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、検出可能に標識されている、固体支持体等に付着されている及び/又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

【0017】

C. 更に付加的な実施態様

1. (a)図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b)図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

(c)図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを有するものをコードするヌクレオチド配列；

(d)図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配

10

20

30

40

50

列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；
 （e）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列；
 （f）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列；
 （g）表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列；又は

（h）（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、又は（g）の相補鎖、に対して少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。 10

2. （a）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

（b）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

（c）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを有するものをコードするヌクレオチド配列； 20

（d）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

（e）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列；

（f）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列；

（g）表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列；又は 30

（h）（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、又は（g）の相補鎖を含んでなる単離された核酸。

3. （a）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

（b）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

（c）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを有するものをコードするヌクレオチド配列； 40

（d）図6（配列番号：6）、図7（配列番号：7）、図8（配列番号：8）、図9（配列番号：9）、又は図10（配列番号：10）に示すポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

（e）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列；

（f）図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、図4（配列番号：4）、又は図5（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列；

（g）表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列； 50

又は

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

4 . ハイブリダイゼーションがストリンジエントな条件下で起こる、請求項 3 の核酸。

5 . 少なくとも約 5 ヌクレオチド長である、請求項 3 の核酸。

6 . 請求項 1 の核酸を含んでなる発現ベクター。

7 . 前記核酸がベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列と作用可能に結合している、請求項 6 の発現ベクター。

8 . 請求項 7 の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

9 . C H O 細胞、大腸菌又は酵母細胞である、請求項 8 の宿主細胞。

10 . 前記ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 8 の宿主細胞を培養すること及び細胞培養から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる、ポリペプチドを生成する工程。

11 . (a) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すアミノ酸配列；

(b) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)、又は図 5 (配列番号 : 5) に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)、又は図 5 (配列番号 : 5) に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表 7 に示す任意の A T C C 寄託番号で寄託された c D N A の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

12 . (a) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すアミノ酸配列；

(b) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 10 (配列番号 : 10) に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)、又は図 5 (配列番号 : 5) に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)、又は図 5 (配列番号 : 5) に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

10

20

30

40

50

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

13. 異種ポリペプチドと融合した請求項11のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド。

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

15. (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；

(b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドと結合する单離された抗体。

16. (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；

(b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドと結合する請求項15の抗体。

17. モノクローナル抗体である請求項15の抗体。

18. 抗体断片である請求項15の抗体。

19. キメラ又はヒト化抗体である、請求項15の抗体。

20. 成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項15の抗体。

21. 細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項15の抗体。
22. 細胞毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項21の抗体。
23. 細胞毒性剤が毒素である請求項21の抗体。
24. 毒素がメイタンシノイド及びカリチエアミシンからなる群より選択される、請求項23の抗体。
25. 毒素がメイタンシノイドである請求項23の抗体。
26. 細菌で產生される請求項15の抗体。
27. CHO細胞で產生される請求項15の抗体。
28. 結合する細胞の死を誘導する請求項15の抗体。 10
29. 検出可能に標識されている請求項15の抗体。
30. 請求項15の抗体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離された核酸。
31. ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列と作用可能に結合している、請求項30の核酸を含んでなる発現ベクター。
32. 請求項31の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。
33. CHO細胞、大腸菌又は酵母細胞である、請求項32の宿主細胞。
34. 前記抗体の発現に適した条件下で請求項32の宿主細胞を培養すること及び細胞培養から前記抗体を回収することを含んでなる、抗体を生成する工程。

【0018】

20

35. (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；
 (b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；
 (d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの； 30
 (e) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；
 (f) 図1(配列番号:1)、図2(配列番号:2)、図3(配列番号:3)、図4(配列番号:4)、又は図5(配列番号:5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は
 (g) 表7に示す任意のATCCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドと結合する単離されたオリゴペプチド。 40
36. (a) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列；
 (b) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；
 (c) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；
 (d) 図6(配列番号:6)、図7(配列番号:7)、図8(配列番号:8)、図9(配列番号:9)、又は図10(配列番号:10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのア 50

ミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドと結合する請求項35のオリゴペプチド。

10

37. 成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項35のオリゴペプチド。

38. 細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項35のオリゴペプチド。

39. 細胞毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項38のオリゴペプチド。

40. 細胞毒性剤が毒素である請求項38のオリゴペプチド。

41. 毒素がメイタンシノイド及びカリチエアミシンからなる群より選択される、請求項40のオリゴペプチド。

42. 毒素がメイタンシノイドである請求項40のオリゴペプチド。

43. 結合する細胞の死を誘導する請求項35のオリゴペプチド。

44. 検出可能に標識されている請求項35のオリゴペプチド。

20

45. (a) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列；

(b) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

30

(e) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドと結合するTAT結合有機分子。

40

46. (a) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列；

(b) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを有するもの；

(d) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すポリペプチドの細胞外ドメインのア

50

ミノ酸配列で、その結合するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列；

(f) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)、又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列；又は

(g) 表7に示す任意のATCC寄託番号で寄託されたcDNAの完全長コード化配列によってコードされているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドと結合する請求項45の有機分子。

10

47. 成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項45の有機分子。

48. 細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項45の有機分子。

49. 細胞毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項48の有機分子。

50. 細胞毒性剤が毒素である請求項48の有機分子。

51. 毒素がメイタンシノイド及びカリチエアミシンからなる群より選択される、請求項50の有機分子。

52. 毒素がメイタンシノイドである請求項50の有機分子。

53. 結合する細胞の死を誘導する請求項45の有機分子。

54. 検出可能に標識されている請求項45の有機分子。

20

55. 担体と組み合わせて、

(a) 請求項11のポリペプチド；

(b) 請求項13のキメラポリペプチド；

(c) 請求項15の抗体；

(d) 請求項35のオリゴペプチド；又は

(e) 請求項45のTAT結合有機分子

を含んでなる組成物。

56. 前記担体が薬学的に許容可能な担体である、請求項55の組成物。

57. (a) 容器；及び

(b) 前記容器に含まれる請求項55の組成物である製造品。

30

58. 癌の治療上の処置又は診断による検出に関する前記組成物の用途に言及している、前記容器に添付されている標識、又は前記容器に包含されている添付文書をさらに含んでなる、請求項57の製造品。

【0019】

59. (a) 図6(配列番号：6)、図7(配列番号：7)、図8(配列番号：8)、図9(配列番号：9)、又は図10(配列番号：10)に示すアミノ酸配列；又は

(b) 図1(配列番号：1)、図2(配列番号：2)、図3(配列番号：3)、図4(配列番号：4)又は図5(配列番号：5)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも80%アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを発現する癌細胞を死滅させる方法であって、前記癌細胞を前記癌細胞上の前記ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子と接触させ、それによって前記癌細胞を死滅させることを含んでなる方法。

60. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項59の方法。

61. 前記抗体が抗体断片である請求項59の方法。

62. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である請求項59の方法。

63. 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項59の方法。

64. 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項59の方法。

65. 前記細胞毒性剤が毒素、抗体、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より

40

50

選択される、請求項 6 4 の方法。

6 6 . 細胞毒性剤が毒素である請求項 6 4 の方法。

6 7 . 毒素がメイタンシノイド及びカリチェアミシンからなる群より選択される、請求項 6 6 の方法。

6 8 . 毒素がメイタンシノイドである請求項 6 6 の方法。

6 9 . 前記抗体を細菌で產生する請求項 5 9 の方法。

7 0 . 前記抗体を C H O 細胞で產生する請求項 5 9 の方法。

7 1 . 前記癌細胞をさらに放射線療法又は化学療法剤に曝す、請求項 5 9 の方法。

7 2 . 前記癌細胞が乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頸癌細胞、メラノーマ細胞及び白血病細胞からなる群より選択される、請求項 5 9 の方法。 10

7 3 . 同じ組織起源の正常細胞と比較して、前記癌細胞が前記ポリペプチドを過剰発現する、請求項 5 9 の方法。

7 4 . (a) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 1 0 (配列番号 : 1 0)に示すアミノ酸配列；又は (b) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)又は図 5 (配列番号 : 5)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを発現する細胞を含んでなる腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、前記哺乳動物へ前記ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子の治療的有効量を投与すること、それによって効果的に前記哺乳動物を治療することを含んでなる方法。 20

7 5 . 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 7 4 の方法。

7 6 . 前記抗体が抗体断片である請求項 7 4 の方法。

7 7 . 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である請求項 7 4 の方法。

7 8 . 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が成長阻害剤とコンジュゲートしている請求項 7 4 の方法。

7 9 . 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が細胞毒性剤とコンジュゲートしている請求項 7 4 の方法。

8 0 . 前記細胞毒性剤が毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項 7 9 の方法。 30

8 1 . 細胞毒性剤が毒素である請求項 7 9 の方法。

8 2 . 毒素がメイタンシノイド及びカリチェアミシンからなる群より選択される、請求項 8 1 の方法。

8 3 . 毒素がメイタンシノイドである請求項 8 1 の方法。

8 4 . 前記抗体を細菌で產生する請求項 7 4 の方法。

8 5 . 前記抗体を C H O 細胞で產生する請求項 7 4 の方法。

8 6 . 前記腫瘍をさらに放射線治療又は化学療法剤へ曝す、請求項 7 4 の方法。

8 7 . 前記腫瘍が乳腫瘍、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、中枢神経系腫瘍、肝臓腫瘍、膀胱腫瘍、膵臓腫瘍、又は子宮頸腫瘍である、請求項 7 4 の方法。 40

8 8 . (a) 図 6 (配列番号 : 6)、図 7 (配列番号 : 7)、図 8 (配列番号 : 8)、図 9 (配列番号 : 9)、又は図 1 0 (配列番号 : 1 0)に示すアミノ酸配列；又は (b) 図 1 (配列番号 : 1)、図 2 (配列番号 : 2)、図 3 (配列番号 : 3)、図 4 (配列番号 : 4)又は図 5 (配列番号 : 5)に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含有すると思われる試料中に前記ポリペプチドの存在を確かめる方法であって、前記試料を前記ポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子に曝し、前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の前記試料中の前記ポリペプチドとの結合を確かめることを含んで成る方法。

8 9 . 前記試料が前記ポリペプチドを発現すると思われる細胞を含む、請求項 8 8 の方 50

法。

90 . 前記細胞が癌細胞である請求項 89 の方法。

91 . 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子を検出可能に標識する請求項 88 の方法。

92 . 哺乳動物での腫瘍の存在を診断する方法であって、哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び同じ組織起源の既知の正常細胞であるコントロール試料中で、(a) 図 6 (配列番号: 6)、図 7 (配列番号: 7)、図 8 (配列番号: 8)、図 9 (配列番号: 9)、又は図 10 (配列番号: 10) に示すアミノ酸配列; 又は

(b) 図 1 (配列番号: 1)、図 2 (配列番号: 2)、図 3 (配列番号: 3)、図 4 (配列番号: 4) 又は図 5 (配列番号: 5) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 80% アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料での前記ポリペプチドの高レベルの発現が試験試料を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。
10

93 . 前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出する段階が、インサイツハイブリダイゼーション又は RT - PCR 分析でオリゴヌクレオチドを用いることを含む、請求項 92 の方法。

94 . 前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出する段階が、免疫組織化学分析で抗体を用いることを含む、請求項 92 の方法。

95 . 哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と (a) 図 6 (配列番号: 6)、図 7 (配列番号: 7)、図 8 (配列番号: 8)、図 9 (配列番号: 9)、又は図 10 (配列番号: 10) に示すアミノ酸配列; 又は (b) 図 1 (配列番号: 1)、図 2 (配列番号: 2)、図 3 (配列番号: 3)、図 4 (配列番号: 4) 又は図 5 (配列番号: 5) に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 80% アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドと結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子を接触させ、試験試料中の前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子と前記ポリペプチド間の複合体の形成を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。
20

96 . 前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子を検出可能に標識する請求項 95 の方法。

97 . 組織細胞の前記試験試料を癌性腫瘍を有すると思われる個体から得る、請求項 95 の方法。
30

本発明のさらなる実施態様は、本明細書を読むことで熟練者にとって明らかとなる。

【0020】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

I . 定義

ここで使用される際の「TAT ポリペプチド」及び「TAT」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号(例えば、TAT / 数字)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。用語「数字」が、ここで実際の数字の記号表示として提供されている、「TAT / 数字 ポリペプチド」及び「TAT / 数字」には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片(ここでさらに定義される)を含む。ここに記載されている TAT ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。「TAT ポリペプチド」という用語は、ここに記載の各個々の TAT / 数字 ポリペプチドを指す。「TAT ポリペプチド」を指すこの明細書のすべての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時にまとめて指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、TAT 結合オリゴペプチドの形成、TAT 結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドごとに関している。「TAT ポリペプチド」という用語は、また、ここに記載の TAT / 数字 ポリペプチドの変異体を含む。
40
50

【0021】

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

10

【0022】

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

20

【0023】

ここに開示する種々のTATポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は添付の図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる（例えば、Nielsen, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997) 及び von Heijne, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

30

【0024】

「TATポリペプチド変異体」とはTATポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠くTATポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しないTATポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長TATポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性TATポリペプチドを意味する。このようなTATポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたTATポリペプチドが含まれる。通

40

50

常、TATポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列TATポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くTATポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するTATポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長TATポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、TAT変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20，30，40，50，60，70，80，90，100，110，120，130，140，150，160，170，180，190，200，210，220，230，240，250，260，270，280，290，300，310，320，330，340，350，360，370，380，390，400，410，420，430，440，450，460，470，480，490，500，510，520，530，540，550，560，570，580，590，600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、TAT変異体ポリペプチドは、天然TATポリペプチド配列に比較してたった1つの保存的アミノ酸置換、あるいは天然TATポリペプチド配列に比較して2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の保存的アミノ酸置換にすぎない。

【0025】

ここで同定したTATポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のTATポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0026】

アミノ酸配列比較のために用いるALIGN-2の状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として

10

20

30

40

50

、「TAT」が対象となる仮説的TATポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となるTATポリペプチドが比較されているアミノ酸配列を表し、そして「X」、「Y」及び「Z」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「TAT」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここで使用する全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2比較コンピュータプログラムを用いた即前出のパラグラフに記載のようにして得られる。

【0027】

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

【0028】

通常、TAT変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21，22，23，24，25，26，27，28，29，30，35，40，45，50，55，60，65，70，75，80，85，90，95，100，105，110，115，120，125，130，135，140，145，150，155，160，165，170，175，180，185，190，195，200，210，220，230，240，250，260，270，280，290，300，310，320，330，340，350，360，370，380，390，400，410，420，430，440，450，460，470，480，490，500，510，520，530，540，550，560，570，580，590，600，610，620，630，640，650，660，670，680，690，700，710，720，730，740，750，760，770，780，790，800，810，820，830，840，850，860，870，880，890，900，910，920，930，940，950，960，970，980，990，又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

【0029】

ここで同定されるTATコード化核酸配列に対する「パーセント（%）核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、TAT核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供

10

20

30

40

50

されている配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用することによって得られる。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントン D . C . , 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 の下で登録されている。A L I G N - 2 はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N - 2 プログラムは、U N I X (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタル U N I X (登録商標) V 4 . 0 D での使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、A L I G N - 2 プログラムによって設定され変動しない。

10

【 0 0 3 0 】

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

分率 W / Z の 1 0 0 倍

ここで、W は配列アラインメントプログラム A L I G N - 2 の C 及び D のアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、Z は D の全ヌクレオチドである。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さと異なる場合、C の D に対する % 核酸配列同一性は、D の C に対する % 核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。% 核酸配列同一性の計算の例として、「T A T - D N A 」が対象となる仮説的 T A T コード化核酸配列を表し、「比較 D N A 」が対象となる「T A T - D N A 」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮説的ヌクレオチドを表していて、表 4 及び 5 が「比較 D N A 」と称される核酸配列の「T A T - D N A 」と称される核酸配列に対する % 核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての % 核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示したように A L I G N - 2 コンピュータプログラムを用いて得られる。

20

【 0 0 3 1 】

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

30

ここで開示する種々の T A T ポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定及び分離及び / 又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシーカエネーターを使用することにより、少なくとも 1 5 残基の N 末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(2)クーマシープルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での S D S - P A G E による均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、T A T ポリペプチドの自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

40

【 0 0 3 2 】

「単離された」 T A T ポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも 1 つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドを

50

コードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

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

【0033】

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

10

20

30

【0034】

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

40

【0035】

ここで定義される「ストリンジエントな条件」又は「高度のストリンジエンシー条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、次いで55におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジエンシー洗浄を用いるものによって同定される。

40

【0036】

「中程度のストリンジエント条件」は、Sambrookら、Molecular Cl

50

onitoring: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているように同定され、上記のストリンジエントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び% SDS）の使用を含む。中程度のストリンジエント条件は、20% ホルムアミド、5 × SSC (150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 × デンハード液、10% デキストラント硫酸、及び 20 mg / mL の変性剪断サケ精子DNA を含む溶液中の 37° での終夜インキュベーション、次いで 1 × SSC 中 37 - 50° でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

10

【0037】

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

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

20

【0038】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然 TAT ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。同じように、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然 TAT ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然 TAT ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子等が含まれる。TAT ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、TAT ポリペプチドと候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子を接触させ、そして通常は TAT ポリペプチドに関連している一つ又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

30

【0039】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え（小さく）させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患にすでに罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗 TAT 抗体、TAT 結合オリゴペプチド又は TAT 結合有機分子の治療量を投与された後に、患者が次の一つ又は複数のものについて観察可能な及び / 又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、TAT ポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；及び / 又は特定の癌に関連している一つ又は複数の症状のある程度の緩和；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗 TAT 抗体又は TAT 結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び / 又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び / 又は細胞毒性であり得る。これ

40

50

らの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【0040】

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

【0041】

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

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

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

1つ又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0042】

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

【0043】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばTATポリペプチド、それらに対する抗体

10

20

30

40

50

又は T A T 結合オリゴペプチド)輸送に有用な、脂質、リン脂質及び / 又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した 2 層構造に配列される。

【 0 0 4 4 】

ここで定義されている「小」分子又は「小」有機分子とは、約 5 0 0 ダルトン未満の分子量である。

ここに開示するポリペプチド又は抗体、T A T 結合オリゴペプチド、T A T 結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に決まった目的をおこなうために十分な量のことである。「有効量」は、決まった目的に関連して、経験的及び日常的手段で決めてよい。

「治療的有効量」という用語は、被検体又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、T A T 結合オリゴペプチド、T A T 結合有機分子又は他の薬の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害(すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止)し；腫瘍転移を阻害(すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止)し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び / 又は癌に関連する一つ又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。ある程度、薬は、存在する癌細胞の成長を妨げ及び / 又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び / 又は細胞毒性であり得る。

【 0 0 4 5 】

抗 T A T 抗体、T A T ポリペプチド、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子の「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗 T A T 抗体、T A T ポリペプチド、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子の「成長阻害量」は、経験的及び日常的手法によって決定できる。

抗 T A T 抗体、T A T ポリペプチド、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子の「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗 T A T 抗体、T A T ポリペプチド、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子の「細胞毒性量」は、経験的及び日常的手法によって決定できる。

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

【 0 0 4 6 】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(L o w r y)法によって決定した場合 9 5 重量 % 以上の、最も好ましくは 9 9 重量 % 以上の抗体まで、(2)スピニングカップシーケンサーを使用することにより、少なくとも 1 5 の N 末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下での S D S - P A G E による均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【 0 0 4 7 】

基本 4 - 鎮抗体ユニットは 2 つの同一の軽(L)鎖と 2 つの同一の重(H)鎖から構成さ

10

20

30

40

50

れるヘテロ四量体の糖タンパクである（IgM抗体は、塩基性ヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、塩基性4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である）。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて1つ又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、¹⁰ 及び 鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン（C_H）が、μ及び アイソタイプに対しては4つのC_Hドメインが続く可変ドメイン（V_H）をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン（C_L）が続く可変ドメイン（V_L）をN末端に有する。V_LはV_Hと整列し、C_Lは重鎖の第一定常ドメイン（C_H1）と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。V_LとV_Hは共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

【0048】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン（C_H）のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ 、 、 、 、及びμと呼ばれる重鎖を有する。さらに 及び のクラスは、C_H配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

【0049】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな - シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 - シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害（ADCC）における抗体の寄与を示す。

【0050】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基（すなわち、V_Lにおいては、およそ残基24-34（L1）、50-56（L2）及び89-97（L3）、及びV_Hにおいては、およそ1-35（H1）、50-65（H2）及び95-102（H3）；Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 Ed. Pub

10

20

30

40

50

lic Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 及び / 又は「高度可変ループ」からの残基 (すなわち、 V_L においては、およそ残基 26 - 32 (L_1) 、 50 - 52 (L_2) 及び 91 - 96 (L_3) 、及び V_H においては、およそ 26 - 32 (H_1) 、 53 - 55 (H_2) 及び 96 - 101 (H_3) ; Chothia 及び Lesk J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)) を含んでなる。

【0051】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基 (エピトープ) に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初に Kohler ら, Nature 256, 495 (1975) により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換え DNA 法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる (例えば、米国特許第 4,816,567 号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えば Clackson ら, Nature 352: 624 - 628 (1991) 、及び Marks ほか, J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1991) に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

【0052】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び / 又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む (米国特許第 4,816,567 号; 及び Morrison ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851 - 6855 (1984))。ここで関心あるキメラ抗体には、非ヒト靈長類 (例えば旧世界ザル、Ape (ヒトニザル) 等) から由来する可変ドメイン抗原 - 結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズした (primatized)」抗体を含む。

【0053】

「無傷」の抗体は、抗原 - 結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 C_H 1、 C_H 2 及び C_H 3 を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン (例えば、ヒト天然配列定常ドメイン) 又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は 1 つ又は複数のエフェクター機能を有する。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及び Fv 断片；ダイアボディ (diabodies)；直鎖状抗体 (米国特許第 5,641,870 号、実施例 2； Zapata ら, Protein Eng. 8(10): 1057 - 1062 [1995])；单鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0054】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる 2 つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を产生する。Fab 断片は全長 L 鎖と H 鎖の可変領域ドメイン (V_H) 、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン (C_H 1) からなる。各 Fab 断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原 - 結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $F(ab')_2$ 断片が生じ、これは 2 価の抗原結合部位を持つ 2 つのジスルフィド結合された Fab 断片にほぼ対応し、抗原

10

20

30

40

50

を交差結合させることができるものである。F_{a b'}断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖C_H1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりF_{a b'}断片と相違する。F_{a b'}-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つF_{a b'}を表す。F(a b')₂抗体断片は、通常はF_{a b'}断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0055】

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

10

「F_v」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるF_vの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0056】

「sF_v」又は「scF_v」とも略称される「单鎖F_v」は、単一のポリペプチド鎖内に結合したV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sF_vポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンクーをさらに含み、それはsF_vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sF_vの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

20

「ダイアボディ(dia bodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V_HとV_Lドメインとの間に、短いリンクー(約5-10残基)を持つsF_v断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sF_v断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧洲特許第404,097号；国際公開93/11161号；及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

30

【0057】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329 (1988); 及

40

50

び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992) を参照のこと。

【0058】

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

「TAT 結合オリゴペプチド」はここで記載される様な TAT ポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。TAT 結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。TAT 結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約 5 のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 又は 100 のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様な TAT ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。TAT 結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブライアリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第 5556762 号、同第 5750373 号、同第 4708871 号、同第 4833092 号、同第 5223409 号、同第 5403484 号、同第 5571689 号、同第 5663143 号；PCT 公開第 WO 84/03506 号、及び WO 84/03564 号；Geyserら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geyserら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geyserら, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geyserら, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofsら, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Jackson, T.ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.ら (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及び Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668 参照）。

【0059】

「TAT 結合有機分子」とは、ここに記載されるような TAT ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。TAT 結合有機分子は既知の方法（例えば PCT 公開第 WO 00/00823 号及び WO 00/39585 号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。TAT 結合

10

20

30

40

50

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

対象である抗原と「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的化する診断及び／又は治療薬として有用であり、他のタンパク質と際だって交差しないように、その抗原と十分な親和性で結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器（FACS）分析又は放射免疫沈降（RIA）によって確かめられたように、特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合の約10%よりも低い。特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープと「特異的に結合」、又はそれに対して「特異的な」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、他のどんなポリペプチド又はポリペプチドエピトープとも実質的に結合せずに、その特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープと結合するものである。

【0060】

「TATポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なTATポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。TATポリペプチドは、癌細胞の表面上に発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞によって產生され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい成長阻害抗TAT抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、20%よりも多く、好ましくは約20%から約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でTAT発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30μg/m1又は約0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約1μg/kgから約100mg/kg体重の抗TAT抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はin vivoで成長阻害性である。

【0061】

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

【0062】

10

20

30

40

50

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

【0063】

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

R IIIのみを発現するのに対し、単球はFc RI、Fc RII及びFc RIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991) の464頁の表3に要約されている。関心ある分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5,500,362号又は同5,821,337号に記載されているようなインビトロADCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液单核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー細胞（NK細胞）が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、関心ある分子のADCC活性は、例えば、Clynesら, (USA) 95: 652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【0064】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、Fc RI、Fc RII及びFc RIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。Fc RIIレセプターには、Fc RIIA（「活性型レセプター」）及びFc RIIB（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFc RIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプタ活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif；ITAM）を含んでいる。阻害型レセプターFc RIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプタ阻害性モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif；ITIM）を含んでいる（Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997) を参照）。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); 及びde Haasら, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995) に概説されている。他のFcRs、ここでは、将来的に同定されるものも含めて、「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRn (Guyerら, J. Immunol. 117: 587 (1976); Kimら, J. Immunol. 24: 249 (1994)) も含まれる。

【0065】

「ヒトエフェクター細胞」とは、1つ又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFc RIIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液单核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞毒性T細

10

20

30

40

50

胞及び好中球が含まれるが、P B M C s とN K 細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

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

【0066】

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

10

20

30

40

50

【0067】

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

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

【0068】

「T A T 発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたT A T ポリペプチドを発現する。「T A T 発現癌」は、細胞表面上に存在するT A T ポリペプチドを有する、又はT A T ポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「T A T 発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのT A T ポリペプチドを生成し、抗T A T 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的效果を有する。他の実施態様では、任意には「T A T 発現癌」は、抗T A T 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのT A T ポリペプチドを產生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌T A T ポリペプチドの產生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。T A T ポリペプチド

を「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのTATポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。TATポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるTATタンパク質の増大したレベルを評価することによって確かめ得る（例えば、TATポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えDNA技術を用いて調製することができる単離されたTATポリペプチドに対して調製した抗TAT抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；FACS分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、TATコード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイトハイブリダイゼーション；（FISH；1998年10月に公開の国際公開98/45479を参照せよ）、サザンプロットティング、ノーザンプロットティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、例えばリアルタイム定量PCR（RT-PCR）を介して、細胞のTATポリペプチドコード化核酸又はmRNAのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、TATポリペプチド過剰発現を研究してもよい（同じく、例えば、1990年6月12日に公開の米国特許第4,933,294号；1991年4月18日に公開の国際公開91/05264；1995年3月28日に公開の米国特許第5,401,638号；Siasら、J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ）。上記のアッセイは別として、種々のインビオアッセイは、熟練技術者にとって入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。
10
20

【0069】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。
30

【0070】

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。
40

【0071】

ここで用いられる「細胞毒性薬」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位元素）、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド類（ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞毒性薬が下記に記載
50

されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起す。

【0072】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にTAT発現癌細胞の成長をインビトロ又はインビボのいずれかで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S期でTAT発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期プロッカーは、ビンカス(ビンクリスチン及びビンプラスチン)、タキソール、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフエン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakamiら, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。タキサン(パクリタキセル及びドセタキセル)は、ともにイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローヌ・プーランローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル・マイヤースクウェイブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【0073】

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

【0074】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

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

(0 0 7 6)

表1

表1(続)

```

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

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

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DIN S0      8       /* penalty for a gap */
#define DIN S1      1       /* penalty per base */
#define PIN S0      8       /* penalty for a gap */
#define PIN S1      4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short           n[MAXJMP];   /* size of jmp (neg for delay) */
    unsigned short  x[MAXJMP];   /* base no. of jmp in seq x */
};

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続)

```

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

```

```
#include "nw.h"
#include "day.h"
```

```

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

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

```

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

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

    nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();           /* get the actual jmps */
    print();              /* print stats, alignment */

    cleanup(0);           /* unlink any tmp files */
}
```

main

20

30

表1(続)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register  id;               /* diagonal index */
    register  ij;               /* jmp index */
    register  *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;           /* index into seqs */

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

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

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

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

```

表1(続)

...NW

```

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続)

```

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

(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

表1(続)

```

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

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

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

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

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

```

10

print

20

30

40

表1(続)

```

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

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

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

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

```

表1(続)

```

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

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

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

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

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

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

```

表1(続)

```

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

        more++;

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

        /*
         * are we at next gap for this seq?
         */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * we need to merge all gaps
             * at this location
             */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }

    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

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

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

```

表1(続)

表1(続)

```

...putline
int          i;
register char *px;

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

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

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

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

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dma && day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '.';
        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

```

stars 10 20 30

表1(続)

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

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

stripname 10
```

表1(続)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */

#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

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

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

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

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

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

```

表1(続)

```

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

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

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

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

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                         30
{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, i1;
    register int i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}
40

```

表1(続)

...readjmps

```

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

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

```

表1(続)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
    int      ix;
{
    char    *mktemp0;

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

```

10

【 0 0 7 7 】

表 2

20

| | | |
|---------|----------------|----------------|
| TAT | XXXXXXXXXXXXXX | (長さ = 15 アミノ酸) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYY | (長さ = 12 アミノ酸) |

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数) ÷ (TAT ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

30

$$5 \div 15 = 33.3\%$$

【 0 0 7 8 】

表 3

| | | |
|---------|-----------------|----------------|
| TAT | XXXXXXXXXX | (長さ = 10 アミノ酸) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYYZZY | (長さ = 15 アミノ酸) |

% アミノ酸配列同一性 =

40

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数) ÷ (TAT ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

$$5 \div 10 = 50\%$$

【 0 0 7 9 】

表 4

| | | |
|---------|----------------|------------------|
| TAT-DNA | NNNNNNNNNNNNNN | (長さ = 14 ヌクレオチド) |
| 比較 DNA | NNNNNNNLLLLLLL | (長さ = 16 ヌクレオチド) |

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数) ÷ (TAT-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

【 0 0 8 0 】

表 5

| | | |
|---------|--------------|------------------|
| TAT-DNA | NNNNNNNNNNNN | (長さ = 12 ヌクレオチド) |
| 比較 DNA | NNNNNLLLVV | (長さ = 9 ヌクレオチド) |

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数) ÷ (TAT-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

【 0 0 8 1 】

I I . 本発明の組成物及び方法

A . 抗 T A T 抗体

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

【 0 0 8 2 】

1 . ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下 (s c) 又は腹腔内 (i p) 注射することにより、動物に產生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介する抱合）、N - ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する抱合）、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、S O C l ₂ 、又は R 及び R ¹ が異なるアルキル基である R ¹ N = C = N R を用いて結合させることができる。

10

20

30

40

50

【0083】

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

10

【0084】

2. モノクローナル抗体

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

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化した後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁（Academic Press, 1986））。

20

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞（融合のパートナーとも呼ばれる）の増殖または生存を阻害する1つ又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHprt）を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジンを含有するであろう（HAT培地）。

30

【0085】

好ましい融合のパートナーである骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、（Marcel Dekker, Inc., New York, 1987））。

40

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

【0086】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munsonら、Anal. Bioc 50

hem., 107:220 (1980) のスキヤッチャード分析によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び / 又は活性の抗体を產生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローニングを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59 - 103 頁 (Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM 又は RPMI-1640 培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビポで増殖させることができる。10

サブクローニングにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー (例えばプロテイン A 又はプロテイン G - セファロースを用いる) 又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な免疫グロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

【0087】

モノクローナル抗体をコードする DNA は、常法を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより) 即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNA を発現ベクターに入れ、ついでこれを、この状況以外では免疫グロブリンタンパク質を產生しない大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードする DNA の細菌での組み換え発見に関する概説論文には、Skerraら, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) 及び Pluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992) が含まれる。20

【0088】

更なる実施態様では、抗体又は抗体フラグメントは、McCaffertyら, Nature, 348:552-554 (1990) に記載された技術を使用して產生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clacksonら, Nature, 352:624-628 (1991) 及び Marksら, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性 (nM 範囲) のヒト抗体の生成 (Marksら, Bio/Technology, 10:779-783 [1992])、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビポ組換え (Waterhouseら, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 [1993]) を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。30

【0089】

抗体をコードする DNA は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン (C_H 及び C_L) の化配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって (米国特許第 4,816,567 号; Morrisonら, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 (1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド (異種ポリペプチド) のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する 1 つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体40

を作り出す。

【0090】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-TAT抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む [Jonesら, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-329 (1988); 及び Presta, *Curr. Op Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)]。 10

【0091】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター（Winter）及び共同研究者 [Jonesら, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。 30

【0092】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びHAMMA反応（ヒト抗-マウス抗体）を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク（FR）をヒト化抗体のために受け入れる（Simsほか, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothiaら, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)）。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる（Carterほか, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Prestaほか, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)）。 40

。

【0093】

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列 50

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

【0094】

10

ヒト化抗 T A T 抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて1つ又は複数の細胞傷害剤（類）と結合していてもよい抗体断片、例えば F a b であってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷 I g G 1 抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの產生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体產生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の產生がおこる。 Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovitsら, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemanら, Year in Immuno., 7: 33 (1993); 米国特許第5,545,806号、同5,569,825号、同5,591,669号（全てジエンファーム（GenPharm））；同5,545,807号；及び国際公開第97/17852号を参照されたい。

20

【0095】

30

別法として、ファージディスプレイ技術（McCaffertyら, Nature 348: 552-553 [1990]）を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、纖維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。纖維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993) を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clacksonら, Nature, 352: 624-628 (1991) は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリから、多様で多くの抗-Oキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原（自己抗原を含む）に対する抗体は、Marksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)、又はGriffithら, EMBO J. 12: 725-734 (1993) に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5,565,332号及び同5,573,905号を参照のこと。

40

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により產生することができる

50

(米国特許第5,567,610号及び同5,229,275号)。

【0096】

4. 抗体断片

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

抗体断片を产生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) 及び Brennanら, Science, 229:81 [1985] を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接產生することができる。Fab、Fv及びscFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の产生が容易となつた。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライプラリから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてFab(ab')₂断片を形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167 [1992])。他のアプローチ法では、Fab(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むFab及びFab(ab')₂が、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は单鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185号；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照のこと。Fv及びscFvは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は单一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0097】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、TATタンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのようない抗体では他のタンパク質に対する結合部位とTAT結合部位とが結合しうる。あるいは、抗TATアームは、TAT-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)及びFc

R III (CD16)等のIgG(Fc R)に対するFcレセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばCD3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はTATを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はTAT結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-、ピンカアルカリオイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばFab(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

【0098】

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗-ErbB2/抗-Fc RIII抗体が記載されており、米国特許第5,837,234号には、二重特異性抗-ErbB2/抗-Fc RI抗体が開示されている。二重特異性抗-ErbB2/Fc抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5,821,337号は、二重特

10

20

30

40

50

異性抗-ErbB2 / 抗-CD3抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な产生は二つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている (Millssteinら, *Nature*, 305: 537 - 539 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を产生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティーカロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTraunekerら、EMBO J. 10: 3655 - 3659 (1991)に開示されている。

10

【0099】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原 - 抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、 C_H 2及び C_H 3領域を含むIg重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H 1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

20

【0100】

この手法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることができた。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を產生する更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)を参照されたい。米国特許第5,731,168号に記載された他の手法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は C_H 3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの1つ又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

30

【0101】

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビシンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4,676,980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

40

50

抗体断片から二重特異性抗体を產生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(ab') 断片を產生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。產生された $F(ab') 断片はついでチオニトロベンゾアート (TNB) 誘導体に変換される。 $F(ab')_2$ - TNB 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $F(ab')_2$ - チオールに再変換し、他の $F(ab')_2$ - TNB 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。$$

10

【0102】

最近の進歩により、大腸菌からの $F(ab')_2$ - SH 断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Expt. Med., 175:217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の製造を記述している。各 $F(ab') 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及び ErbB2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。$

20

【0103】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelnýら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos 及び Jun タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $F(ab') 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の 2 つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより V_L に V_H を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、よって 2 つの抗原結合部位を形成する。単鎖 Fv (sFv) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994) を参照されたい。$

30

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

【0104】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2 つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第 4,676,980 号] 及び HIV 感染の治療のために [国際公開第 91/00360; 国際公開第 92/200373; 欧州特許第 03089号] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第 4,676,980 号に開示されたものが含まれる。

40

【0105】

50

7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション（及び／又は異化）されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体（IgMクラス以外のもの）であり得（例えば四価抗体）、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する（又はそれらからなる）。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する（又はそれらからなる）。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖（好ましくは2つのポリペプチド鎖）を有し、ポリペプチド鎖（類）は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖（類）はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖（類）は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ（好ましくは4つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインをさらに有する。

【0106】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞毒性（ADCC）及び／又は補体依存細胞毒性（CDC）を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞毒性（ADCC）を有する可能性がある。Caronら、J. Expt. Med. 176: 1191-1195 (1992) 及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolffら、Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。

【0107】

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載のように、抗体（特に抗体断片）へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄）のFc領域のエピトープを意味する。

【0108】

9. 免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞毒性剤、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑

膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthrin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcumin)、クロチン(crotonin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaponaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトグリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricotecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reが含まれる。
10

【0109】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(ITT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHC L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vittetta, Science 238: 1098(1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。
20

抗体のコンジュゲートと1つ又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0110】

30

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗TAT抗体(完全長又は断片)は1つ又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3,896,111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4,151,042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号;同4,248,870号;同4,256,746号;同4,260,608号;同4,265,814号;同4,294,757号;同4,307,016号;同4,308,268号;同4,308,269号;同4,309,428号;同4,313,946号;同4,315,929号;同4,317,821号;同4,322,348号;同4,331,598号;同4,361,650号;同4,364,866号;同4,424,219号;同4,450,254号;同4,362,663号;及び同4,371,533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。
40

【0111】

40

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲー
50

ト及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618 - 8623 (1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Charil, Cancer Research, 52: 127 - 131 (1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1 - メイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7 - メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞毒性を示した。

【0112】

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

例えば、米国特許第5,208,020号又は欧州特許第0425235B1号、及びCharil, Cancer Research, 52: 127 - 131 (1992)に開示されているもの等を含む、抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0113】

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

リジルジチオ) プロピオナート (S P D P) (Carls s o n ら, Biochem. J. 173: 723 - 737 [1978]) が含まれる。

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

【0114】

カリケアマイシン

関心ある他の免疫コンジュゲートには、1つ又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗 T A T 抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ・ピコモルの濃度で二重ストランド D N A 破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第 5,712,374 号、同 5,714,586 号、同 5,739,116 号、同 5,767,285 号、同 5,770,701 号、同 5,770,710 号、同 5,773,001 号、同 5,877,296 号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、₁^I、₂^I、₃^I、N-アセチル-₁^I、PSAG 及び₁^I(Hinman ら, Cancer Research, 53: 3336 - 3342 (1993)、Lode ら. Cancer Research, 58: 2925 - 2928 (1998) 及び上述した American Cyanamid の米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬である Q F A である。カリケアマイシン及び Q F A は双方とも、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0115】

他の細胞障害剤

本発明の抗 T A T 抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、B C N U、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び 5 - フルオロウラシル、米国特許第 5,053,394 号、同 5,770,710 号に記載されており、集合的に L L - E 33288 複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン (esperamicine) (米国特許第 5,877,296 号) が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリア A 鎮、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素 A 鎮 (シュードモナス・アエルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa))、リシン A 鎮、アブリン A 鎮、モデシン (modecin) A 鎮、アルファ - サルシン (sarcin)、アレウライツ・フォルディイ (Aleurites fordii) プロテイン、ジアンシン (dianthin) プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ (Phytolaca americana) プロテイン (PAP I、PAPII 及び PAP-S)、モモルディカ・キャランティア (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curcain)、クロチン、サバオナリア (sapoanaria) オフィシナリスインヒビター、ゲロンイン (gelonin)、マイトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス (tricothecene) が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第 93 / 21232 号を参照のこと。

本発明は、抗体と核分解活性 (nucleolytic activity) を有する化合物 (例えばリボヌクレアーゼ又は D N A エンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; D N A エーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【0116】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コ

10

20

30

40

50

ンジュゲートした抗TAT抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 $A_{t}^{2\ 1\ 1}$ 、 $I^{1\ 3\ 1}$ 、 $I^{1\ 2\ 5}$ 、 $Y^{9\ 0}$ 、 $R_e^{1\ 8\ 6}$ 、 $R_e^{1\ 8\ 8}$ 、 $S_m^{1\ 5\ 3}$ 、 $B_i^{2\ 1\ 2}$ 、 $P^{3\ 2}$ 、 $P_b^{2\ 1\ 2}$ 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば $t_c^{9\ m}$ 又は $I^{1\ 2\ 3}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $t_c^{9\ m}$ 又は $I^{1\ 2\ 3}$ 、 $R_e^{1\ 8\ 6}$ 、 $R_e^{1\ 8\ 8}$ 及び $I_n^{1\ 1\ 1}$ は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Frakerら(1978)Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0117】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスマジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチターゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chariら, Cancer Research, 52:127-131(1992);米国特許第5,208,020号)。

別法として、抗TAT抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

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

【0118】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗TAT抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤

10

20

30

40

50

を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Wangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び同4,544,545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

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

【0119】

B. TAT結合オリゴペプチド

本発明のTAT結合オリゴペプチドはここで記載される様なTATポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。TAT結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び生成することができる。TAT結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なTATポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。TAT結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブライアリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号; Geyserenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geyserenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geyserenら, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geyserenら, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofら, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirila, S.E.ら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.ら(1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら(1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.ら(1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.ら(1991) Proc. Natl. Acad. Sc 40

i. U.S.A., 88:8363、及び Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668 参照)。

この点において、バクテリオファージ(ファージ)ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である (Scott, J.K. 及び Smith G.P. (1990) Science 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体(又はランダムクローン cDNA)の大きなライブラリーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド (Cwirla, S.E. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) 又はタンパク質 (Lowman, H.B. ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D. ら (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) ライブラリーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている (Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第 5223409 号、同第 5403484 号、同第 5571689 号、及び同第 5663143 号。

【0120】

ほとんどのファージディスプレイ法は纖維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム (WO 95/34683; 米国特許第 5627024 号)、T4 ファージディスプレイシステム (Ren, Z-J. ら (1998) Gene 215:439; Zhu, Z. (1997) CAN 33:534; Jiang, J. ら (1997) can 128:44380; Ren, Z-J. ら (1997) CAN 127:215644; Ren, Z-J. (1996) Protein Sci. 5:1833; Efimov, V.P. ら (1995) Virus Genes 10:173) 及び T7 ファージディスプレイシステム (Smith, G.P. 及び Scott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257; 米国特許第 5766905 号) も知られている。

現在、基礎的なファージディスプレイ構造の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり (WO 98/14277) 及びファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用 (WO 98/20169; WO 98/20159) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO 98/20036) を分析及び制御するために使用されている。WO 97/35196 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 97/46251 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) タンパク質 A の親和性タグとしての使用も報告されている (Liら, (1998) Mol

10

20

30

40

50

Bio tech., 9: 187)。WO 97/47314は、ファージディスプレイライプラリでもよいコンビナトリアルライプラリを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライプラリの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はWO 97/09446に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第5498538号、同第5432018号、及びWO 98/15833に記載される。

ペプチドライプラリの作製及びこれらのライプラリのスクリーニングの方法は、米国特許第5723286号、同第5432018号、同第5580717号、同第5427908号、同第5498530号、同第5770434号、同第5734018号、同第5698426号、同第5763192号、及び同第5723323号に記載される。

10

【0121】

C. TAT 結合有機分子

TAT 結合有機分子とは、ここに記載されるようなTAT ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。TAT 結合有機分子は既知の方法（例えばPCT公開第WO 00/00823及びWO 00/39585号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。TAT 結合有機分子は通常、約2000ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なTAT ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのようない有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライプラリを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばPCT公開第WO 00/00823及びWO 00/39585号参照）。TAT 結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホニアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアニ酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

20

【0122】

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

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

本発明の抗TAT 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はTAT 遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでTAT ポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びTAT 形質移入細胞は、数日間（例えば、2-7）、種々の濃度の本発明の抗TAT モノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はMTTで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗TAT 抗体、TAT 結合オリゴペプチド又はTAT 結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、DNAへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、TAT ポリペプチドを過剰発現するものである。好ましく

30

40

50

は、抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、ある実施態様では約0.5から30μg/mlの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約25-100%、より好ましくは約30-100%、そしてさらにより好ましくは約50-100%又は70-100%のTAT発現腫瘍細胞の増殖をインピトロ又はインピボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30μg/ml又は0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後1-10日で確かめられる。約1μg/kgから約100mg/kg体重での抗TAT抗体の投与が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインピボで成長阻害作用がある。

10

細胞死を誘発する抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンブルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。PI取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。TATポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗TAT抗体(例えば約10μg/ml)、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35mmのストレーナキャップ付き12×75チューブ(チューブ当たり1ml、処理グループ当たり3チューブ)に等分する。次いで、チューブへPI(10μg/ml)を与える。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメータとFACSCONVERT(登録商標)セルクエスト(Cel11Quest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。PI取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子は、細胞死誘発抗TAT抗体、TAT結合オリゴペプチド又はTAT結合有機分子として選択することができる。

20

【0123】

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

30

【0124】

E. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/01145を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。

40

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

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性5-フル

50

オロシトシンを抗癌剤 5 - フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ ; プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン（例えば、カテプシン B 及び L）で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの； D - アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用な D - アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシリ化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及び ガラクトシダーゼ； ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリニアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリン V アミダーゼ又はペニシリング G アミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる（例えば、Masssey, Nature 328 : 457 - 458 [1987] を参照）。抗体 - アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。10

【0125】

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗 TAT 抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換え DNA 技術を使用して作成することができる（Neubergersら, Nature 312 : 604 - 608 [1984]）。20

【0126】

F. 完全長 TAT ポリペプチド

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

下記の実施例に開示するように、種々の cDNA クローンが ATCC に寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した TAT ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。30

【0127】

G. 抗 TAT 抗体及び TAT ポリペプチド変異体

ここに記載した抗 TAT 抗体及び完全長天然配列 TAT ポリペプチドに加えて、抗 TAT 抗体及び TAT ポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗 TAT 抗体及び TAT ポリペプチド変異体は、コード化 DNA に適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び / 又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシリ化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗 TAT 抗体の翻訳後プロセス又は TAT ポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。40

【0128】

ここに記載した抗 TAT 抗体及び TAT ポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第 5,364,934 号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする 1 つ又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗 TAT 抗体又は TAT ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任50

意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗TAT抗体又はTATポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【0129】

10

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

抗TAT抗体及びTATポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成することが含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することが含まれる。DNA断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、抗TAT抗体及びTATポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗TAT抗体又はTATポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

20

【0130】

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換を先頭にして表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

30

【0131】

表6

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 | |
|--------|------------------------------------|--------|----|
| Ala(A) | val; Leu; ile | val | |
| Arg(R) | lys; gln; asn | lys | |
| Asn(N) | gln; his; lys; arg | gln | |
| Asp(D) | glu | glu | |
| Cys(C) | ser | ser | |
| Gln(Q) | asn | asn | |
| Glu(E) | asp | asp | |
| Gly(G) | pro; ala | ala | |
| His(H) | asn; gln; lys; arg | arg | 10 |
| Ile(I) | leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン | leu | |
| Leu(L) | ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe | ile | |
| Lys(K) | arg; gln; asn | arg | |
| Met(M) | leu; phe; ile | leu | |
| Phe(F) | leu; val; ile; ala; tyr | leu | |
| Pro(P) | ala | ala | |
| Ser(S) | thr | thr | |
| Thr(T) | ser | ser | 20 |
| Trp(W) | tyr; phe | tyr | |
| Tyr(Y) | trp; phe; thr; ser | phe | |
| Val(V) | ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン | leu | |

【0132】

抗TAT抗体又はTATポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の置換的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は分子疎水性、又は(c)側鎖の巣を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン，met，ala，val，leu，ile；
- (2) 中性の親水性：cys，ser，thr；
- (3) 酸性：asp，glu；
- (4) 塩基性：asn，gln，his，lys，arg；
- (5) 鎮配向に影響する残基：gly，pro；及び
- (6) 芳香族：trp，tyr，phe。

【0133】

非保存的置換は、これらの分類の1つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された（非保存）部位に導入されうる。

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

10

20

30

40

50

【0134】

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

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

【0135】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の1つ又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位(例えば、6-7部位)を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、纖維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、次いで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトTATポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、1つ又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

【0136】

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

【0137】

H. 抗TAT抗体及びTATポリペプチドの修飾

抗TAT抗体及びTATポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗TAT抗体又はTATポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗TAT抗体又はTATポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗TAT抗体又はTATポリペプチドを、抗TAT抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通

10

20

30

40

50

常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[*p*-アジドフェニル]-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

【0138】

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

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

【0139】

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

抗TAT抗体又はTATポリペプチドへのグリコシリ化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシリ化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗TAT抗体又はTATポリペプチドの配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシリ化部位について）。抗TAT抗体又はTATポリペプチドアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、随意的に改変され得る。

【0140】

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

抗TAT抗体又はTATポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシリ化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドン

10

20

30

40

50

の変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) によって、そして Edgell, Anal. Biochem., 118:131 (1981) によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, Meth. Enzymol. 138:350 (1987) に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

【0141】

抗TAT抗体又はTATポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法で結合させることを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)に、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Oslo編(1980)に開示されている。10 20

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

【0142】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗TAT抗体又はTATポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗TAT抗体又はTATポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗TAT抗体又はTATポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗TAT抗体又はTATポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-His)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体 12CA5 [Fieldら, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evansら, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborskyら, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド[Hoppら, Biotechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド[Martinら, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド[Skinnerら, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuthら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。30 40

【0143】

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗TAT抗体又はTATポリペプチドと免疫グロブリンG1、G2、G3、G4、IgM、IgA、IgD、IgEのうちの1種又は複数を組み合わせて構成する。

ロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体は Ig G 分子の Fc 領域であり得る。Ig 融合体は、好ましくは Ig 分子内の少なくとも 1 つの可変領域に換えて抗 TAT 抗体又は TAT ポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、Ig G 分子のヒンジ、CH₂ 及び CH₃、又はヒンジ、CH₁、CH₂ 及び CH₃ 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第 5,428,130 号を参照のこと。

【0144】

I. 抗 TAT 抗体及び TAT ポリペプチドの調製

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

【0145】

1. 抗 TAT 抗体又は TAT ポリペプチドをコードする DNA の単離

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

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

【0146】

cDNA ライブライをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブライ内の DNA とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P 標

10

20

30

40

50

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

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

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNA に逆転写されていない mRNA の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook ら、に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して、選択された cDNA 又はゲノムライプラリをスクリーニングすることによって得られる。
10

【0147】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した抗 TAT 抗体又は TAT ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH 等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology : a Practical Approach, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及び Sambrook ら、上掲に見出すことができる。
20

【0148】

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook ら、に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染が、Shaw ら、Gene, 23:315 (1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の国際公開 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456 - 457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen ら, J. Bact., 130:946 (1977) 及び Hsiao ら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown ら, Methods in Enzymology, 185:527 - 537 (1990) 及び Mansour ら, Nature, 336:348 - 352 (1988) を参照のこと。
30

【0149】

ここに記載のベクターに DNA をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌 K12 株 MM294 (ATCC31,446)；大腸菌 X1776 (ATCC31,537)；大
40

腸菌株 W 3110 (ATCC 27, 325) 及び K 5772 (ATCC 53, 635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スプチルス (*B. subtilis*) 及びバチルス・リチニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行の DD 266, 710 に記載されたバチルス・リチニフォルミス 41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W 3110 は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株 W 3110 を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 tonA を有する大腸菌 W 3110 株 1A2；完全な遺伝子型 tonA ptr3 を有する大腸菌 W 3110 株 9E4；完全な遺伝子型 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r を有する大腸菌 W 3110 株 27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型 tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r を有する大腸菌 W 3110 株 37D6；非カナマイシン耐性 degP 欠失変異を持つ 37D6 株である大腸菌 W 3110 株 40B4；及び 1990 年 8 月 7 日発行の米国特許第 4,946,783 号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば PCR 又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

10

20

30

30

40

50

【0150】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤（例えば、毒素）と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシリ化及びFcエフェクター機能が必要ない場合に、細菌で產生することができる。完全長抗体は、血液循環により長い半減期を有する。大腸菌での產生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第 5,648,237 号 (Cartierら)、米国特許第 5,789,199 号 (Jolyら)、及び翻訳開始部位 (TIR) 及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第 5,840,523 号 (Simmonsら) を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテイン A 又は G カラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO 細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにしておこなうことができる。

【0151】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗 TAT 抗体又は TAT ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サツカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach 及び Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985 年 5 月 2 日発行の欧州特許第 139,383 号)；クリュイベルミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第 4,943,529 号; Fleerら, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベルミセスラクチス (*K. lactis*) (MW 98-8C, CBS 683, CBS 4574; Louvencourtら, J. Bacteriol. 154 (2): 737-742 [1983])、クリュイベルミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、クリュイベルミセス・ブルガリクス (*K. bulg*

aricus) (ATCC 16,045)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ (K. wickeramii) (ATCC 24,178)、クリュイベロミセス・ワルチイ (K. waltii) (ATCC 56,500)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム (K. drosophilae) (ATCC 36,906; Van den Bergら, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイベロミセス・テモトレランス (K. thermotolerans) 及びクリュイベロミセス・マルキシアナス (K. marxianus); ヤロウィア (yarrowia) (欧洲特許第402,226号); ピチア・パストリス (Pichia pastoris) (欧洲特許第183,070号; Sreekrishnaら, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・レーシア (Trichoderma reesiae) (欧洲特許第244,234号); アカパンカビ (Caseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス (Schwanniomycetes)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス (Schwanniomycetes occidentalis) (1990年10月31日発行の欧洲特許第394,538号); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (Tolypocladium) (1991年1月10日発行の国際公開91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (C₁化合物資化性、Methylotrophic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ (Hansenula)、カンジダ、クロエケラ (Kloeckera)、ピシア (Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス (Torulopsis)、及びロドトルラ (Rhodotorula) からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に記載されている。

【0152】

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

【0153】

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養 (組織培養) した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) で形質転換させたサル腎 CV1 細胞株; ヒト胚芽腎細胞株 (293 又は懸濁培養で成長するようにサブクローニングされた 293 細胞, Grahamら, J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10); チヤイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO

10

20

30

40

50

, Urlaub, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980); マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL70); アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト頸管腫瘍細胞 (HELA, ATCC CCL2); イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CC-L34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞 (Matherら, Annals N. Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝臓癌細胞 (Hep G2) である。
宿主細胞は、抗TAT抗体又はTATポリペプチド生成のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【0154】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードする核酸（例えば、cDNA又はゲノムDNA）は、クローニング（DNAの増幅）又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができます。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、1つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

【0155】

TATは直接的に組換え手法によって生成されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗TAT抗体又はTATポリペプチド-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフィオスファターゼ、ペニシリナーゼ、1ppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（Saccharomyces）及びクルイベロマイシス（Kluyveromyces）因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス（C. albicans）グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行の欧州特許第362179号）、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由來のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0156】

発現及びクローニングベクターは共に1つ又は複数の選択された宿主細胞においてベクター発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（a）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生素あるいは他の毒素に耐性を与え、（b）栄養要求性欠陥を補い、又は（c）複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

10

20

30

40

50

スについてよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、 2μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、HSV 又は BPV) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b) 栄養要求性欠陥を補い、又は (c) 複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリの D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

10

【0157】

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFR あるいはチミジンキナーゼのように、抗TAT抗体又はTATポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、Ur laub らにより、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980) に記載されているようにして調製され増殖された DHFR 活性に欠陥のある CHO 株化細胞である。酵母菌中の使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 に存在する trp1 遺伝子である [Stinchcomb ら, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman ら, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper ら, Gene, 10: 157 (1980)]。trp1 遺伝子は、例えば、ATCC 番号 44076 あるいは PEP4-1 のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、抗TAT抗体又はTATポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA 合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは - ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang ら, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel ら, Nature, 281: 544 (1979)]、アルカリリフォスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)]；欧州特許第 36,776 号]、及びハイブリッドプロモーター、例えば tac プロモーター [de Boer ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモータもまた抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードする DNA と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0158】

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

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

20

30

40

50

欧洲特許第73,657号に更に記載されている。

【0159】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗TAT抗体又はTATポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の英国特許第2,211,504号)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスター、アルブミン、-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗TAT抗体又はTATポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0160】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗TAT抗体又はTATポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での抗TAT抗体又はTATポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625(1981); Manteiら, Nature, 281:40-46(1979); 欧州特許第117,060号; 及び欧州特許第117,058号に記載されている。

【0161】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗TAT抗体又はTATポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Hamら, Meth. Enz. 58:44(1979), Barnesら, Anal. Biochem. 102:255(1980), 米国特許第4,767,704号; 同4,657,866号; 同4,927,762号; 同4,560,655号; 又は同5,122,469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国特許再発行第30,985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充す

ことができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0162】

5. 遺伝子増幅 / 発現の検出

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

【0163】

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

【0164】

6. 抗TAT抗体及びTATポリペプチドの精製

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

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

【0165】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1段階として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Cartierら, Bio/Technology 10 : 163 - 167 (1992) は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH 3.5) 、EDTA、及びフェニルメチルスルホニ

10

20

30

30

40

40

50

ルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

【0166】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、又は4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmarkら, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 [1983])。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト3に推奨されている(Guissら, EMBO J. 5: 1567-1575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商品名)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

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

【0167】

J. 製薬的製剤

本発明に基づく抗TAT抗体及び/又はTATポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th版, Osol, A.編. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンオール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び/又はトゥイーン(TWEEN)(登録商標)、フルロニクス(PLURONICS)(登録商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5-

10

20

30

40

50

200 mg / ml の間、好ましくは 10 - 100 mg / ml の間の濃度の抗体で構成される。

【0168】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徵候の必要に応じて一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗 T A T 抗体、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子に加えて、1つの製剤に、例えば、T A T ポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗 T A T 抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、さらに、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗 - ホルモン剤、及び / 又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 1 6 t h e d i t i o n , O s o l , A . E d . (1 9 8 0) に開示されている。

【0169】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

インビオ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0170】

K. 抗 T A T 抗体、T A T 結合オリゴペプチド又はT A T 結合有機分子による診断及び治療

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

スコア0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される。
スコア1 + - わずかに / 弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア2 + - 弱いないしは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて観察される。

スコア3 + - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて観察される。
T A T ポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、T A T が過剰発現していないことを特徴付けるものであるのに対し、2+又は3+スコアの腫瘍はT A T が過剰発現していることを特徴付ける。

【0171】

別に、又は付加的に、FISHアッセイ、例えばINFORM(登録商標)(Ventana, Arizonaから販売)又はPATHVISION(登録商標)(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して

10

20

30

40

50

、腫瘍におけるTAT過剰発現の程度（生じているならば）を測定してもよい。

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

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

【0172】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるTAT-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び／又は放射線治療と組み合わせて使用してもよい。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、従来的治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来的治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ（登録商標）（ドセタキセル）、タキソール（登録商標）（パクリタキセル）、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない被保険患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した1つ又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を投与することができる。特に、パリクタキセル及びその誘導体との組合せ治療が考えられる（例えば、欧州特許第0600517号を参照のこと）。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様において、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書（PDR）には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【0173】

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

抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子又はその免疫コンジュゲートは、公知の方法、例えばボーラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の静脈内又は皮下投与が好ましい。

10

20

30

40

50

【0174】

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

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

【0175】

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗TAT抗体（又は抗体類）、オリゴペプチド又は有機分子と1つ又は複数の化学療法剤又は成長阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチニン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン(hydroxyureataxane)（例えばパクリタキセル及びドキセタキセル）及び／又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。

10

20

20

【0176】

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

しばしば、心臓保護剤（治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため）又は1つ又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療摸生に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び／又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用（相乗作用）に応じてより少なくしてよい。

30

【0177】

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

40

50

公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【0178】

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

【0179】

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0180】

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

【0181】

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

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

上述した抗体の產生方法をここで詳細に記載する。

【0182】

本抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物におけるTAT-発現癌の治療又は1つ又は複数の癌の徵候の緩和に有用である。このような癌には、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、結腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌（prostate adenocarcinoma）、腎細胞癌、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌、及び胸膜中皮腫が含まれる。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてTATポリペプチドを発現している癌細胞の少なくと

10

20

30

40

50

も一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビポ又はインビトロで細胞のTATポリペプチドに結合して、TAT-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗TAT抗体（いかなる薬剤にも結合していない）が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗TAT抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は成長阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体が好ましい。

10

【0183】

本発明は、本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する1つ又は複数の抗TAT抗体を含有し得る。さらなる実施態様においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む成長阻害剤又は細胞障害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機分子を組合せて含有することもできる。また本発明は、本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子と担体を含有する製剤も提供する。一実施態様において、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

20

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

【0184】

本発明は、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるTATポリペプチド-発現癌の治療又は癌の1つ又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間（救急）又は長期にわたって、又は間欠的に投与することができる。また、TAT-発現細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

30

本発明は少なくとも1つの抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットは、例えばTAT細胞殺傷アッセイ、細胞からのTATポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、TATの単離及び精製のためには、キットはビーズ（例えばセファロースビース）に結合した抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有することができる。インビトロにおけるTATの検出及び定量化、例えばELISA又はウエスタンプロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【0185】

40

L. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様では、抗TAT発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。好適な容器は、例えば、瓶、バイアル、シリング等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は本発明の抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子である。ラベル又は能書は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又は能書は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水（BWFⅠ）、リン酸緩衝塩水、

50

リンガー液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0186】

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

【0187】

M.TATポリペプチド及びTAT-ポリペプチドコード化核酸の用途

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

【0188】

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

【0189】

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

10

20

30

40

50

o 1 ら (Bi o T e c h n i q u e s 6 : 9 5 8 , 1 9 8 8) に記載されている。

【 0 1 9 0 】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A T タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それら T A T タンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格（又は他の糖結合、国際公開 9 1 / 0 6 6 2 9 に記載のもの等）を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが（即ち、酵素分解に耐えうるが）、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【 0 1 9 1 】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開 9 0 / 1 0 0 4 8 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ - (L - リジン) に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属作体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、C a P O₄ - 媒介D N A トランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン - バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM - M u L V から誘導されるもの、N 2 (M - M u L V から誘導されたレトロウイルス)、又はD C T 5 A、D C T 5 B 及びD C T 5 C と命名されたダブルコピーベクター（国際公開 9 0 / 1 3 6 4 1 参照）を含む。

【 0 1 9 2 】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開 9 1 / 0 4 7 5 3 に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開 9 0 / 1 0 4 4 8 に記載されたように、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【 0 1 9 3 】

アンチセンス又はセンスR N A 又はD N A 分子は、通常は少なくとも約 5 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 , 1 8 , 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 , 2 9 , 3 0 , 3 5 , 4 0 , 4 5 , 5 0 , 5 5 , 6 0 , 6 5 , 7 0 , 7 5 , 8 0 , 8 5 , 9 0 , 9 5 , 1 0 0 , 1 0 5 , 1 1 0 , 1 1 5 , 1 2 0 , 1 2 5 , 1 3 0 , 1 3 5 , 1 4 0 , 1 4 5 , 1 5 0 , 1 5 5 , 1 6 0 , 1 6 5 , 1 7 0 , 1 7 5 , 1 8 0 , 1 8 5 , 1 9 0 , 1 9 5 , 2 0 0 , 2 1 0 , 2 2 0 , 2 3 0 , 2 4 0 , 2 5 0 , 2 6 0 , 2 7 0 , 2 8 0 , 2 9 0 , 3 0 0 , 3 1 0 , 3 2 0 , 3 3 0 , 3 4 0 , 3 5 0 , 3 6 0 , 3 7 0 , 3 8 0 , 3 9 0

10

20

30

40

50

, 4 0 0 , 4 1 0 , 4 2 0 , 4 3 0 , 4 4 0 , 4 5 0 , 4 6 0 , 4 7 0 , 4 8 0 , 4 9 0
 , 5 0 0 , 5 1 0 , 5 2 0 , 5 3 0 , 5 4 0 , 5 5 0 , 5 6 0 , 5 7 0 , 5 8 0 , 5 9 0
 , 6 0 0 , 6 1 0 , 6 2 0 , 6 3 0 , 6 4 0 , 6 5 0 , 6 6 0 , 6 7 0 , 6 8 0 , 6 9 0
 , 7 0 0 , 7 1 0 , 7 2 0 , 7 3 0 , 7 4 0 , 7 5 0 , 7 6 0 , 7 7 0 , 7 8 0 , 7 9 0
 , 8 0 0 , 8 1 0 , 8 2 0 , 8 3 0 , 8 4 0 , 8 5 0 , 8 6 0 , 8 7 0 , 8 8 0 , 8 9 0
 , 9 0 0 , 9 1 0 , 9 2 0 , 9 3 0 , 9 4 0 , 9 5 0 , 9 6 0 , 9 7 0 , 9 8 0 , 9 9 0

, 又は 1 0 0 0 ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の 10 % を加えるか又は減じたものを意味する。

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

10

【 0 1 9 4 】

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

【 0 1 9 5 】

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

20

【 0 1 9 6 】

また、T A T 又はその任意の修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを產生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物（例えばマウス又はラット）とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれた D N A である。一実施形態では、T A T をコードする c D N A は、T A T をコードする D N A を発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、T A T をコードするゲノム D N A をクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を產生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第 4 , 7 3 6 , 8 6 6 号や第 4 , 8 7 0 , 0 0 9 号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでの T A T 導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入された T A T をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は T A T をコードする D N A の増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ

30

40

50

、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0197】

あるいは、TATの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたTATをコードする変更ゲノムDNAと、TATをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、TATをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するTAT「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、TATをコードするcDNAは、確立された技術に従い、TATをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。TATをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選べるマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランкиングDNA(5' と 3' 末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについては Thomas 及び Capocchi, Cell, 51: 503 (1987) を参照のこと]。ベクターを胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Liら, Cell, 69: 915 (1992) 参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照のこと]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、TATポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0198】

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

【0199】

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

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

【0200】

ここに記載したTATポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、目下のところ新規な染色体マーカーの同定の必要である。本発明の各TAT核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。10

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

【0201】

この発明は、TATポリペプチド（アゴニスト）を模倣、又はTATポリペプチド（アンタゴニスト）の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたTATポリペプチドと結合又は複合化する、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば、細胞からのTATポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分子薬剤候補の同定に適したものにする。20

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、そして細胞ベースアッセイを含む、当該分野で良く特徴付けられている種々の形式でおこなうことができる。30

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

【0202】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるTATポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をTATポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきTATポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。40

【0203】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のTATポ50

リペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィックカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用は、Chevray 及び Nathans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 5789 - 5793 (1991) に開示されているようにして、Fields 及び共同研究者等 [Fields 及び Song, Nature (London), 340, : 245 - 246 (1989); Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 9578 - 9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌 GAL4 などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1acZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質 - タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質 - タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER（商品名））は、Clontech から商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

10

20

30

40

50

【0204】

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

【0205】

アンタゴニストを検定するために、TATポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、TATポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がTATポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、TATポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合TATポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。TATポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したTATポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソーティングにより同定できる。Colliganら, Current Protocols in Immun., 1(2) : Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化RNAがTATポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のTATポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したTATポリペプチドへ曝露する。TATポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段

で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0206】

レセプター同定の代替的方法として、標識したTATポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をPAGEで分離し、X線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施してよい。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。10

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

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとTATポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってTATポリペプチドの作用を競合的に阻害するTATポリペプチドの変異形態であってもよい。20

【0207】

他の潜在的なTATポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟TATポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋-Leeら, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooneyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりTATポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のTATポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス-Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、TATポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。30

【0208】

潜在的アンタゴニストは、TATポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりTATポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。40

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

【0209】

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

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。単離されたTATポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換えるにTATポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたTATポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗TAT抗体を生成するために用いることが可能である。

【0210】

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

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

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

【0211】

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

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

【0212】

(実施例)

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャード・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0213】

実施例1：GEPISによるTATポリペプチド及び/又はコード化核酸の同定

発現配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFSEQ(登録商標), Incyte Pharmaceutical, パロアルト, カリフォルニア)を検索し, GEPIS

10

20

30

40

50

Sによって興味あるEST配列を同定した。遺伝子発現プロファイリング インシリコ(GEPIs)は、ジェネンテック・インコーポレイテッドで開発されたバイオインフォマティック手法であり、新規の癌治療標的に関する興味ある遺伝子を特徴付ける。GEPIsは、大量のEST配列及びライプラリ情報を上手く利用し、遺伝子発現プロファイルを確定する。GEPIsは、ESTデータベースでのその発生数との比例相関に基づいて、遺伝子の発現プロファイルを確定することができ、それは、LIFESEQ(登録商標)ESTリレーションナル・データベースとジェネンテック知的財産情報を、厳密及び統計的に意味のある方法で統一することによって作動する。この例では、極めて具体的な分析又は広いスクリーニング課題のいずれかをおこなうために、GEPIsを設定することができるが、GEPIsを新規腫瘍抗原を同定して交差検定するために用いる。初期スクリーニングのために、GEPIsを、特定の組織又は興味ある組織(たいていは興味ある腫瘍組織)での発現と相関するEST配列をLIFESEQ(登録商標)データベースから同定するために使用する。この初期スクリーニングで同定されるEST配列(又は、初期スクリーニングで得られた複数の関連及び重複するEST配列を整列させることによって得られるコンセンサス配列)は、次に、少なくとも1つのコードされたタンパク質の膜貫通ドメインの存在を同定することを意図するスクリーニングへ供した。最後に、興味ある種々の配列に関する完全な組織発現プロファイルを作成するために、GEPIsを用いた。この型のスクリーニングバイオインフォマティックスを用いて、他の癌及び/又は正常非癌性組織と比較して、特定の型の癌又は幾つかの癌で顕著に過剰発現しているのと同じように、種々のTATポリペプチド(及びそれらのコード化核酸分子)が同定された。的中したGEPIsの割合は、例えば、組織特異性、腫瘍特異性及び正常な本質的組織及び/又は正常な増殖組織での発現レベルを含む幾つかの基準に基づく。次のものは、組織発現プロファイルがGEPIsによって確かめられた分子のリストであり、他の腫瘍及び/又は正常組織と比較して、特定の腫瘍又は腫瘍での高組織発現及び発現の顕著なアップレギュレーション、及び正常な本質的組織及び/又は正常な増殖組織での場合によっては比較的に低い発現を証明する。従って、下に示した分子は、哺乳動物の癌の診断及び治療にとって優れたポリペプチド標的である。

【0214】

| <u>分子</u> | <u>発現のアップレギュレーション： 比較の対象：</u> | |
|------------------------|-------------------------------|-----------|
| DNA71290-1630 (TAT169) | 乳房腫瘍 | 正常乳房組織 |
| DNA71290-1630 (TAT169) | 肺腫瘍 | 正常肺組織 |
| DNA71290-1630 (TAT169) | 肝臓腫瘍 | 正常肝臓組織 |
| DNA71290-1630 (TAT169) | 胃腫瘍 | 正常胃組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 乳房腫瘍 | 正常乳房組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 大腸腫瘍 | 正常大腸組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 肺腫瘍 | 正常肺組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 腎臓腫瘍 | 正常腎臓組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 肝臓腫瘍 | 正常肝臓組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 卵巣腫瘍 | 正常卵巣組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 脾臓腫瘍 | 正常脾臓組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 前立腺腫瘍 | 正常前立腺組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 直腸腫瘍 | 正常直腸組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 脳腫瘍 | 正常脳組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 胃腫瘍 | 正常胃組織 |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 子宮腫瘍 | 正常子宮組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 前立腺腫瘍 | 正常前立腺組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 脾臓腫瘍 | 正常脾臓組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 皮膚腫瘍 | 正常皮膚組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 乳房腫瘍 | 正常乳房組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 大腸腫瘍 | 正常大腸組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 腎臓腫瘍 | 正常腎臓組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 肝臓腫瘍 | 正常肝臓組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 胃腫瘍 | 正常胃組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 神経内分泌腫瘍 | 正常神經内分泌組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 神経系腫瘍 | 正常神經系組織 |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 胸腺腫瘍 | 正常胸腺組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 子宮腫瘍 | 正常子宮組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 卵巣腫瘍 | 正常卵巣組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 乳房腫瘍 | 正常乳房組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 大腸腫瘍 | 正常大腸組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 腎臓腫瘍 | 正常腎臓組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 脾臓腫瘍 | 正常脾臓組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 前立腺腫瘍 | 正常前立腺組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 皮膚腫瘍 | 正常皮膚組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 肝臓腫瘍 | 正常肝臓組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 下垂体腫瘍 | 正常下垂体組織 |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 神経系腫瘍 | 正常神經系組織 |

【 0 2 1 5 】

実施例 2 : Gene Express (登録商標) を利用した組織発現プロファイリング
 遺伝子発現情報を含む専用データベース (Gene Express (登録商標) , Gene Logic Inc. , ゲーサーズバーグ , メリーランド) を分析して、発現が他の腫瘍及び / 又は正常組織と比較して対象である特定の腫瘍組織で顕著にアップレギュレートしているポリペプチド (及びそれらのコード化核酸) の同定を試みた。具体的には、Gene Express (登録商標) データベースの分析を、Gene Logic Inc. , ゲーサーズバーグ , メリーランドを介して入手可能な Gene Express (登録商標) データベースで使用するためのソフトウェア、又はジェネンテック社で作製されて開発された Gene Express (登録商標) データベースで使用するための専用ソ

フトウエアのいずれかを利用しておこなった。この分析でのポジティブヒットの割合は、例えば、組織特異性、腫瘍特異性及び正常な本質的組織及び／又は正常な増殖組織における発現レベルを含む幾つかの基準に基づいている。下記は、Gene Express（登録商標）データベースの分析から決定された組織発現プロファイルによって、他の腫瘍及び／又は正常組織と比較して、特定の腫瘍で高い組織発現及び発現の有意なアップレギュレーションがあり、及び場合によっては、正常な本質的組織及び／又は正常な増殖組織において比較的に低い発現があることを証明された分子のリストである。従って、下に挙げる分子は、哺乳動物における癌の診断及び治療に関する優れたポリペプチド標的である。

【0216】

| 分子 | 発現のアップレギュレーション： | 比較の対象： | | 10 |
|---------------------------|-----------------|--------|------|----|
| | | 正常組織 | 腫瘍組織 | |
| DNA71290-1630 (TAT169) | 乳房腫瘍 | 乳房 | | |
| | 胃腫瘍 | 胃 | | |
| | 肺腫瘍 | 肺 | | |
| | 肝臓腫瘍 | 肝臓 | | |
| DNA76393-1664 (TAT170) | 乳房腫瘍 | 乳房 | | |
| | 大腸腫瘍 | 大腸 | | |
| | 肺腫瘍 | 肺 | | |
| | 肝臓腫瘍 | 肝臓 | | |
| | 胃腫瘍 | 胃 | | |
| | 腎臓腫瘍 | 腎臓 | | |
| | 脾臓腫瘍 | 脾臓 | | |
| | 前立腺腫瘍 | 前立腺 | | |
| | 子宮腫瘍 | 子宮 | | |
| | 直腸腫瘍 | 直腸 | | |
| | 卵巣腫瘍 | 卵巣 | | |
| | 脳腫瘍 | 脳 | | 20 |

【0217】

| <u>分子</u> | <u>発現のアップレギュレーション：</u> | | <u>比較の対象：</u> |
|---------------------------|------------------------|-------------|---------------|
| | <u>正常組織</u> | <u>腫瘍組織</u> | |
| DNA53971-1359 (TAT171) | 乳房腫瘍 | 乳房 | |
| | 大腸腫瘍 | 大腸 | |
| | 肝臓腫瘍 | 肝臓 | |
| | 胃腫瘍 | 胃 | |
| | 腎臓腫瘍 | 腎臓 | |
| | 脾臓腫瘍 | 脾臓 | |
| | 皮膚腫瘍 | 皮膚 | |
| | 神経内分泌腫瘍 | 神経内分泌 | |
| | 神経系腫瘍 | 神経系 | |
| | 前立腺腫瘍 | 前立腺 | |
| DNA56439-1376 (TAT172) | 乳房腫瘍 | 乳房 | |
| | 大腸腫瘍 | 大腸 | |
| | 肝臓腫瘍 | 肝臓 | |
| | 腎臓腫瘍 | 腎臓 | |
| | 脾臓腫瘍 | 脾臓 | |
| | 皮膚腫瘍 | 皮膚 | |
| | 下垂体腫瘍 | 下垂体 | |
| | 神経系腫瘍 | 神経系 | |
| | 前立腺腫瘍 | 前立腺 | |
| | 子宮腫瘍 | 子宮 | |
| DNA64852-1589 (TAT173) | 乳房腫瘍 | 乳房 | 頸部 |
| | 骨腫瘍 | 骨 | 結腸直腸 |
| | | 頸部 | 食道 |
| | | 結腸直腸 | 心臓 |
| | | 食道 | 腎臓 |
| | | 心臓 | 肝臓 |
| | | 腎臓 | 肺 |
| | | 肝臓 | 子宮 |
| | | 肺 | 卵巣 |
| | | 子宮 | 脾臓 |
| 40 | | 卵巣 | 前立腺 |
| | | 脾臓 | 皮膚 |
| | | 前立腺 | 小腸 |
| | | 皮膚 | 脾臓 |
| | | 小腸 | 胃 |
| | | 脾臓 | 精巣 |
| | | 胃 | 膀胱 |
| | | 精巣 | |
| | | 膀胱 | |

【 0 2 1 8 】

実施例 3：ハイブリダイゼーションプローブとしての T A T の利用

以下の方法は、T A T をコードする核酸配列のハイブリダイゼーションプローブとしての利用、すなわち哺乳動物における腫瘍の存在の診断を示している。

ここに開示されている完全長又は成熟 T A T をコード化配列を含む D N A は、ヒト組織 c 50

D N A ライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相同意なD N A (T A T の天然発生変異体をコードするもの等)のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

どちらかのライブラリD N A を含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄を、次の高ストリングエンシー条件下において実施する。放射標識T A T 誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5×S S C、0.1%S D S 、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、p H 6.8、2×デンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中において42度20時間実施する。フィルターの洗浄は、0.1×S S C 及び0.1%S D S 水溶液中において42度実施する。

次いで、この分野で知られている標準的技術を用いて、完全長天然配列T A T をコードするD N A と所望の配列同一性を有するD N A を同定することができる。 10

【 0 2 1 9 】

実地例4：大腸菌におけるT A T の発現

この実施例は、大腸菌中における組み換え発現によるT A T の非グリコシル化型の調製を例証する。

選択したP C R プライマーを利用して、T A T をコードするD N A 配列を最初に増幅する。このプライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。種々の発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に関する遺伝子を含むp B R 3 2 2 (大腸菌由来；B o l i v a r l a , G e n e , 2 : 9 5 (1 9 9 7) を参照のこと) 20 がある。このベクターを制限酵素によって消化し、脱リン酸化する。次いで、P C R 増幅配列をベクターへライゲーションする。このベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモーター、ポリh i s リーダー(最初の6つのS T I I コドン、ポリh i s 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、T A T コード領域、ラムダ転写集結因子及びa r g U 遺伝子をコードする配列を含む。

【 0 2 2 0 】

次いで、S a m b r o o k ら，上記に記載されている方法を用いて、このライゲーション混合物を選択した大腸菌株を形質転換するために利用した。形質転換体をL B プレート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。制限分析及びD N A 配列決定によって、プラスミドD N A を単離し、確認することができる。 30

選択したクローンを、抗生物質で補填されたL B プロスのような液体培地で一晩かけて成長させることができる。次いで、この一晩の培養を、より大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして、細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間、細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することが可能である。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いで、この溶解したT A T タンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において、金属キレート化カラムを用いて精製することが可能である。

【 0 2 2 1 】

以下の手法を用いて、ポリ-H i s タグ形態でT A T を大腸菌で発現させてよい。選択したP C R プライマーを用いて、T A T をコードするD N A を最初に増幅する。このプライマーは、選択した発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、並びに効率的に信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、そしてエンテロキナーゼによるタンパク質分解的除去を提供する他の有用な配列を含む。次いで、P C R 増幅を施したポリ-H i s タグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株52(W 3 1 1 0 f u h A (t o n A) l o n g a l E r p o H t s (h t p R t s) c l p P (l a c I q)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用する。形質転換体を、最初に50mg / ml のカルベニシリンを含有するL B 中で、30度で振盪しながら3-5のO . D . 6 0 0 に達するまで成長させる。次いで、培養液を50-100倍希釈してC R A P 培地(3.57gの(N H 4) 2 S O 4 、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H 2 O、1.07gの 40

K C L、5 . 3 6 g の D i f f o 酵母抽出物、5 0 0 m L 水中の 5 . 3 6 g の S h e f f i e l d h y c a s e S F、並びに 1 1 0 m M の M P O S、p H 7 . 3、0 . 5 5 % (w / v) のグルコース及び 7 m M の Mg S O 4 の混合で調製)とし、そして 3 0 で振盪によって約 2 0 - 3 0 時間成長させる。S D S - P A G E によって発現を確認するために試料を取り出し、この大量培養液を遠心分離して細胞がペレットとなるようにする。精製及びリフォールディング(再折りたたみ)まで、細胞ペレットを凍結する。

【 0 2 2 2 】

0 . 5 から 1 L の発酵(6 - 1 0 g ペレット)の大腸菌ペーストを、7 M のグアニジン、2 0 m M のトリス、p H 8 バッファー中で 1 0 容量(w / v)で再懸濁する。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオニ酸ナトリウムを、各々の最終濃度が 0 . 1 M 及び 0 . 0 2 M となるように添加し、この溶液を 4 で終夜に渡って攪拌する。この工程によって、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。この溶液を 3 0 分間、ベックマン超遠心分離機により 4 0 , 0 0 0 r p m で遠心分離する。その上清を金属キレートカラムバッファー(6 M のグアニジン、2 0 m M のトリス、p H 7 . 4)の 3 - 5 容量で希釈し、0 . 2 2 ミクロンフィルターで濾過して透明にする。この透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化した 5 m l の Q i a g e n N i - N T A 金属キレートカラムに負荷する。このカラムを、5 0 m M のイミダゾール(C a l b i o c h e m, U t r o l g r a d e)を含む添加バッファー、p H 7 . 4 で洗浄する。タンパク質を、2 5 0 m M のイミダゾールを含有するバッファーで溶離する。所望のタンパク質を含有する分画をプールし、4 で保存する。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて、2 8 0 n m におけるその吸収によって見積もった。
10

【 0 2 2 3 】

試料を 2 0 m M トリス、p H 8 . 6、0 . 3 M N a C l、2 . 5 M 尿素、5 m M システイン、2 0 m M グリシン及び 1 m M E D T A からなる新たに調製した再生バッファーで徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させる。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が 5 0 ~ 1 0 0 マイクログラム / m l となるように選択する。このリフォールディング溶液を 4 で 1 2 - 3 6 時間ゆっくりと攪拌する。リフォールディング反応は、T F A を最終濃度が 0 . 4 % (約 3 の p H) となるように添加することにより停止させる。タンパク質の更なる精製の前に、この溶液を 0 . 2 2 ミクロンフィルターで濾過し、アセトニトリルを最終濃度が 2 - 1 0 % となるように添加する。再生したタンパク質を、1 0 ~ 8 0 % のアセトニトリルのグラジエントによる溶離をともなう 0 . 1 % T F A の移動バッファーを使用して、P o r o s R 1 / H 逆相カラムによるクロマトグラフにかける。A 2 8 0 吸収を持つ分画のアリコートを S D S ポリアクリルアミドゲルで分析し、相同意的な再生タンパク質を含有する分画をプールする。一般的に、殆どのタンパク質の正確に再生した種は、逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているその疎水性内面によってこれらの種が最もコンパクトであるので、最低濃度のアセトニトリルで溶離される。凝集した種は、通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質の形態を所望の形態から分離するのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。
30

【 0 2 2 4 】

所望の再生した T A T ポリペプチドを含有する分画をプールし、溶液へ穏やかな窒素の弱い気流を当てることでアセトニトリルを除去した。透析、或いは調製バッファーで平衡化し、無菌濾過された G 2 5 S u p e r f i n e (ファルマシア) 樹脂によるゲル濾過によって、タンパク質を 0 . 1 4 M 塩化ナトリウム及び 4 % マンニトールを含む 2 0 m M の H e p e s、p H 6 . 8 に調製した。

ここで開示されたある T A T ポリペプチドは、上記の方法によって成功裏に発現し、精製された。

【 0 2 2 5 】

実施例 5 : 哺乳動物細胞における T A T の発現

10

20

30

40

50

この実施例は、哺乳動物細胞での組み換え発現によるTATの潜在的なグリコシル化形態の調製を例証する。

発現ベクターとしては、ベクターpRK5(1989年3月15日公開の欧州特許第307,247号を参照)を用いる。場合によっては、上記のSambrookらに記載のようなライゲーション方法を用いて、選択した制限酵素でTAT DNAをpRK5とライゲーションし、TAT DNAの挿入を可能にする。

【0226】

一実施態様では、選択宿主細胞を293細胞にしてもよい。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)を、ウシ胎児血清、そして場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質で補ったDMEMなどの培地中の組織培養プレートで、集密化するまで成長させる。約10μgのpRK5-TAT DNAを、約1μgのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmapayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500μlの1mMトリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂に溶解する。この混合物に、滴状の500μlの50mM HEPES(pH 7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を添加し、25度10分間に渡って、析出物を形成させる。この析出物を懸濁して293細胞に加え、37度約4時間に渡って定着させた。培地を吸引し、2mlの20%グリセロールのPBSを30秒間にわたって添加した。次いで、この293細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加して細胞を約5日間に渡ってインキュベートした。

【0227】

形質移入後の約24時間には、培養培地を除去し、培養培地(のみ)或いは200μCi/ml³⁵S-システイン及び200μCi/ml³⁵S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後には、馴化培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに負荷する。この処理したゲルを乾燥し、TATポリペプチドの存在を現す選択された時間に渡ってフィルムにさらす。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施してもよく(無血清培地で)、この培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

【0228】

これに換わる技術としては、Sompanyacら, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて、TATを293細胞へ過度的に導入してもよい。293細胞を、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700μgのpRK5-TAT DNAを添加する。この細胞を、まずは遠心分離によってスピナーフラスコから濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で4時間に渡ってインキュベートする。この細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5μg/mlウシインシュリン、及び0.1μg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、馴化培地を遠心分離し、濾過して細胞及び細胞片を除去した。次いで、任意の透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって、発現したTATを含む試料を濃縮し、精製することができる。

【0229】

他の実施態様では、TATをCHO細胞で発現させることができる。CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いて、pRK5-TATをCHO細胞へ形質移入することができる。上記に記載のように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地と置換することができる。TATポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地と置換してもよい。好ましくは、この培養を約6日間インキュベートし、次いで馴化培地を収集する。次いで、発現したTATを含む培地を、濃縮して任意の選択した方法によって精製することができる。

【0230】

また、エピトープタグTATを、宿主CHO細胞で発現させてもよい。TATをpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローニング挿入物を、PCRを施してポリ

10

20

30

40

50

- h i s タグ等の選択されたエピトープタグとのフレームとしてバキュロウイルス発現ベクターへ融合できる。ポリ - h i s タグ T A T 挿入物を、次いで、安定なクローニングのための D H F R 等の選択マーカーを含む S V 4 0 誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、 C H O 細胞を S V 4 0 誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現したポリ - h i s タグ T A T を含む培地は、次いで濃縮し、 N i ²⁺ - キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製できる。

また T A T は、一過性発現法によって C H O 及び / 又は C O S 細胞で、他の安定な発現方法によって C H O 細胞で発現させてもよい。

C H O 細胞における安定な発現は、以下の方法を用いて実施された。タンパク質を、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、 C H 2 及び C H 2 ドメイン及び / 又はポリ - H i s タグ形態を含む I g G 1 定常領域配列へ融合している I g G 作成物（イムノアドヘシン）として発現させる。

【 0 2 3 1 】

P C R 増幅に続いて、 Aus u b e l r a , Current Protocols of Molecular Biology , Unit 3.16 , John Wiley and Sons (1997) に記載のような標準的技術を用いて、それぞれの D N A を C H O 発現ベクターにサブクローニングする。 C H O 発現ベクターを、対象とする D N A の 5' 及び 3' に適合する制限部位を有し、 c D N A の簡便にシャトル化ができるように作成する。 C H O 細胞での発現に利用されるベクターは、 L u c a s r a , N u c l . A c i d s R e s . 2 4 : 9 , 1 7 7 4 - 1 7 7 9 (1 9 9 6) に記載されたようなものであり、対象とする c D N A 及びジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) の発現の制御に S V 4 0 初期プロモーター / エンハンサーを用いる。 D H F R 発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持に関する選択を可能にする。

所望のプラスミド D N A の 1 2 マイクログラムを、市販の形質移入試薬 S u p e r f e c t (登録商標) (Q u i a g e n) , D o s p e r (登録商標) 及び F u g e n e (登録商標) (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) を使用して、約 1 千万の C H O 細胞に導入する。この細胞を、上記の L u c a s 等に記載されているように成長させる。下記に記載のような更なる成長及び生産のために、約 3 × 1 0 ⁷ の細胞をアンプルで凍結する。

【 0 2 3 2 】

このプラスミド D N A を含むアンプルを水槽に配することで解凍し、ボルテックスによって混合する。内容物を 1 0 m L の媒質を含む遠心管ヘッピットし、 1 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離する。その上清を吸引し、細胞を 1 0 m L の選択培地 (0 . 2 μ m 濾過 P S 2 0 、 5 % の 0 . 2 μ m 透析濾過ウシ胎児血清を添加) に懸濁する。次いで、この細胞を 9 0 m L の選択培地を含む 1 0 0 m L スピナーに分ける。 1 - 2 日後、細胞を 1 5 0 m L の選択培地で満たした 2 5 0 m L スピナーに移し、 3 7 ° でインキュベートする。 2 - 3 日後、 2 5 0 m L 、 5 0 0 m L 及び 2 0 0 0 m L のスピナーを 3 × 1 0 ⁵ 細胞 / m L で播種する。遠心分離及び生産培地での再懸濁によって、細胞培地を新鮮な培地で交換する。任意の適切な C H O 培地を用いてもよいが、実際には 1 9 9 2 年 6 月 1 6 日に発行された米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 6 9 号に記載されている生産培地を使用してもよい。 3 L の生産スピナーを 1 . 2 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L で播種する。 0 日目に、細胞数と pH を測定する。 1 日目に、スピナーから試料採取し、濾過空気での散布を実施する。 2 日目に、スピナーから試料採取し、温度を 3 3 ° に変え、 3 0 m L の 5 0 0 g / L のグルコース及び 0 . 6 m L の 1 0 % 消泡剤（例えば 3 5 % ポリジメチルシロキサンエマルション、 D o w C o r n i n g 3 6 5 M e d i c a l G r a d e E m u l s i o n ）を使用する。生産を通して、 7 . 2 近傍に維持するために、必要ならば pH を調節する。 1 0 日後又は生存率が 7 0 % を下回るまで、細胞培養を遠心分離で回収して 0 . 2 2 μ m フィルターで濾過する。濾過物は、 4 ° で貯蔵するか、即座に精製用カラムへ負荷する。

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

50

ポリ - H i s タグ作成物に関しては、タンパク質を N i - N T A カラム (Q i a g e n) を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを馴化培地へ 5 mM の濃度まで添加した。この馴化培地を、 0 . 3 M NaCl 及び 5 mM イミダゾールを含む 20 mM の H e p e s , pH 7 . 4 バッファーで平衡化した 6 ml の Ni - N T A カラムへ 4 - 5 ml / 分の流速で 4 でポンプ供給した。負荷後、このカラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、 0 . 25 M イミダゾールを含む平衡バッファーでタンパク質を溶離した。この高度に精製されたタンパク質は、その後、 25 ml の G 25 S u p e r f i n e (ファルマシア) カラムで、 10 mM H e p e s 、 0 . 14 M NaCl 及び 4 % マンニトール , pH 6 . 8 を含む貯蔵バッファーで脱塩し、 - 80 で貯蔵した。

【 0 2 3 4 】

10

イムノアドヘシン (F c 含有) 作成物を、以下のようにして馴化培地から精製する。この馴化培地を、 20 mM のリン酸ナトリウムバッファー , pH 6 . 8 で平衡化した 5 ml のプロテイン A カラム (ファルマシア) へポンプ注入する。負荷後、 100 mM のクエン酸 , pH 3 . 5 で溶離する前に、このカラムを平衡バッファーで十分に洗浄する。 275 μL の 1 M トリスバッファー , pH 9 を含む管に 1 ml の分画を回収することによって、溶離したタンパク質を即座に中和する。高度に精製されたタンパク質は、その後、ポリ - H i s タグタンパク質に関して上記に記載した貯蔵バッファーで脱塩する。その均一性は、 SDS ポリアクリルアミドゲル、及びエドマン (E d m a n) 分解による N - 末端アミノ酸配列決定によって評価する。

ここに開示したある T A T ポリペプチドが、この技術を用いることによって成功裏に発現し、精製された。

20

【 0 2 3 5 】

実施例 6 : 酵母菌での T A T の発現

以下の方法は、酵母菌中での T A T ポリペプチドの組換え発現を示す。

第 1 に、 A D H 2 / G A P D H プロモーターからの T A T の細胞内產生又は分泌のために、酵母菌発現ベクターを作成する。 T A T をコードする DNA 及びプロモーターを、選択したプラスミドの適切な制限酵素部位に挿入して T A T の細胞内発現を指示する。分泌のために、 T A T をコードする DNA を、選択したプラスミドへ、 A D H 2 / G A P D H プロモーターをコードする DNA 、天然 T A T シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌 因子又はインベルターゼ分泌シグナル / リーダー配列、並びに（必要ならば） T A T の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

30

【 0 2 3 6 】

酵母菌株 A B 1 1 0 等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択した発酵培地で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、 10 % トリクロロ酢酸での沈降、並びに SDS - P A G E による分離に続くクマシープルー染色によるゲルの染色によって分析することができる。

組換え T A T は、その後、遠心分離及び続く選択したカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって、発酵培地から酵母菌細胞を取り除くことで単離及び精製できる。 T A T を含む濃縮物を、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製することができる。

40

ここに開示したある T A T ポリペプチドが、この技術を用いることによって成功裏に発現し、精製された。

【 0 2 3 7 】

実施例 7 : バキュロウイルス感染昆虫細胞での T A T の発現

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

T A T をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグには、ポリ - h i s タグ及び免疫グロブリンタグ (I g G の F c 領域など) が含まれる。 p V L 1 3 9 3 (N a v a g e n) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む、種々のプラスミドを用いる

50

ことができる。簡単には、T A T 又はT A T コード配列の所望部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列、又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、5'及び3'領域に相補的なプライマーによるP C Rによって増幅される。この5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。この生成物を、その後、選択された制限酵素で消化し、発現ベクターへサブクローニングする。

【0238】

組換えバキュロウイルスは、リポフェクチン(G I B C O - B R Lから市販)を用いて、上記のプラスミド及びB a c u l o G o l d(商品名)ウイルスDNA(P h a r m i n g e n)をS p o d o p t e r a f r u g i p e r d a('S f 9')細胞(A T C C C R L 1 7 1 1)へ同時トランスフェクションすることによって作成される。¹⁰ 28で4-5日インキュベートした後、放出したウイルスを回収し、さらなる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現を、O'Reillyら、B a c u l o v i r u s e x p r e s s i o n v e c t o r s: A l a b o r a t o r y M a n u a l, Oxford: Oxford University Press(1994)に記載されているように実施する。

【0239】

次に、発現したポリ-h i s タグT A Tを、例えばN i²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィーによって、次のようにして精製できる。抽出は、R u p e r t ら、N a t u r e, 3 6 2 : 1 7 5 - 1 7 9 (1993)に記載のように、ウイルス感染した組み換えS f 9細胞から調製する。簡単には、S f 9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー-(25mLのH e p e s, pH 7.9; 12.5mMのM g C l₂; 0.1mM E D T A; 10%グリセロール; 0.1%のN P - 4 0; 0.4MのK C l)で再懸濁し、氷上で20秒を2回ずつ超音波処理する。この超音波処理物は、遠心分離によって透明にし、その上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのN a C l、10%グリセロール、p H 7.8)で50倍希釈して0.45μmフィルターで濾過する。N i²⁺-N T Aアガロースカラム(Q i a g e nから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄して25mLの負荷バッファーで平衡化する。濾過した細胞抽出物を、毎分0.5mLでこのカラムに負荷する。このカラムを、分画回収が始まる地点であるA₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄する。次に、このカラムを、非特異的に結合しているタンパク質を溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのN a C l、10%グリセロール、p H 6.0)で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、このカラムを二次洗浄バッファーによる0から500mMイミダゾールのグラジエントで展開した。1mLの分画を回収し、S D S - P A G E及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Q i a g e n)に共役させたN i²⁺-N T Aによるウェスタンプロットで分析する。溶離したH i s₁₀-タグT A Tを含む分画をプールして負荷バッファーで透析する。

あるいは、I g G タグ(又はF c タグ)T A Tの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。⁴⁰

ここに開示したあるT A Tポリペプチドが、この技術を用いることによって成功裏に発現し、精製された。

【0240】

実施例8：T A Tに結合する抗体の調製

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

モノクローナル抗体の生成のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のG o d i n gに記載されている。用いられ得る免疫原には、精製T A T、T A Tを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えT A Tを発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をせずにおこなうことができる。

B a 1 b / c等のマウスを、完全フロイントアジュvantで乳化したT A T免疫原を1-⁵⁰

100マイクログラムの量で皮下又は腹腔内へ注入することで免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュvant(Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ)で乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。この免疫化したマウスを、次いで10から12日後に、選択したアジュvantで乳化した付加的免疫源によって追加免疫する。その後、数週間、このマウスを免疫注射で同じく追加免疫する。抗TAT抗体の検出のためのELISAアッセイによる試験するために、レトロオービタル出血によって、血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

【0241】

適当な抗体力値が検出された後、抗体に対して「ポジティブ(陽性)」な動物へTATの最後の静脈内注射をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出す。次いで、脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ACTTから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させる。そして、融合によって、HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔くことができるハイブリドーマ細胞の生成が可能となり、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖が阻害される。

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

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

ここに開示したあるTATポリペプチドに対して検出された抗体が、この技術を用いて成功裏に生成された。

【0242】

実施例9：特異的抗体を用いたTATポリペプチドの精製

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

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA(ファルマシア LKB バイオテクノロジー、ピスカタウェイ、ニュージャージー)による精製のいずれかによって免疫血清から調製する。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAによるクロマトグラフィーによってマウス腹水液から調製する。部分精製した免疫グロブリンを、CNBr-活性化セファロース(商品名)(ファルマシア LKB バイオテクノロジー)等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合させる。抗体を樹脂に結合させ、樹脂をロックし、誘導体樹脂を製造者の指示に従って洗浄する。

【0243】

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

可溶化TATポリペプチド含有調製物を、免疫親和性カラムへ貫流させ、TATポリペプチドの好ましい吸着を可能にする条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファ

10

20

30

40

50

ー)でカラムを洗浄する。次いで、抗体 / T A T ポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約2-3といった低pH、高濃度の尿素又はチオシアノ酸イオン等のカオトロープ)でカラムを溶離し、T A T ポリペプチドを回収する。

【0244】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、バージニア 20110 - 2209 米国 (ATCC) へ寄託した:

表7

| 材料 | ATCC寄託番号 | 寄託日 | 10 |
|---------------|----------|------------|----|
| DNA71290-1630 | 203275 | 1998年9月22日 | |
| DNA76393-1664 | 203323 | 1998年10月6日 | |
| DNA53971-1359 | 209750 | 1998年4月7日 | |
| DNA56439-1376 | 209864 | 1998年5月14日 | |
| DNA64852-1589 | 230127 | 1998年8月18日 | |

【0245】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参考番号8860G638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

【0246】

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

【0247】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号: 1がここで「DNA71290-1630」と命名されたクローンである、T A T 1 6 9 c D N A のヌクレオチド配列(配列番号: 1)を示す。

【図2】配列番号: 2がここで「DNA76393-1664」と命名されたクローンである、T A T 1 7 0 c D N A のヌクレオチド配列(配列番号: 2)を示す。

【図3】配列番号: 3がここで「DNA53971-1359」と命名されたクローンである、T A T 1 7 1 c D N A のヌクレオチド配列(配列番号: 3)を示す。

【図4】配列番号: 4がここで「DNA56439-1376」と命名されたクローンである、T A T 1 7 2 c D N A のヌクレオチド配列(配列番号: 4)を示す。

【図5】配列番号: 5がここで「DNA64852-1589」と命名されたクローンで 50

ある、T A T 1 7 3 c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：5）を示す。

【図6】図1に示す配列番号：1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：6）。

【図7】図2に示す配列番号：2のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：7）。

【図8】図3に示す配列番号：3のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：8）。

【図9】図4に示す配列番号：4のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：9）。

【図10】図5に示す配列番号：5のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：10）。

【 図 1 】

TAAACAGCTACATATTCCAGGGCAGTCAGTCACTGCCAATTCTCAACAGCGTCAGAGRGAAGAACGTACTGAA
AAGCTTTGAGATGAGAAGAATTCTCCCTCGATCACAGCAGCTTCAGCGTCAGTCGTCGTTGGTTTCCAGTCCTCA
AGACCCAGAACGAGAAAAAARGAGATTCAGTCAGCAGTCAGTTCAGCTTACGCTTACCTTACCC
ATATCCATTCTGGCCCATCTTCCCATACTTCAGAATTTCTTCAGAATTTCTGGTTTACGCTTATTCTTCTTACCTTAC
ACCTGAAATCTGCCCTACAACCTCCCTCTCGAGAAGTAAACAGAAGAGTAGTCAGCTTAACTCGTCA
CTCTGAATTAATGAAATTCGACCCACTTCCTCGAGAATCAAATTCCTGTTAAATAAGAAAACAAATGTAATTGAA
ATAGCAACAGCAGTCCTAGTCATATCTTGATGTCAGTCAGCTTACATGAACTGAGACGAGAAGTGGTTTC
TAAATTCTGCACA

【 図 2 】

〔 図 3 〕

【図10】

MAQQACPRAMAKNGLVICILVITLLLDOOTTSHTSRLKARKHSKRRVRDXDGDLKTQIEKLWTEVNALKEIQLQT
VCLRGTKVHKCYLASEGLKHFHEANEDCISKGGILVIPRNSDEINALQDYGKRSILPGVNDFWLGINDMVTEGKF
VDVNGKTAISFLNWDRAQPNNGKKRENVCVLFSQSAOGKWSDEACRSSKRYICEFTIPK

シグナルペプチド.

アミノ酸 1-31

N-ミリストイル化部位.

アミノ酸 14-20, 155-161

アミド化部位.

アミノ酸 126-130, 170-174

C型レクチンドメインシグネチャー.

アミノ酸 176-201

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16602 A2(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/00

Mickey [US/US]; 509 Alto Avenue, Half Moon Bay, CA

(21) International Application Number: PCT/US01/26626

94019 (US). WOOD, William, I. [US/US]; 35 Southdown

(22) International Filing Date: 23 August 2001 (23.08.2001)

Court, Hillsborough, CA 94010 (US). WU, Thomas, D.

(25) Filing Language: English

[US/US]; 113 Elsie Street, San Francisco, CA 94110 (US).

(26) Publication Language: English

ZHANG, Zenin [CN/US]; 876 Taurus Drive, Foster City,

(30) Priority Data:

CA 94404 (US).

PCT/US00/23328 24 August 2000 (24.08.2000) US

Mickey [US/US]; 509 Alto Avenue, Half Moon Bay, CA

PCT/US00/32678 1 December 2000 (01.12.2000) US

94019 (US). WOOD, William, I. [US/US]; 35 Southdown

PCT/US01/06520 28 February 2001 (28.02.2001) US

Court, Hillsborough, CA 94010 (US). WU, Thomas, D.

PCT/US01/17800 1 June 2001 (01.06.2001) US

[US/US]; 113 Elsie Street, San Francisco, CA 94110 (US).

PCT/US01/19692 20 June 2001 (20.06.2001) US

ZHANG, Zenin [CN/US]; 876 Taurus Drive, Foster City,

PCT/US01/21066 29 June 2001 (29.06.2001) US

CA 94404 (US).

PCT/US01/21735 9 July 2001 (09.07.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi, J. [US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA 94402 (US). GODDARD, Audrey [US/CA]; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US). GODOWSKI, Paul, J. [US/US]; 2627 Easton Drive, Burlingame, CA 94010 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US). POLAKIS, Paul [US/US]; 1449 Cortez Avenue, Burlingame, CA 94010 (US). WILLIAMS, P.,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(76) Published:

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

(77) Abstract:

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

(78) Claims:

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

(79) Drawings:

MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

(80) Extent of protection claimed:

SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,

(81) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

(82) Claims for priority:

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European

(83) Claims for divisional application:

patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

(84) Designated States (regional): OAPI patent (BF, BJ, CF,

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), PCT patent (AF, AL, AR, CG,

(85) Claims for continuation application:

CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/16602 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF TUMOR

(57) Abstract: The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF TUMOR**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

Malignant tumors (cancers) are the second leading cause of death in the United States, after heart disease (Boring et al., *CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993)). Cancer is characterized by the increase in the number of abnormal, or neoplastic, cells derived from a normal tissue which proliferate to form a tumor mass, the invasion 10 of adjacent tissues by these neoplastic tumor cells, and the generation of malignant cells which eventually spread via the blood or lymphatic system to regional lymph nodes and to distant sites via a process called metastasis. In a cancerous state, a cell proliferates under conditions in which normal cells would not grow. Cancer manifests itself in a wide variety of forms, characterized by different degrees of invasiveness and aggressiveness.

In attempts to discover effective cellular targets for cancer therapy, researchers have sought to identify 15 polypeptides that are specifically overexpressed on the surface of a particular type of cancer cell as compared to one or more normal non-cancerous cell(s). The identification of such tumor-associated cell surface antigen polypeptides has given rise to the ability to specifically target cancer cells for destruction via antibody-based therapies. In this regard, it is noted that antibody-based therapy has proved very effective in the treatment of certain cancers. For example, HERCEPTIN® and RITUXAN® (both from Genentech Inc., South San Francisco, California) are antibodies that have been used successfully to treat breast cancer and non-Hodgkin's lymphoma, respectively. More specifically, HERCEPTIN® is a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody that selectively binds to the extracellular domain of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) proto-oncogene. HER2 protein overexpression is observed in 25-30% of primary breast cancers. RITUXAN® is a genetically engineered chimeric murine/human monoclonal antibody directed against the CD20 antigen found 20 on the surface of normal and malignant B lymphocytes. Both these antibodies are recombinantly produced in CHO cells.

In other attempts to discover effective cellular targets for cancer therapy, researchers have sought to identify 25 polypeptides that are produced and secreted by a particular type of cancer cell at an expression level that is higher than that produced and secreted by one or more normal non-cancerous cell(s). Such secreted factors are often proteins that provide cancer cells with growth advantages over normal cells and include such things as, for example, angiogenic factors, cellular adhesion factors, growth factors, and the like. Identification of antagonists of such secreted polypeptides would be expected to serve as effective therapeutic agents for the treatment of such cancers. Furthermore, identification of the overexpression of such secreted factors would be 30 useful for the diagnosis of particular cancers in mammals.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Despite the above identified advances in mammalian cancer therapy, there is a great need for additional diagnostic and therapeutic agents capable of detecting the presence of tumor in a mammal and for effectively inhibiting neoplastic cell growth, respectively. Accordingly, it is the objective of the present invention to identify cell surface polypeptides that are overexpressed on certain cancer cells as compared to on normal cells or other different cancer cells, or secreted polypeptides that are overexpressed by certain cancer cells as compared to by 5 normal cells or other different cancer cells, and to use those polypeptides, and their encoding nucleic acids, to produce compositions of matter useful in the therapeutic treatment and diagnostic detection of cancer in mammals.

SUMMARY OF THE INVENTION10 A. **Embodiments**

In the present specification, Applicants describe for the first time the identification of various cellular polypeptides (and their encoding nucleic acids or fragments thereof) which are expressed to a greater degree on the surface of or by one or more types of cancer cell as compared to on the surface of or by one or more types of normal non-cancer cells. Such polypeptides are herein referred to as **Tumor-associated Antigenic Target** 15 polypeptides ("TAT" polypeptides) and are expected to serve as effective targets for cancer therapy and diagnosis in mammals.

Accordingly, in one embodiment of the present invention, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a tumor-associated antigenic target polypeptide or fragment thereof (a "TAT" polypeptide).

20 In certain aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% nucleic acid sequence identity, to (a) a DNA molecule encoding a full-length TAT polypeptide having an amino acid sequence as disclosed herein, a TAT polypeptide amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain 25 of a transmembrane TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length TAT polypeptide amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 30 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% nucleic acid sequence identity, to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length TAT polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a TAT polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length TAT polypeptide 35 amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In further aspects, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%,

WO 02/16602

PCT/US01/26626

84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% nucleic acid sequence identity, to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by the full-length coding sequence of any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a). In this regard, the term "full-length coding sequence" refers to the TAT polypeptide-encoding nucleotide sequence of the cDNA that is inserted into the vector deposited with the ATCC (which is often shown between start and stop codons, inclusive thereof, in the accompanying figures).

5 Another aspect of the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a TAT polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated, or is complementary to such encoding nucleotide sequence, wherein the transmembrane domain(s) of such polypeptide(s) are disclosed herein. Therefore, soluble extracellular domains of the herein described 10 TAT polypeptides are contemplated.

In other aspects, the present invention is directed to isolated nucleic acid molecules which hybridize to 15 (a) a nucleotide sequence encoding a TAT polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, a TAT polypeptide amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length TAT polypeptide amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a). In this regard, an embodiment of the present invention is directed to fragments of a full-length TAT polypeptide coding sequence, or the complement thereof, as disclosed herein, that may find use as, for example, hybridization probes useful as, for example, diagnostic probes, antisense oligonucleotide probes, or for encoding fragments of a full-length TAT polypeptide that may 20 optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-TAT polypeptide antibody, a TAT binding oligopeptide or other small organic molecule that binds to a TAT polypeptide. Such nucleic acid fragments are usually at least about 5 nucleotides in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, or 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% 30 of that referenced length. It is noted that novel fragments of a TAT polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the TAT polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which TAT polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such novel 35 fragments of TAT polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein. Also contemplated are the TAT polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those TAT polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-TAT antibody, a TAT binding oligopeptide or other small organic molecule that binds to a TAT polypeptide.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

In another embodiment, the invention provides isolated TAT polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

In a certain aspect, the invention concerns an isolated TAT polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% amino acid sequence identity, to a TAT polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, a TAT polypeptide amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane TAT polypeptide protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein, an amino acid sequence encoded by any of the nucleic acid sequences disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length TAT polypeptide amino acid sequence as disclosed herein.

10 In a further aspect, the invention concerns an isolated TAT polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% amino acid sequence identity, to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

15 In a specific aspect, the invention provides an isolated TAT polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the TAT polypeptide and recovering the TAT polypeptide from the cell culture.

20 Another aspect of the invention provides an isolated TAT polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the TAT polypeptide and recovering the TAT polypeptide from the cell culture.

25 In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described polypeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, or yeast. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptide and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

30 In other embodiments, the invention provides isolated chimeric polypeptides comprising any of the herein described TAT polypeptides fused to a heterologous (non-TAT) polypeptide. Examples of such chimeric molecules comprise any of the herein described TAT polypeptides fused to a heterologous polypeptide such as, for example, an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

35 In another embodiment, the invention provides an antibody which binds, preferably specifically, to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, antibody fragment, chimeric antibody, humanized antibody, or single-chain antibody. Antibodies of the present invention

WO 02/16602

PCT/US01/26626

may optionally be conjugated to a growth inhibitory agent or cytotoxic agent such as a toxin, including, for example, a maytansinoid or calicheamicin, an antibiotic, a radioactive isotope, a nucleolytic enzyme, or the like. The antibodies of the present invention may optionally be produced in CHO cells or bacterial cells and preferably induce death of a cell to which they bind. For diagnostic purposes, the antibodies of the present invention may be detectably labeled, attached to a solid support, or the like.

5 In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described antibodies. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, or yeast. A process for producing any of the herein described antibodies is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired antibody and recovering the desired antibody from the cell culture.

10 In another embodiment, the invention provides oligopeptides ("TAT binding oligopeptides") which bind, preferably specifically, to any of the above or below described TAT polypeptides. Optionally, the TAT binding oligopeptides of the present invention may be conjugated to a growth inhibitory agent or cytotoxic agent such as a toxin, including, for example, a maytansinoid or calicheamicin, an antibiotic, a radioactive isotope, a nucleolytic enzyme, or the like. The TAT binding oligopeptides of the present invention may optionally be 15 produced in CHO cells or bacterial cells and preferably induce death of a cell to which they bind. For diagnostic purposes, the TAT binding oligopeptides of the present invention may be detectably labeled, attached to a solid support, or the like.

15 In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described TAT binding oligopeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, or yeast. A process for producing any of the herein described TAT binding oligopeptides is further provided and comprises culturing host cells under 20 conditions suitable for expression of the desired oligopeptide and recovering the desired oligopeptide from the cell culture.

20 In another embodiment, the invention provides small organic molecules ("TAT binding organic molecules") which bind, preferably specifically, to any of the above or below described TAT polypeptides. Optionally, the TAT binding organic molecules of the present invention may be conjugated to a growth inhibitory agent or cytotoxic agent such as a toxin, including, for example, a maytansinoid or calicheamicin, an antibiotic, a radioactive isotope, a nucleolytic enzyme, or the like. The TAT binding organic molecules of the present invention preferably induce death of a cell to which they bind. For diagnostic purposes, the TAT binding 25 organic molecules of the present invention may be detectably labeled, attached to a solid support, or the like.

In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising a TAT polypeptide as described herein, a chimeric TAT polypeptide as described herein, an anti-TAT antibody as described herein, a TAT binding oligopeptide as described herein, or a TAT binding organic molecule as described herein, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

30 35 In yet another embodiment, the invention concerns an article of manufacture comprising a container and a composition of matter contained within the container, wherein the composition of matter may comprise a TAT polypeptide as described herein, a chimeric TAT polypeptide as described herein, an anti-TAT antibody as

WO 02/16602

PCT/US01/26626

described herein, a TAT binding oligopeptide as described herein, or a TAT binding organic molecule as described herein. The article may further optionally comprise a label affixed to the container, or a package insert included with the container, that refers to the use of the composition of matter for the therapeutic treatment or diagnostic detection of a tumor.

Another embodiment of the present invention is directed to the use of a TAT polypeptide as described herein, a chimeric TAT polypeptide as described herein, an anti-TAT polypeptide antibody as described herein, a TAT binding oligopeptide as described herein, or a TAT binding organic molecule as described herein, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the TAT polypeptide, chimeric TAT polypeptide, anti-TAT polypeptide antibody, TAT binding oligopeptide, or TAT binding organic molecule.

10 B. Additional Embodiments

Another embodiment of the present invention is directed to a method for killing a cancer cell that expresses a TAT polypeptide, wherein the method comprises contacting the cancer cell with an antibody, an oligopeptide or a small organic molecule that binds to the TAT polypeptide, thereby resulting in the death of the cancer cell. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, antibody fragment, chimeric antibody, 15 humanized antibody, or single-chain antibody. Antibodies, TAT binding oligopeptides and TAT binding organic molecules employed in the methods of the present invention may optionally be conjugated to a growth inhibitory agent or cytotoxic agent such as a toxin, including, for example, a maytansinoid or calicheamicin, an antibiotic, a radioactive isotope, a nucleolytic enzyme, or the like. The antibodies and TAT binding oligopeptides employed in the methods of the present invention may optionally be produced in CHO cells or bacterial cells.

20 Yet another embodiment of the present invention is directed to a method of therapeutically treating a TAT polypeptide-expressing tumor in a mammal, wherein the method comprises administering to the mammal a therapeutically effective amount of an antibody, an oligopeptide or a small organic molecule that binds to the TAT polypeptide, thereby resulting in the effective therapeutic treatment of the tumor. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, antibody fragment, chimeric antibody, humanized antibody, or single-chain antibody. 25 Antibodies, TAT binding oligopeptides and TAT binding organic molecules employed in the methods of the present invention may optionally be conjugated to a growth inhibitory agent or cytotoxic agent such as a toxin, including, for example, a maytansinoid or calicheamicin, an antibiotic, a radioactive isotope, a nucleolytic enzyme, or the like. The antibodies and oligopeptides employed in the methods of the present invention may optionally be produced in CHO cells or bacterial cells.

30 Yet another embodiment of the present invention is directed to a method of determining the presence of a TAT polypeptide in a sample suspected of containing the TAT polypeptide, wherein the method comprises exposing the sample to an antibody, oligopeptide or small organic molecule that binds to the TAT polypeptide and determining binding of the antibody, oligopeptide or organic molecule to the TAT polypeptide in the sample, wherein the presence of such binding is indicative of the presence of the TAT polypeptide in the sample. 35 Optionally, the sample may contain cells (which may be cancer cells) suspected of expressing the TAT polypeptide. The antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule employed in the method may optionally be detectably labeled, attached to a solid support, or the like.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

A further embodiment of the present invention is directed to a method of diagnosing the presence of a tumor in a mammal, wherein the method comprises detecting the level of expression of a gene encoding a TAT polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from said mammal, and (b) in a control sample of known normal cells of the same tissue origin, wherein a higher level of expression of the TAT polypeptide in the test sample, as compared to the control sample, is indicative of the presence of tumor in the mammal from which the test sample was obtained.

Another embodiment of the present invention is directed to a method of diagnosing the presence of a tumor in a mammal, wherein the method comprises (a) contacting a test sample of tissue cells obtained from the mammal with an antibody, oligopeptide or small organic molecule that binds to a TAT polypeptide and (b) detecting the formation of a complex between the antibody, oligopeptide or small organic molecule and the TAT polypeptide in the test sample, wherein the formation of a complex is indicative of the presence of a tumor in the mammal. Optionally, the antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule employed is detectably labeled, attached to a solid support, or the like, and/or the test sample of tissue cells is obtained from an individual suspected of having a cancerous tumor.

C. Further Additional Embodiments

The following are further additional claim embodiments of the present invention.

1. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to:

(a) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);

(b) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6),

Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

(c) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;

25 (d) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

(e) the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

30 (f) the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

(g) the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7; or

(h) the complement of (a), (b), (c), (d), (e), (f), or (g).

2. Isolated nucleic acid comprising:

(a) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);

WO 02/16602

PCT/US01/26626

- (b) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- 5 (c) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
- (d) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- 10 (e) the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- (f) the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- (g) the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7; or
- 15 (h) the complement of (a), (b), (c), (d), (e), (f), or (g).
3. Isolated nucleic acid that hybridizes to:
- (a) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
- 20 (b) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (c) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
- 25 (d) a nucleotide sequence that encodes the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (e) the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- 30 (f) the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- (g) the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7; or
- (h) the complement of (a), (b), (c), (d), (e), (f), or (g).
- 35 4. The nucleic acid of Claim 3, wherein the hybridization occurs under stringent conditions.
5. The nucleic acid of Claim 3 which is at least about 5 nucleotides in length.
6. An expression vector comprising the nucleic acid of Claim 1.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

7. The expression vector of Claim 6, wherein said nucleic acid is operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.
8. A host cell comprising the expression vector of Claim 7.
9. The host cell of Claim 8 which is a CHO cell, an *E. coli* cell or a yeast cell.
10. A process for producing a polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 8 under conditions suitable for expression of said polypeptide and recovering said polypeptide from the cell culture.
11. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
- (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
 - (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
 - (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
 - (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
 - (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
 - (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or
 - (g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.
12. An isolated polypeptide comprising:
13. (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
14. (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
15. (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
16. (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
17. (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

WO 02/16602

PCT/US01/26626

(f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

5 13. A chimeric polypeptide comprising the polypeptide of Claim 11 fused to a heterologous polypeptide.

14. The chimeric polypeptide of Claim 13, wherein said heterologous polypeptide is an epitope tag sequence or an Fc region of an immunoglobulin.

10 15. An isolated antibody which binds to a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:

(a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);

(b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

15 (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;

(d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

20 (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

(f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

16. The antibody of Claim 15 which binds to a polypeptide comprising:

30 (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);

(b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

35 (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;

(d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

WO 02/16602

PCT/US01/26626

- NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
 - (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or
 - (g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.
17. The antibody of Claim 15 which is a monoclonal antibody.
18. The antibody of Claim 15 which is an antibody fragment.
19. The antibody of Claim 15 which is a chimeric or a humanized antibody.
20. The antibody of Claim 15 which is conjugated to a growth inhibitory agent.
21. The antibody of Claim 15 which is conjugated to a cytotoxic agent.
22. The antibody of Claim 21, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.
15. 23. The antibody of Claim 21, wherein the cytotoxic agent is a toxin.
24. The antibody of Claim 23, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.
25. 25. The antibody of Claim 23, wherein the toxin is a maytansinoid.
26. The antibody of Claim 15 which is produced in bacteria.
27. The antibody of Claim 15 which is produced in CHO cells.
28. The antibody of Claim 15 which induces death of a cell to which it binds.
29. The antibody of Claim 15 which is detectably labeled.
30. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence that encodes the antibody of Claim 15.
25. 31. An expression vector comprising the nucleic acid of Claim 30 operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.
32. A host cell comprising the expression vector of Claim 31.
33. The host cell of Claim 32 which is a CHO cell, an *E. coli* cell or a yeast cell.
34. A process for producing an antibody comprising culturing the host cell of Claim 32 under conditions suitable for expression of said antibody and recovering said antibody from the cell culture.
35. An isolated oligopeptide which binds to a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
 - (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

WO 02/16602

PCT/US01/26626

(c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;

(d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

(e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

(f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

36. The oligopeptide of Claim 35 which binds to a polypeptide comprising:

(a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);

(b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

(c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;

(d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;

(e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1),

Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);

(f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

37. The oligopeptide of Claim 35 which is conjugated to a growth inhibitory agent.

38. The oligopeptide of Claim 35 which is conjugated to a cytotoxic agent.

39. The oligopeptide of Claim 38, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.

35 40. The oligopeptide of Claim 38, wherein the cytotoxic agent is a toxin.

41. The oligopeptide of Claim 40, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

42. The oligopeptide of Claim 40, wherein the toxin is a maytansinoid.
43. The oligopeptide of Claim 35 which induces death of a cell to which it binds.
44. The oligopeptide of Claim 35 which is detectably labeled.
45. A TAT binding organic molecule which binds to a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
- 5 (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
- (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
- 10 (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- 15 (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or
- 20 (g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.
46. The organic molecule of Claim 45 which binds to a polypeptide comprising:
- (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
- 25 (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
- 30 (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
- (e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
- 35 (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

WO 02/16602

PCT/US01/26626

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

47. The organic molecule of Claim 45 which is conjugated to a growth inhibitory agent.
48. The organic molecule of Claim 45 which is conjugated to a cytotoxic agent.
49. The organic molecule of Claim 48, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.
50. The organic molecule of Claim 48, wherein the cytotoxic agent is a toxin.
51. The organic molecule of Claim 50, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.
52. The organic molecule of Claim 50, wherein the toxin is a maytansinoid.
53. The organic molecule of Claim 45 which induces death of a cell to which it binds.
54. The organic molecule of Claim 45 which is detectably labeled.
55. A composition of matter comprising:
 - (a) the polypeptide of Claim 11;
 - (b) the chimeric polypeptide of Claim 13;
 - (c) the antibody of Claim 15,
 - (d) the oligopeptide of Claim 35; or
 - (e) the TAT binding organic molecule of Claim 45, in combination with a carrier.
56. The composition of matter of Claim 55, wherein said carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.
57. An article of manufacture:
 - (a) a container; and
 - (b) the composition of matter of Claim 55 contained within said container.
58. The article of manufacture of Claim 57 further comprising a label affixed to said container, or a package insert included with said container, referring to the use of said composition of matter for the therapeutic treatment of or the diagnostic detection of a cancer.
59. A method of killing a cancer cell that expresses a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10); or
 - (b) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5), said method comprising contacting said cancer cell with an antibody, oligopeptide or organic molecule that binds to said polypeptide on said cancer cell, thereby killing said cancer cell.
60. The method of Claim 59, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
61. The method of Claim 59, wherein said antibody is an antibody fragment.
62. The method of Claim 59, wherein said antibody is a chimeric or a humanized antibody.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

63. The method of Claim 59, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is conjugated to a growth inhibitory agent.

64. The method of Claim 59, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is conjugated to a cytotoxic agent.

65. The method of Claim 64, wherein said cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.

66. The method of Claim 64, wherein the cytotoxic agent is a toxin.

67. The method of Claim 66, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.

68. The method of Claim 66, wherein the toxin is a maytansinoid.

69. The method of Claim 59, wherein said antibody is produced in bacteria.

70. The method of Claim 59, wherein said antibody is produced in CHO cells.

71. The method of Claim 59, wherein said cancer cell is further exposed to radiation treatment or a chemotherapeutic agent.

72. The method of Claim 59, wherein said cancer cell is selected from the group consisting of a breast cancer cell, a colorectal cancer cell, a lung cancer cell, an ovarian cancer cell, a central nervous system cancer cell, a liver cancer cell, a bladder cancer cell, a pancreatic cancer cell, a cervical cancer cell, a melanoma cell and a leukemia cell.

73. The method of Claim 59, wherein said cancer cell overexpresses said polypeptide as compared to a normal cell of the same tissue origin.

74. A method of therapeutically treating a mammal having a tumor comprising cells that express a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:

(a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10); or

(b) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5), said method comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of an antibody, oligopeptide or organic molecule that binds to said polypeptide, thereby effectively treating said mammal.

75. The method of Claim 74, wherein said antibody is a monoclonal antibody.

76. The method of Claim 74, wherein said antibody is an antibody fragment.

77. The method of Claim 74, wherein said antibody is a chimeric or a humanized antibody.

78. The method of Claim 74, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is conjugated to a growth inhibitory agent.

79. The method of Claim 74, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is conjugated to a cytotoxic agent.

80. The method of Claim 79, wherein said cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

81. The method of Claim 79, wherein the cytotoxic agent is a toxin.
82. The method of Claim 81, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.
83. The method of Claim 81, wherein the toxin is a maytansinoid.
84. The method of Claim 74, wherein said antibody is produced in bacteria.
- 5 85. The method of Claim 74, wherein said antibody is produced in CHO cells.
86. The method of Claim 74, wherein said tumor is further exposed to radiation treatment or a chemotherapeutic agent.
87. The method of Claim 74, wherein said tumor is a breast tumor, a colorectal tumor, a lung tumor, an ovarian tumor, a central nervous system tumor, a liver tumor, a bladder tumor, a pancreatic tumor, or a cervical tumor.
- 10 88. A method of determining the presence of a polypeptide in a sample suspected of containing said polypeptide, wherein said polypeptide has at least 80% amino acid sequence identity to:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10); or
- 15 (b) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5), said method comprising exposing said sample to an antibody, oligopeptide or organic molecule that binds to said polypeptide and determining binding of said antibody, oligopeptide or organic molecule to said polypeptide in said sample.
- 20 89. The method of Claim 88, wherein said sample comprises a cell suspected of expressing said polypeptide.
 90. The method of Claim 89, wherein said cell is a cancer cell.
 91. The method of Claim 88, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is detectably labeled.
- 25 92. A method of diagnosing the presence of a tumor in a mammal, said method comprising detecting the level of expression of a gene encoding a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10); or
- 30 (b) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5), in a test sample of tissue cells obtained from said mammal and in a control sample of known normal cells of the same tissue origin, wherein a higher level of expression of said polypeptide in the test sample, as compared to the control sample, is indicative of the presence of tumor in the mammal from which the test sample was obtained.
- 35 93. The method of Claim 92, wherein the step detecting the level of expression of a gene encoding said polypeptide comprises employing an oligonucleotide in an *in situ* hybridization or RT-PCR analysis.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

94. The method of Claim 92, wherein the step detecting the level of expression of a gene encoding said polypeptide comprises employing an antibody in an immunohistochemistry analysis.

95. A method of diagnosing the presence of a tumor in a mammal, said method comprising contacting a test sample of tissue cells obtained from said mammal with an antibody, oligopeptide or organic molecule that binds to a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:

5 (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10); or

10 (b) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence comprising the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5), and detecting the formation of a complex between said antibody, oligopeptide or organic molecule and said polypeptide in the test sample, wherein the formation of a complex is indicative of the presence of a tumor in said mammal.

96. The method of Claim 95, wherein said antibody, oligopeptide or organic molecule is detectably labeled.

97. The method of Claim 95, wherein said test sample of tissue cells is obtained from an individual suspected of having a cancerous tumor.

Further embodiments of the present invention will be evident to the skilled artisan upon a reading of the present specification.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20 Figure 1 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a TATT169 cDNA, wherein SEQ ID NO:1 is a clone designated herein as "DNA71290-1630".

Figure 2 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:2) of a TATT170 cDNA, wherein SEQ ID NO:2 is a clone designated herein as "DNA76393-1664".

25 Figure 3 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) of a TATT171 cDNA, wherein SEQ ID NO:3 is a clone designated herein as "DNA53971-1359".

Figure 4 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:4) of a TATT172 cDNA, wherein SEQ ID NO:4 is a clone designated herein as "DNA56439-1376".

Figure 5 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:5) of a TATT173 cDNA, wherein SEQ ID NO:5 is a clone designated herein as "DNA64852-1589".

30 Figure 6 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:6) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1 shown in Figure 1.

Figure 7 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:7) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:2 shown in Figure 2.

35 Figure 8 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:8) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:3 shown in Figure 3.

Figure 9 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:9) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:4 shown in Figure 4.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Figure 10 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:10) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:5 shown in Figure 5.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS**I. Definitions**

The terms "TAT polypeptide" and "TAT" as used herein and when immediately followed by a numerical designation, refer to various polypeptides, wherein the complete designation (i.e., TAT/number) refers to specific polypeptide sequences as described herein. The terms "TAT/number polypeptide" and "TAT/number" wherein the term "number" is provided as an actual numerical designation as used herein encompass native sequence polypeptides, polypeptide variants and fragments of native sequence polypeptides and polypeptide variants (which are further defined herein). The TAT polypeptides described herein may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by recombinant or synthetic methods. The term "TAT polypeptide" refers to each individual TAT/number polypeptide disclosed herein. All disclosures in this specification which refer to the "TAT polypeptide" refer to each of the polypeptides individually as well as jointly. For example, descriptions of the preparation of, purification of, derivation of, formation of antibodies to or against, formation of TAT binding oligopeptides to or against, formation of TAT binding organic molecules to or against, administration of, compositions containing, treatment of a disease with, etc., pertain to each polypeptide of the invention individually. The term "TAT polypeptide" also includes variants of the TAT/number polypeptides disclosed herein.

A "native sequence TAT polypeptide" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as the corresponding TAT polypeptide derived from nature. Such native sequence TAT polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. The term "native sequence TAT polypeptide" specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms of the specific TAT polypeptide (e.g., an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the polypeptide. In certain embodiments of the invention, the native sequence TAT polypeptides disclosed herein are mature or full-length native sequence polypeptides comprising the full-length amino acids sequences shown in the accompanying figures. Start and stop codons (if indicated) are shown in bold font and underlined in the figures. Nucleic acid residues indicated as "N" in the accompanying figures are any nucleic acid residue. However, while the TAT polypeptides disclosed in the accompanying figures are shown to begin with methionine residues designated herein as amino acid position 1 in the figures, it is conceivable and possible that other methionine residues located either upstream or downstream from the amino acid position 1 in the figures may be employed as the starting amino acid residue for the TAT polypeptides.

The TAT polypeptide "extracellular domain" or "ECD" refers to a form of the TAT polypeptide which is essentially free of the transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, a TAT polypeptide ECD will have less than 1% of such transmembrane and/or cytoplasmic domains and preferably, will have less than 0.5% of such domains. It will be understood that any transmembrane domains identified for the TAT polypeptides of the present invention are identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of

WO 02/16602

PCT/US01/26626

hydrophobic domain. The exact boundaries of a transmembrane domain may vary but most likely by no more than about 5 amino acids at either end of the domain as initially identified herein. Optionally, therefore, an extracellular domain of a TAT polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

5 The approximate location of the "signal peptides" of the various TAT polypeptides disclosed herein may be shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen et al., *Prot. Eng.*, 10:1-6 (1997) and von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.*, 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, wherein the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

10 "TAT polypeptide variant" means a TAT polypeptide, preferably an active TAT polypeptide, as defined herein having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence TAT polypeptide sequence as disclosed herein, a TAT polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length TAT polypeptide sequence as disclosed herein (such as those encoded by a nucleic acid that represents only a portion of the complete coding sequence for a full-length TAT polypeptide). Such TAT polypeptide variants include, for instance, TAT polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. 15 Ordinarily, a TAT polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% amino acid sequence identity, to a full-length native sequence TAT polypeptide sequence as disclosed herein, a TAT polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically 20 defined fragment of a full-length TAT polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, TAT variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 amino acids in length, or more. Optionally, TAT variant 25 polypeptides will have no more than one conservative amino acid substitution as compared to the native TAT polypeptide sequence, alternatively no more than 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 conservative amino acid substitution as compared to the native TAT polypeptide sequence.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the TAT polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific TAT polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations using this method, Tables 2 and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "TAT", wherein "TAT" represents the amino acid sequence of a hypothetical TAT polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "TAT" polypeptide of interest is being compared, and "X, "Y", and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues. Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

- "TAT variant polynucleotide" or "TAT variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes a TAT polypeptide, preferably an active TAT polypeptide, as defined herein and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence TAT polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence TAT polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a TAT polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length TAT polypeptide sequence as disclosed herein (such as those encoded by a nucleic acid that represents only a portion of the complete coding sequence for a full-length TAT polypeptide). Ordinarily, a TAT variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% nucleic acid sequence identity with a nucleic acid sequence encoding a full-length native sequence TAT polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence TAT polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a TAT polypeptide, with or without the signal sequence, as disclosed herein or any other fragment of a full-length TAT polypeptide sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotides sequence.
- 15 Ordinarily, TAT variant polynucleotides are at least about 5 nucleotides in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, or 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotides sequence length plus or minus 10% of that referenced length.
- 25 "Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to TAT-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the TAT nucleic acid sequence of interest, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. 30 TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison
- 35

WO 02/16602

PCT/US01/26626

parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for nucleic acid sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

5

100 times the fraction W/Z

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5, demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "TAT-DNA", wherein "TAT-DNA" represents a hypothetical TAT-encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "TAT-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides. Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

20 In other embodiments, TAT variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode a TAT polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding a full-length TAT polypeptide as disclosed herein. TAT variant polypeptides may be those that are encoded by a TAT variant polynucleotide.

25 "Isolated," when used to describe the various TAT polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the TAT polypeptide natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

30 An "isolated" TAT polypeptide-encoding nucleic acid or other polypeptide-encoding nucleic acid is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the polypeptide-encoding nucleic acid. An isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecules therefore are distinguished from the specific polypeptide-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule includes polypeptide-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express the polypeptide where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

5 The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

10 "Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions 15 more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

20 "Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, 25 sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a TAT polypeptide or anti-TAT antibody fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

"Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of a TAT polypeptide which retain a biological and/or an immunological activity of native or naturally-occurring TAT, wherein "biological" activity refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native or naturally-occurring TAT other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring TAT and an "immunological" activity refers to the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring TAT.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native TAT polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native TAT polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments or amino acid sequence variants of native TAT polypeptides, peptides, antisense oligonucleotides, small organic molecules, etc. Methods for identifying agonists or antagonists of a TAT polypeptide may comprise contacting a TAT polypeptide with a candidate agonist or antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the TAT polypeptide.

"Treating" or "treatment" or "alleviation" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented. A subject or mammal is successfully "treated" for a TAT polypeptide-expressing cancer if, after receiving a therapeutic amount of an anti-TAT antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule according to the methods of the present invention, the patient shows observable and/or measurable reduction in or absence of one or more of the following: reduction in the number of cancer cells or absence of the cancer cells; reduction in the tumor size; inhibition (i.e., slow

WO 02/16602

PCT/US01/26626

to some extent and preferably stop) of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibition (i.e., slow to some extent and preferably stop) of tumor metastasis; inhibition, to some extent, of tumor growth; and/or relief to some extent, one or more of the symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality, and improvement in quality of life issues. To the extent the anti-TAT antibody or TAT binding oligopeptide may prevent growth and/or kill existing cancer

5 cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. Reduction of these signs or symptoms may also be felt by the patient.

The above parameters for assessing successful treatment and improvement in the disease are readily measurable by routine procedures familiar to a physician. For cancer therapy, efficacy can be measured, for example, by assessing the time to disease progression (TTP) and/or determining the response rate (RR).

10 Metastasis can be determined by staging tests and by bone scan and tests for calcium level and other enzymes to determine spread to the bone. CT scans can also be done to look for spread to the pelvis and lymph nodes in the area. Chest X-rays and measurement of liver enzyme levels by known methods are used to look for metastasis to the lungs and liver, respectively. Other routine methods for monitoring the disease include transrectal ultrasonography (TRUS) and transrectal needle biopsy (TRNB).

15 For bladder cancer, which is a more localized cancer, methods to determine progress of disease include urinary cytologic evaluation by cystoscopy, monitoring for presence of blood in the urine, visualization of the urothelial tract by sonography or an intravenous pyelogram, computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI). The presence of distant metastases can be assessed by CT of the abdomen, chest x-rays, or radionuclide imaging of the skeleton.

20 "Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

25 "Mammal" for purposes of the treatment of, alleviating the symptoms of or diagnosis of a cancer refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, etc. Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

30 "Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, 35 glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN®, polyethylene glycol (PEG),

WO 02/16602

PCT/US01/26626

and PLURONICS®.

By "solid phase" or "solid support" is meant a non-aqueous matrix to which an antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule of the present invention can adhere or attach. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

5 A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a TAT polypeptide, an antibody thereto or a TAT binding oligopeptide) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

10 A "small" molecule or "small" organic molecule is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

15 An "effective amount" of a polypeptide, antibody, TAT binding oligopeptide, TAT binding organic molecule or an agonist or antagonist thereof as disclosed herein is an amount sufficient to carry out a specifically stated purpose. An "effective amount" may be determined empirically and in a routine manner, in relation to the stated purpose.

20 The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of an antibody, polypeptide, TAT binding oligopeptide, TAT binding organic molecule or other drug effective to "treat" a disease or disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug may reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. See the definition herein of "treating". To the extent the drug may prevent growth and/or kill 25 existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic.

25 A "growth inhibitory amount" of an anti-TAT antibody, TAT polypeptide, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule is an amount capable of inhibiting the growth of a cell, especially tumor, e.g., cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "growth inhibitory amount" of an anti-TAT antibody, TAT polypeptide, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

30 A "cytotoxic amount" of an anti-TAT antibody, TAT polypeptide, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule is an amount capable of causing the destruction of a cell, especially tumor, e.g., cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "cytotoxic amount" of an anti-TAT antibody, TAT polypeptide, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

35 The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single anti-TAT monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies), anti-TAT antibody

WO 02/16602

PCT/US01/26626

compositions with polyepitopic specificity, polyclonal antibodies, single chain anti-TAT antibodies, and fragments of anti-TAT antibodies (see below) as long as they exhibit the desired biological or immunological activity. The term "immunoglobulin" (Ig) is used interchangeable with antibody herein.

An "isolated antibody" is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The basic 4-chain antibody unit is a heterotetrameric glycoprotein composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains (an IgM antibody consists of 5 of the basic heterotetramer unit along 15 with an additional polypeptide called J chain, and therefore contain 10 antigen binding sites, while secreted IgA antibodies can polymerize to form polyvalent assemblages comprising 2-5 of the basic 4-chain units along with J chain). In the case of IgGs, the 4-chain unit is generally about 150,000 daltons. Each L chain is linked to a H chain by one covalent disulfide bond, while the two H chains are linked to each other by one or more disulfide bonds depending on the H chain isotype. Each H and L chain also has regularly spaced intrachain disulfide 20 bridges. Each H chain has at the N-terminus, a variable domain (V_H) followed by three constant domains (C_H) for each of the α and γ chains and four C_H domains for μ and ϵ isotypes. Each L chain has at the N-terminus, a variable domain (V_L) followed by a constant domain (C_L) at its other end. The V_L is aligned with the V_H and the C_L is aligned with the first constant domain of the heavy chain (C_H1). Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains. The pairing of a V_H and V_L together forms a single antigen-binding site. For the structure and properties of the different classes of 25 antibodies, see, e.g., *Basic and Clinical Immunology*, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

The L chain from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains. Depending on the amino acid 30 sequence of the constant domain of their heavy chains (C_H), immunoglobulins can be assigned to different classes or isotypes. There are five classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, having heavy chains designated α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The γ and α classes are further divided into subclasses on the basis of relatively minor differences in C_H sequence and function, e.g., humans express the following subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, and IgA2.

35 The term "variable" refers to the fact that certain segments of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies. The V domain mediates antigen binding and define specificity of a particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed across the 110-amino acid

WO 02/16602

PCT/US01/26626

span of the variable domains. Instead, the V regions consist of relatively invariant stretches called framework regions (FRs) of 15-30 amino acids separated by shorter regions of extreme variability called "hypervariable regions" that are each 9-12 amino acids long. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. around about residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the V_L , and around about 1-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the V_H ; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the V_L , and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the V_H ; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations which include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies useful in the present invention may be prepared by the hybridoma methodology first described by Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), or may be made using recombinant DNA methods in bacterial, eukaryotic animal or plant cells (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (see U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-

WO 02/16602

PCT/US01/26626

6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include "primatized" antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.* Old World Monkey, Ape etc), and human constant region sequences.

An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding site as well as a C₁ and at least heavy chain constant domains, C_{H1}, C_{H2} and C_{H3}. The constant domains may be native sequence constant domains (*e.g.* human native sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (see U.S. Patent No. 5,641,870, Example 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 10 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. The Fab fragment consists of an entire L chain along with the variable region domain of the H chain (V_H), and the first constant domain of one heavy chain (C_{H1}). Each Fab fragment is monovalent with respect to antigen binding, i.e., it has a single antigen-binding site. Pepsin treatment of an antibody yields a single large F(ab')₂ fragment which roughly corresponds to two disulfide linked Fab fragments having divalent antigen-binding activity and is still capable of cross-linking antigen. Fab' fragments differ from Fab fragments by having additional few residues at the carboxy terminus of the C_{H1} domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The Fc fragment comprises the carboxy-terminal portions of both H chains held together by disulfides. The effector functions of antibodies are determined by sequences in the Fc region, which region is also the part recognized by Fc receptors (FcR) found on certain types of cells.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This fragment consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable region domain in tight, non-covalent association. From the folding of these two domains emanate six hypervariable loops (3 loops each from the H and L chain) that contribute the amino acid residues for antigen binding and confer antigen binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

"Single-chain Fv" also abbreviated as "sFv" or "scFv" are antibody fragments that comprise the V_H and V_L antibody domains connected into a single polypeptide chain. Preferably, the sFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck

WO 02/16602

PCT/US01/26626

1995, infra.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments prepared by constructing sFv fragments (see preceding paragraph) with short linkers (about 5-10 residues) between the V_H and V_L domains such that inter-chain but not intra-chain pairing of the V domains is achieved, resulting in a bivalent fragment, i.e., fragment having two antigen-binding sites. Bispecific diabodies are heterodimers of two "crossover" sFv fragments in which the V_H and V_L domains of the two antibodies are present on different polypeptide chains. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

"Humanized" forms of non-human (e.g., rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from the non-human antibody. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or non-human primate having the desired antibody specificity, affinity, and capability. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

A "species-dependent antibody," e.g., a mammalian anti-human IgE antibody, is an antibody which has a stronger binding affinity for an antigen from a first mammalian species than it has for a homologue of that antigen from a second mammalian species. Normally, the species-dependent antibody "bind specifically" to a human antigen (i.e., has a binding affinity (Kd) value of no more than about 1×10^7 M, preferably no more than about 1×10^8 and most preferably no more than about 1×10^9 M) but has a binding affinity for a homologue of the antigen from a second non-human mammalian species which is at least about 50 fold, or at least about 500 fold, or at least about 1000 fold, weaker than its binding affinity for the human antigen. The species-dependent antibody can be of any of the various types of antibodies as defined above, but preferably is a humanized or human antibody.

A "TAT binding oligopeptide" is an oligopeptide that binds, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding oligopeptides may be chemically synthesized using known oligopeptide synthesis methodology or may be prepared and purified using recombinant technology. TAT binding oligopeptides are usually at least about 5 amino acids in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,

WO 02/16602

PCT/US01/26626

94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100 amino acids in length or more, wherein such oligopeptides that are capable of binding, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding oligopeptides may be identified without undue experimentation using well known techniques. In this regard, it is noted that techniques for screening oligopeptide libraries for oligopeptides that are capable of specifically binding to a polypeptide target are well known in the art (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT Publication Nos. WO 84/03506 and WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clarkson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, and Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A "TAT binding organic molecule" is an organic molecule other than an oligopeptide or antibody as defined herein that binds, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding organic molecules may be identified and chemically synthesized using known methodology (see, e.g., PCT Publication Nos. WO00/00823 and WO00/39585). TAT binding organic molecules are usually less than about 2000 daltons in size, alternatively less than about 1500, 750, 500, 250 or 200 daltons in size, wherein such organic molecules that are capable of binding, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein may be identified without undue experimentation using well known techniques. In this regard, it is noted that techniques for screening organic molecule libraries for molecules that are capable of binding to a polypeptide target are well known in the art (see, e.g., PCT Publication Nos. WO00/00823 and WO00/39585).

An antibody, oligopeptide or other organic molecule "which binds" an antigen of interest, e.g. a tumor-associated polypeptide antigen target, is one that binds the antigen with sufficient affinity such that the antibody, oligopeptide or other organic molecule is useful as a diagnostic and/or therapeutic agent in targeting a cell or tissue expressing the antigen, and does not significantly cross-react with other proteins. In such embodiments, the extent of binding of the antibody, oligopeptide or other organic molecule to a "non-target" protein will be less than about 10% of the binding of the antibody, oligopeptide or other organic molecule to its particular target protein as determined by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis or radioimmunoprecipitation (RIA). An antibody, oligopeptide or other organic molecule that "specifically binds to" or is "specific for" a particular polypeptide or an epitope on a particular polypeptide is one that binds to that particular polypeptide or epitope on a particular polypeptide without substantially binding to any other polypeptide or polypeptide epitope.

An antibody, oligopeptide or other organic molecule that "inhibits the growth of tumor cells expressing a TAT polypeptide" or a "growth inhibitory" antibody, oligopeptide or other organic molecule is one which results in measurable growth inhibition of cancer cells expressing or overexpressing the appropriate TAT polypeptide. The TAT polypeptide may be a transmembrane polypeptide expressed on the surface of a cancer cell or may be a polypeptide that is produced and secreted by a cancer cell. Preferred growth inhibitory anti-TAT antibodies, oligopeptides or organic molecules inhibit growth of TAT-expressing tumor cells by greater than 20%, preferably from about 20% to about 50%, and even more preferably, by greater than 50% (e.g., from

WO 02/16602

PCT/US01/26626

about 50% to about 100%) as compared to the appropriate control, the control typically being tumor cells not treated with the antibody, oligopeptide or other organic molecule being tested. In one embodiment, growth inhibition can be measured at an antibody concentration of about 0.1 to 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or about 0.5 nM to 200 nM in cell culture, where the growth inhibition is determined 1-10 days after exposure of the tumor cells to the antibody. Growth inhibition of tumor cells *in vivo* can be determined in various ways such as is described in the Experimental Examples section below. The antibody is growth inhibitory *in vivo* if administration of the anti-TAT antibody at about 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 100 mg/kg body weight results in reduction in tumor size or tumor cell proliferation within about 5 days to 3 months from the first administration of the antibody, preferably within about 5 to 30 days.

An antibody, oligopeptide or other organic molecule which "induces apoptosis" is one which induces programmed cell death as determined by binding of annexin V, fragmentation of DNA, cell shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell fragmentation, and/or formation of membrane vesicles (called apoptotic bodies). The cell is usually one which overexpresses a TAT polypeptide. Preferably the cell is a tumor cell, e.g., a prostate, breast, ovarian, stomach, endometrial, lung, kidney, colon, bladder cell. Various methods are available for evaluating the cellular events associated with apoptosis. For example, phosphatidyl serine (PS) translocation can be measured by annexin binding; DNA fragmentation can be evaluated through DNA laddering; and nuclear/chromatin condensation along with DNA fragmentation can be evaluated by any increase in hypodiploid cells. Preferably, the antibody, oligopeptide or other organic molecule which induces apoptosis is one which results in about 2 to 50 fold, preferably about 5 to 50 fold, and most preferably about 10 to 50 fold, induction of annexin binding relative to untreated cell in a annexin binding assay.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody, and vary with the antibody isotype. Examples of antibody effector functions include: Clq binding and complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g., B cell receptor); and B cell activation.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" or "ADCC" refers to a form of cytotoxicity in which secreted Ig bound onto Fc receptors (FcRs) present on certain cytotoxic cells (e.g., Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) enable these cytotoxic effector cells to bind specifically to an antigen-bearing target cell and subsequently kill the target cell with cytotoxins. The antibodies "arm" the cytotoxic cells and are absolutely required for such killing. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc γ RIII only, whereas monocytes express Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,900,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes et al. (USA) 95:652-656 (1998).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

- "Fc receptor" or "FcR" describes a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. Fc γ RI receptors include Fc γ RIIA (an "activating receptor") and Fc γ RIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor Fc γ RIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor Fc γ RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see review M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995).
- Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least Fc γ RIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source, e.g., from blood.

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the lysis of a target cell in the presence of complement. Activation of the classical complement pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to antibodies (of the appropriate subclass) which are bound to their cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g., as described in Gazzano-Santoro et al., *I. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (e.g., epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the urinary tract, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, melanoma, multiple myeloma and B-cell lymphoma, brain, as well as head and neck cancer, and associated metastases.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

An antibody, oligopeptide or other organic molecule which "induces cell death" is one which causes a viable cell to become nonviable. The cell is one which expresses a TAT polypeptide, preferably a cell that

WO 02/16602

PCT/US01/26626

overexpresses a TAT polypeptide as compared to a normal cell of the same tissue type. The TAT polypeptide may be a transmembrane polypeptide expressed on the surface of a cancer cell or may be a polypeptide that is produced and secreted by a cancer cell. Preferably, the cell is a cancer cell, e.g., a breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic or bladder cell. Cell death *in vitro* may be determined in the absence of complement and immune effector cells to distinguish cell death induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). Thus, the assay for cell death may be performed using heat inactivated serum (i.e., in the absence of complement) and in the absence of immune effector cells. To determine whether the antibody, oligopeptide or other organic molecule is able to induce cell death, loss of membrane integrity as evaluated by uptake of propidium iodide (PI), trypan blue (see Moore et al. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) or 7AAD can be assessed relative to untreated cells. Preferred cell death-inducing antibodies, oligopeptides or other organic molecules are those which induce PI uptake in the PI uptake assay in BT474 cells.

A "TAT-expressing cell" is a cell which expresses an endogenous or transfected TAT polypeptide either on the cell surface or in a secreted form. A "TAT-expressing cancer" is a cancer comprising cells that have a TAT polypeptide present on the cell surface or that produce and secrete a TAT polypeptide. A "TAT-expressing cancer" optionally produces sufficient levels of TAT polypeptide on the surface of cells thereof, such that an anti-TAT antibody, oligopeptide or other organic molecule can bind thereto and have a therapeutic effect with respect to the cancer. In another embodiment, a "TAT-expressing cancer" optionally produces and secretes sufficient levels of TAT polypeptide, such that an anti-TAT antibody, oligopeptide or other organic molecule antagonist can bind thereto and have a therapeutic effect with respect to the cancer. With regard to the latter, the antagonist may be an antisense oligonucleotide which reduces, inhibits or prevents production and secretion of the secreted TAT polypeptide by tumor cells. A cancer which "overexpresses" a TAT polypeptide is one which has significantly higher levels of TAT polypeptide at the cell surface thereof, or produces and secretes, compared to a noncancerous cell of the same tissue type. Such overexpression may be caused by gene amplification or by increased transcription or translation. TAT polypeptide overexpression may be determined in a diagnostic or prognostic assay by evaluating increased levels of the TAT protein present on the surface of a cell, or secreted by the cell (e.g., via an immunohistochemistry assay using anti-TAT antibodies prepared against an isolated TAT polypeptide which may be prepared using recombinant DNA technology from an isolated nucleic acid encoding the TAT polypeptide; FACS analysis, etc.). Alternatively, or additionally, one may measure levels of TAT polypeptide-encoding nucleic acid or mRNA in the cell, e.g., via fluorescent *in situ* hybridization using a nucleic acid based probe corresponding to a TAT-encoding nucleic acid or the complement thereof; (FISH; see WO98/45479 published October, 1998), Southern blotting, Northern blotting, or polymerase chain reaction (PCR) techniques, such as real time quantitative PCR (RT-PCR). One may also study TAT polypeptide overexpression by measuring shed antigen in a biological fluid such as serum, e.g., using antibody-based assays (see also, e.g., U.S. Patent No. 4,933,294 issued June 12, 1990; WO91/05264 published April 18, 1991; U.S. Patent 5,401,638 issued March 28, 1995; and Sias et al., *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Aside from the above assays, various *in vivo* assays are available to the skilled practitioner. For example, one may expose cells within the body of the patient to an antibody which is optionally labeled with a

WO 02/16602

PCT/US01/26626

detectable label, e.g., a radioactive isotope, and binding of the antibody to cells in the patient can be evaluated, e.g., by external scanning for radioactivity or by analyzing a biopsy taken from a patient previously exposed to the antibody.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody, oligopeptide or other organic molecule so as to generate a "labeled" antibody, oligopeptide or other organic molecule. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents e.g., methotrexate, Adriamycin, vinca alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below. Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially a TAT-expressing cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of TAT-expressing cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vinca (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the

WO 02/16602

PCT/US01/26626

European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

"Doxorubicin" is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of doxorubicin is (8S-cis)-10-[*(3*-amino-*2,3,6*-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-*7,8,9,10*-tetrahydro-*6,8,11*-trihydroxy-*8*-(hydroxyacetyl)-*1*-methoxy-*5,12*-naphthacenedione.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prorelaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen; tumor necrosis factor- α and - β ; müllerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon - α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; a tumor necrosis factor such as TNF- α or TNF- β ; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

WO 02/16602

PCT/US91/26626

Table 1

40

45

50

55

Table 1 (cont')

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
5
#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPI 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */
10
#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO 8 /* penalty for a gap */
#define DINSI 1 /* penalty per base */
15
#define PDNS0 8 /* penalty for a gap */
#define PDNS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for delay) */
20
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short jnum; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};
25

30
struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPI]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPI]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

35
char *ofile; /* output file name */
char *nameq[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw0 */
40
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
45
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw0 */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
50
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *_calloc();
55

```

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Table 1 (cont')

```

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

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

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

main(ac, av)
{
    int ac;
    char *av[];
    {
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
            fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
            fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
            fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
            fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '>' are ignored\n");
            fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
            exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &lcn0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &lcn1);
        xbm = (dnm)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out"; /* output file */

        nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps(); /* get the actual jmps */
        print(); /* print stats, alignment */

        cleanup(); /* unlink any tmp files */
    }
}

```

Table 1 (cont')

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seqy.
 */
nw0
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register  id;              /* diagonal index */
    register  ij;              /* jmp index */
    register  *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;           /* index into seqs */
dx = (struct diag *)g_malloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_malloc("get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dnu)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dnu)? DINS1 : PINS1;
smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;           /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

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

```

60

Table 1 (cont?)

```

...nw

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

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

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

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

```

55

60

Table 1 (cont')

```

...nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
5   else if (delsx >= dely[yy]) {
        col1[yy] = delx;
        ij = dx[id].jmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelsx >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].jmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].jmp = 0;
            }
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelsx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
20   }
        else {
            col1[yy] = dely[yy];
            ij = dx[id].jmp;
            if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                dx[id].jmp++;
                if (++ij >= MAXJMP) {
                    writejmps(id);
                    ij = dx[id].jmp = 0;
                }
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -dely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
35   }
            if (xx == len0 && yy < len1) {
                /* last col
                */
                if (endgaps)
                    col1(yy) -= ins0+ins1*(len1-yy);
                if (col1(yy) > smax) {
                    smax = col1(yy);
                    dmax = id;
                }
                }
                }
50   if (endgaps && xx < len0)
        col1(yy-1) -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1(yy-1) > smax) {
            smax = col1(yy-1);
            dmax = id;
        }
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
55   }
        (void) free((char *)ndely);
        (void) free((char *)dely);
        (void) free((char *)col0);
        (void) free((char *)col1);
60

```

Table 1 (cont')

```

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

15 #include "nv.h"

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

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

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

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

```

60

Table 1 (cont?)

```

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

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

    nm = 0;
25   while (*p0 && *p1) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
30   else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
35   else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].x[i0]+++
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].x[i1]++;
        p0++;
        p1++;
    }
45   }

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
50   if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
55   pct = 100.0*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match %s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

60

Table 1 (cont.)

```

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

    sprintf(fx, "> gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
10     (void) sprintf(outx, " (%d %s%g)",
          ngapy, (dma)? "base":"residue", (ngapy == 1)? ":" );
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

if (dma)
15   fprintf(fx,
      "\u001au< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\u001a",
      smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
else
20   fprintf(fx,
      "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
      smax, PINS0, PINS1);

if (endgaps)
25   fprintf(fx,
      "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%, right endgap: %d %s%sn",
      firstgap, (dma)? "base": "residue", (firstgap == 1)? ":" : "s",
      lastgap, (dma)? "base": "residue", (lastgap == 1)? ":" : "s");
else
30   fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");

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

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
45      static      pr_align();
pr_align()
{
    int      nn;           /* char count */
    int      more;
    register i;
50      for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(damex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ml[i] = 1;
        sz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqp[i];
        po[i] = out[i];
55      }
}

```

Table 1 (cont')

```

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

10     more++;

        if ((pp[i].spc) {           /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) {         /* in a gap */
            *po[i]++ = ' ';
            siz[i]--;
        }
        else {                    /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (nif[i] == pp[i].xij[i]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].nij[i] +;
                while (nif[i] == pp[i].xij[i])
                    siz[i] += pp[i].nij[i] +;
            }
            nif[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
60    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '\0';
}

```

Table 1 (cont?)

```

...dumpblock

5     (void) putc('\n', fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[0] && (*out[1] == ' ' || *(po[i]) == ' '))
          if (i == 0)
            nums(i);
          if (i == 0 && *out[1])
            stars();
10         putline();
          if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
          if (i == 1)
            nums(i);
15       }
     }

20   /* put out a number line: dumpblock()
 */
static
  numss(ix)                                nums
25 {   int      ix;    /* index in out[] holding seq line */
      char      nline[P_LINE];
      register  i, j;
      register char  *pn, *px, *py;
30   for (pn = nline, i = 0; i < imax+P_SPC; i++, pn++)
      *pn = ' ';
      for (j = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
          *pn = '-';
35   else {
          if ((i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j /= 10, px-)
              *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
              *px = '-';
          }
          else
            *pn = ' ';
45   }
      }
      *pn = '0';
      nc[ix] = i;
      for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
      (void) putc('\n', fx);
    }

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

```

Table 1 (cont')

```

...putline

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

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

20     /*
        * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumppblock()
        */
static
stars()                                stars
{
    int          i;
    register char    *p0, *p1, cx, *px;

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

35     for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xhm[*p0-'A']&xhm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nn++;
            }
            else if (ldna && day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '/';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
    }
    *px++ = cx;
}
50     *px++ = '\n';
    *px = '0';
}

```

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Table 1 (cont')

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
5 stripname(pn)
    char    *pn;      /* file name (may be path) */
{
    register char   *px, *py;
10   py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
15   if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(px));
}
20
```

25

30

35

40

45

50

55

60

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Table 1 (cont')

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- malloc() with error checkin
 5   * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nv.h"
#include <sys/file.h>

10  char  *jname = "/tmp/lóngXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE  *fj;

15  int   cleanup();                         /* cleanup tmp file */

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

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

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
45  exit(1);
}
    tlen = nlen = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
}
55  if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
}
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '0';
60

```

Table 1 (cont')

```

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

25     char * g_calloc(msg, nx, sz)
30     {
        char *msg;           /* program, calling routine */
        int nx, sz;          /* number and size of elements */
        char *px, *calloc();
35     if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
            if (*msg) {
                fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n",
                        prog, msg, nx, sz);
                exit(1);
            }
        }
        return(px);
    }

40     /* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
45     readjmps()
50     {
        int fd = -1;
        int siz, i0, il;
        register i, j, xx;
        if (i0) {
            (void) fclose(jf);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
        }
        for (i = i0 = il = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
            while (1) {
                for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                    ;
            }
        }
    }
60

```

Table 1 (cont.)

```

...readjmps

5      if (j < 0 && dx[dmax].offset && f) {
          (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
          (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
          dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
      }
      else
          break;
10     }
      if (i >= JMPIPS) {
          fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
          cleanup(1);
      }
15     if (j >= 0) {
          siz = dx[dmax].jp.n[j];
          xx = dx[dmax].jp.x[j];
          dmax += siz;
          if (siz < 0) { /* gap in second seq */
              pp[1].n[i1] = -siz;
              xx += siz;
              /* id = xx - yy + len1 - 1
               */
              pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
              gapxy++;
              ngapxy -= siz;
          }
          /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
          siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
          i1++;
      }
20     else if (ciz > 0) { /* gap in first seq */
          pp[0].n[i0] = siz;
          pp[0].x[i0] = xx;
          gappx++;
          ngapx += siz;
      }
      /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
      siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
      i0++;
30     }
40     }
      else
          break;
  }
45     /* reverse the order of jmps
   */
50     for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
          i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
          i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
      }
      for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
          i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
          i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
      }
55     if (fd >= 0)
          (void) close(fd);
      if (!j) {
          (void) unlink(juname);
          jf = 0;
60     }
          offset = 0;
  }

```

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Table 1 (cont?)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
5   writejmps(ix)
    int      ix;
    {
        char    *mktemp0;

10  if (!f) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup();
        }
15  if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
20  (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

25

30

35

40

45

50

55

60

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Table 2

| | | |
|--------------------|----------------|---------------------------|
| TAT | XXXXXXXXXXXXXX | (Length = 15 amino acids) |
| Comparison Protein | XXXXXYYYYYYY | (Length = 12 amino acids) |

5 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the TAT polypeptide) =

10 5 divided by 15 = 33.3%

Table 3

| | | |
|--------------------|---------------|---------------------------|
| TAT | XXXXXXXXXX | (Length = 10 amino acids) |
| Comparison Protein | XXXXXYYYYYZZY | (Length = 15 amino acids) |

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the TAT polypeptide) =

20 5 divided by 10 = 50%

Table 4

| | | |
|----------------|-----------------|---------------------------|
| TAT-DNA | NNNNNNNNNNNNNN | (Length = 14 nucleotides) |
| Comparison DNA | NNNNNNLLLLLLLLL | (Length = 16 nucleotides) |

25 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the TAT-DNA nucleic acid sequence) =

30 6 divided by 14 = 42.9%

Table 5

| | | |
|----------------|--------------|---------------------------|
| TAT-DNA | NNNNNNNNNNNN | (Length = 12 nucleotides) |
| Comparison DNA | NNNNNLLVV | (Length = 9 nucleotides) |

5 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the TAT-DNA nucleic acid sequence) =

10 4 divided by 12 = 33.3%

II. Compositions and Methods of the Invention

A. Anti-TAT Antibodies

In one embodiment, the present invention provides anti-TAT antibodies which may find use herein as therapeutic and/or diagnostic agents. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies.

1. Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen (especially when synthetic peptides are used) to a protein that is immunogenic in the species to be immunized. For example, the antigen can be conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor, using a bifunctional or derivatizing agent, e.g., maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups.

25 Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, e.g., 100 μg or 5 μg of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later, the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to 14 days later, the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

2. Monoclonal Antibodies

30 Monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as described above to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. After immunization, lymphocytes are isolated and then fused with a myeloma cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

5 The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium which medium preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells (also referred to as fusion partner). For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the selective culture medium for the 10 hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred fusion partner myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a selective medium that selects against the unfused parental cells. Preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those 15 derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 and derivatives e.g., X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

20 Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

25 The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis described in Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Once hybridoma cells that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media 30 for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal e.g., by i.p. injection of the cells into mice.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional antibody purification procedures such as, for example, affinity chromatography (e.g., using protein A or protein G-Sepharose) or ion-exchange chromatography, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, etc.

35 DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the

WO 02/16602

PCT/US01/26626

heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

In a further embodiment, monoclonal antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clarkson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (*nM* range) human antibodies by chain shuffling (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA that encodes the antibody may be modified to produce chimeric or fusion antibody polypeptides, for example, by substituting human heavy chain and light chain constant domain (C_{H1} and C_{L1}) sequences for the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by fusing the immunoglobulin coding sequence with all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide (heterologous polypeptide). The non-immunoglobulin polypeptide sequences can substitute for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

3. Human and Humanized Antibodies

The anti-TAT antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise

WO 02/16602

PCT/US01/26626

at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity and HAMA response (human anti-mouse antibody) when the antibody is intended for human therapeutic use. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable domain sequences. The human V domain sequence which is closest to that of the rodent is identified and the human framework region (FR) within it accepted for the humanized antibody (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high binding affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Various forms of a humanized anti-TAT antibody are contemplated. For example, the humanized antibody may be an antibody fragment, such as a Fab, which is optionally conjugated with one or more cytotoxic

WO 02/16602

PCT/US01/26626

agent(s) in order to generate an immunoconjugate. Alternatively, the humanized antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody.

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array into such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, e.g., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno*, 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (all of GenPharm); 5,545,807; and WO 97/17852.

Alternatively, phage display technology (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats, reviewed in, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993).

Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). See, also, U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

As discussed above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see U.S. Patents 5,567,610 and 5,229,275).

4. Antibody fragments

In certain circumstances there are advantages of using antibody fragments, rather than whole antibodies.

The smaller size of the fragments allows for rapid clearance, and may lead to improved access to solid tumors. Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. Fab, Fv and ScFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli*, thus allowing the facile production of large amounts of these fragments. Antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

fragments (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and F(ab')₂ fragment with increased in vivo half-life comprising a salvage receptor binding epitope residues are described in U.S. Patent No. 5,869,046. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458. Fv and scFv are the only species with intact combining sites that are devoid of constant regions; thus, they are suitable for reduced nonspecific binding during in vivo use. scFv fusion proteins may be constructed to yield fusion of an effector protein at either the amino or the carboxy terminus of an scFv. See *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. The antibody fragment may also be a "linear antibody", e.g., as described in U.S. Patent 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

5. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of a TAT protein as described herein. Other such antibodies may combine a TAT binding site with a binding site for another protein. Alternatively, an anti-TAT arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD3), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16), so as to focus and localize cellular defense mechanisms to the TAT-expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express TAT. These antibodies possess a TAT-binding arm and an arm which binds the cytotoxic agent (e.g., saporin, anti-interferon- α , vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g., F(ab')₂) bispecific antibodies.

WO 96/16673 describes a bispecific anti-ErbB2/anti-FcγRIII antibody and U.S. Patent No. 5,837,234 discloses a bispecific anti-ErbB2/anti-FcγRI antibody. A bispecific anti-ErbB2/I^gc α antibody is shown in WO98/02463. U.S. Patent No. 5,821,337 teaches a bispecific anti-ErbB2/anti-CD3 antibody.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Milstein et al., *Nature* 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. Preferably, the fusion is with an Ig heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, C_H2, and C_H3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (C_H1) containing the site necessary for light chain bonding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and,

WO 02/16602

PCT/US01/26626

if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host cell. This provides for greater flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yield of the desired bispecific antibody. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains into a single expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios have no significant effect on the yield of the desired chain combination.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

According to another approach described in U.S. Patent No. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C₁3 domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g., tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g., alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/200373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan et al., *Science* 239:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent, sodium arsenite, to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethanolamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostely et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a V_H connected to a V_L by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 030891]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptopbutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

7. Multivalent Antibodies

A multivalent antibody may be internalized (and/or catabolized) faster than a bivalent antibody by a cell expressing an antigen to which the antibodies bind. The antibodies of the present invention can be multivalent antibodies (which are other than of the IgM class) with three or more antigen binding sites (e.g. tetravalent antibodies), which can be readily produced by recombinant expression of nucleic acid encoding the polypeptide chains of the antibody. The multivalent antibody can comprise a dimerization domain and three or more antigen binding sites. The preferred dimerization domain comprises (or consists of) an Fc region or a hinge region. In this scenario, the antibody will comprise an Fc region and three or more antigen binding sites amino-terminal

WO 02/16602

PCT/US01/26626

to the Fc region. The preferred multivalent antibody herein comprises (or consists of) three to about eight, but preferably four, antigen binding sites. The multivalent antibody comprises at least one polypeptide chain (and preferably two polypeptide chains), wherein the polypeptide chain(s) comprise two or more variable domains. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise VD1-(X1)_nVD2-(X2)_n-Fc, wherein VD1 is a first variable domain, VD2 is a second variable domain, Fc is one polypeptide chain of an Fc region, X1 and X2 represent an amino acid or polypeptide, and n is 0 or 1. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise: VH-CH1-flexible linker-VH-CH1-Fc region chain; or VH-CH1-VH-CH1-Fc region chain. The multivalent antibody herein preferably further comprises at least two (and preferably four) light chain variable domain polypeptides. The multivalent antibody herein may, for instance, comprise from about two to about eight light chain variable domain polypeptides. The light chain variable domain polypeptides contemplated here comprise a light chain variable domain and, optionally, further comprise a CL domain.

8. Effector Function Engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, e.g., so as to enhance antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) of the antibody. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of the antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in U.S. Patent 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

9. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a growth inhibitory agent, a toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are

WO 02/16602

PCT/US01/26626

available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{72}Bi , ^{131}I , ^{113}In , ^{99}Y , and ^{186}Re .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanato benzyl-3-methyl diethylenetriaminepentacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, a trichothene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

Maytansine and maytansinoids

In one preferred embodiment, an anti-TAT antibody (full length or fragments) of the invention is conjugated to one or more maytansinoid molecules.

Maytansinoids are mitotic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and derivatives and analogues thereof are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; and 4,371,533, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

Maytansinoid-antibody conjugates

In an attempt to improve their therapeutic index, maytansine and maytansinoids have been conjugated to antibodies specifically binding to tumor cell antigens. Immunoconjugates containing maytansinoids and their therapeutic use are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an *in vivo* tumor growth assay. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/neu oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested *in vitro* on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3×10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of

WO 02/16602

PCT/US01/26626

maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Anti-TAT polypeptide antibody-maytansinoid conjugates (immunoconjugates)

Anti-TAT antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an anti-TAT antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. An average of 3-4 maytansinoid molecules conjugated per antibody molecule has shown efficacy in enhancing cytotoxicity of target cells without negatively affecting the function or solubility of the antibody, although even one molecule of toxin/antibody would be expected to enhance cytotoxicity over the use of naked antibody. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, and Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992). The linking groups include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio) propionate (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylidithio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed by reaction with a hydroxyl group using conventional coupling techniques. The reaction may occur at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

Calicheamicin

Another immunoconjugate of interest comprises an anti-TAT antibody conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. For the preparation of conjugates of the calicheamicin family, see U.S. patents 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (all to

WO 02/16602

PCT/US01/26626

American Cyanamid Company). Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetyl- γ_1^1 , PSAG and δ^1_1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) and the aforementioned U.S. patents to American Cyanamid). Another anti-tumor drug that the antibody can be conjugated is QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of action and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

5 **Other cytotoxic agents**

Other antineoplastic agents that can be conjugated to the anti-TAT antibodies of the invention include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil, the family of agents known collectively LL-E33288 complex described in U.S. patents 5,053,394, 5,770,710, as well as esperamicins (U.S. patent 5,877,296).

10 Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the trichothecenes. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

15 The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (e.g., a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease; DNase).

For selective destruction of the tumor, the antibody may comprise a highly radioactive atom. A variety 20 of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated anti-TAT antibodies. Examples include A^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Ru^{188} , Sn^{113} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for diagnosis, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example Tc^{99m} or I^{123} , or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

25 The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as Tc^{99m} or I^{123} , Re^{186} , Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. 30 The IODOGEN method (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 can be used to incorporate iodine-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describes other methods in detail.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyl)dithio propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as

WO 02/16602

PCT/US01/26626

glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyl diethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

Alternatively, a fusion protein comprising the anti-TAT antibody and cytotoxic agent may be made, 10 e.g., by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed 15 by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

10. Immunoliposomes

The anti-TAT antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. A "liposome" 20 is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and WO97/38731 published October 23, 1997. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. 25 Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin 30 et al., *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent is optionally contained within the liposome. See Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

B. TAT Binding Oligopeptides

TAT binding oligopeptides of the present invention are oligopeptides that bind, preferably specifically, 35 to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding oligopeptides may be chemically synthesized using known oligopeptide synthesis methodology or may be prepared and purified using recombinant technology. TAT binding oligopeptides are usually at least about 5 amino acids in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,

WO 02/16602

PCT/US01/26626

- 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,
94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100 amino acids in length or more, wherein such oligopeptides that are capable of
binding, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding oligopeptides may be
identified without undue experimentation using well known techniques. In this regard, it is noted that techniques
5 for screening oligopeptide libraries for oligopeptides that are capable of specifically binding to a polypeptide
target are well known in the art (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092,
5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT Publication Nos. WO 84/03506 and WO84/03564; Geysen
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol.
10 Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al.
(1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, and Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668.

In this regard, bacteriophage (phage) display is one well known technique which allows one to screen
15 large oligopeptide libraries to identify member(s) of those libraries which are capable of specifically binding to
a polypeptide target. Phage display is a technique by which variant polypeptides are displayed as fusion proteins
to the coat protein on the surface of bacteriophage particles (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science 249:
386). The utility of phage display lies in the fact that large libraries of selectively randomized protein variants
or randomly cloned cDNAs can be rapidly and efficiently sorted for those sequences that bind to a target
20 molecule with high affinity. Display of peptide (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
87:6378) or protein (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature,
352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 88:8363) libraries on phage have been used for screening millions of polypeptides or oligopeptides for
ones with specific binding properties (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). Sorting phage
25 libraries of random mutants requires a strategy for constructing and propagating a large number of variants, a
procedure for affinity purification using the target receptor, and a means of evaluating the results of binding
enrichments. U.S. Patent Nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, and 5,663,143.

Although most phage display methods have used filamentous phage, lambdoid phage display systems
30 (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), T4 phage display systems (Ren, Z-J. et al. (1998) Gene 215:439; Zhu, Z.
1997) CAN 33:534; Jiang, J. et al. (1997) can 128:44380; Ren, Z-J. et al. (1997) CAN 127:215644; Ren, Z.J.
(1996) Protein Sci. 5:1833; Efimov, V. P. et al. (1995) Virus Genes 10:173) and T7 phage display systems
(Smith, G. P. and Scott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257; U.S. 5,766,905) are also known.

Many other improvements and variations of the basic phage display concept have now been developed.
These improvements enhance the ability of display systems to screen peptide libraries for binding to selected
35 target molecules and to display functional proteins with the potential of screening these proteins for desired
properties. Combinatorial reaction devices for phage display reactions have been developed (WO 98/14277) and
phage display libraries have been used to analyze and control bimolecular interactions (WO 98/20169; WO

WO 02/16602

PCT/US01/26626

98/20159) and properties of constrained helical peptides (WO 98/20036). WO 97/35196 describes a method of isolating an affinity ligand in which a phage display library is contacted with one solution in which the ligand will bind to a target molecule and a second solution in which the affinity ligand will not bind to the target molecule, to selectively isolate binding ligands. WO 97/46251 describes a method of biopanning a random phage display library with an affinity purified antibody and then isolating binding phage, followed by a micropanning process using microplate wells to isolate high affinity binding phage. The use of *Staphylococcus aureus* protein A as an affinity tag has also been reported (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9:187). WO 97/47314 describes the use of substrate subtraction libraries to distinguish enzyme specificities using a combinatorial library which may be a phage display library. A method for selecting enzymes suitable for use in detergents using phage display is described in WO 97/09446. Additional methods of selecting specific binding proteins are described in U.S. Patent Nos. 5,498,538, 5,432,018, and WO 98/15833.

Methods of generating peptide libraries and screening these libraries are also disclosed in U.S. Patent Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, and 5,723,323.

C. TAT Binding Organic Molecules

TAT binding organic molecules are organic molecules other than oligopeptides or antibodies as defined herein that bind, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein. TAT binding organic molecules may be identified and chemically synthesized using known methodology (see, e.g., PCT Publication Nos. WO00/0823 and WO00/39585). TAT binding organic molecules are usually less than about 2000 daltons in size, alternatively less than about 1500, 750, 500, 250 or 200 daltons in size, wherein such organic molecules that are capable of binding, preferably specifically, to a TAT polypeptide as described herein may be identified without undue experimentation using well known techniques. In this regard, it is noted that techniques for screening organic molecule libraries for molecules that are capable of binding to a polypeptide target are well known in the art (see, e.g., PCT Publication Nos. WO00/0823 and WO00/39585). TAT binding organic molecules may be, for example, aldehydes, ketones, oximes, hydrazones, semicarbazones, carbazides, primary amines, secondary amines, tertiary amines, N-substituted hydrazines, hydrazides, alcohols, ethers, thiols, thioethers, disulfides, carboxylic acids, esters, amides, ureas, carbamates, carbonates, ketals, thioketals, acetals, thioacetals, aryl halides, aryl sulfonates, alkyl halides, alkyl sulfonates, aromatic compounds, heterocyclic compounds, anilines, alkenes, alkynes, diols, amino alcohols, oxazolidines, oxazolines, thiazolidines, thiazolines, enamines, sulfonamides, epoxides, aziridines, isocyanates, sulfonyl chlorides, diazo compounds, acid chlorides, or the like.

D. Screening for Anti-TAT Antibodies, TAT Binding Oligopeptides and TAT Binding Organic Molecules With the Desired Properties

Techniques for generating antibodies, oligopeptides and organic molecules that bind to TAT polypeptides have been described above. One may further select antibodies, oligopeptides or other organic molecules with certain biological characteristics, as desired.

The growth inhibitory effects of an anti-TAT antibody, oligopeptide or other organic molecule of the invention may be assessed by methods known in the art, e.g., using cells which express a TAT polypeptide either

WO 02/16602

PCT/US01/26626

endogenously or following transfection with the TAT gene. For example, appropriate tumor cell lines and TAT-transfected cells may be treated with an anti-TAT monoclonal antibody, oligopeptide or other organic molecule of the invention at various concentrations for a few days (e.g., 2-7) days and stained with crystal violet or MTT or analyzed by some other colorimetric assay. Another method of measuring proliferation would be by comparing ^3H -thymidine uptake by the cells treated in the presence or absence of an anti-TAT antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule of the invention. After treatment, the cells are harvested and the amount of radioactivity incorporated into the DNA quantitated in a scintillation counter. Appropriate positive controls include treatment of a selected cell line with a growth inhibitory antibody known to inhibit growth of that cell line. Growth inhibition of tumor cells *in vivo* can be determined in various ways known in the art. Preferably, the tumor cell is one that overexpresses a TAT polypeptide. Preferably, the anti-TAT antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule will inhibit cell proliferation of a TAT-expressing tumor cell *in vitro* or *in vivo* by about 25-100% compared to the untreated tumor cell, more preferably, by about 30-100%, and even more preferably by about 50-100% or 70-100%, in one embodiment, at an antibody concentration of about 0.5 to 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Growth inhibition can be measured at an antibody concentration of about 0.5 to 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or about 0.5 nM to 200 nM in cell culture, where the growth inhibition is determined 1-10 days after exposure of the tumor cells to the antibody. The antibody is growth inhibitory *in vivo* if administration of the anti-TAT antibody at about 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 100 mg/kg body weight results in reduction in tumor size or reduction of tumor cell proliferation within about 5 days to 3 months from the first administration of the antibody, preferably within about 5 to 30 days.

To select for an anti-TAT antibody, TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule which induces cell death, loss of membrane integrity as indicated by, e.g., propidium iodide (PI), trypan blue or 7AAD uptake may be assessed relative to control. A PI uptake assay can be performed in the absence of complement and immune effector cells. TAT polypeptide-expressing tumor cells are incubated with medium alone or medium containing the appropriate anti-TAT antibody (e.g., at about 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TAT binding oligopeptide or TAT binding organic molecule. The cells are incubated for a 3 day time period. Following each treatment, cells are washed and aliquoted into 35 mm strainer-capped 12 x 75 tubes (1ml per tube, 3 tubes per treatment group) for removal of cell clumps. Tubes then receive PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Samples may be analyzed using a FACSCAN[®] flow cytometer and FACS CONVERT[™] CellQuest software (Becton Dickinson). Those anti-TAT antibodies, TAT binding oligopeptides or TAT binding organic molecules that induce statistically significant levels of cell death as determined by PI uptake may be selected as cell death-inducing anti-TAT antibodies, TAT binding oligopeptides or TAT binding organic molecules.

To screen for antibodies, oligopeptides or other organic molecules which bind to an epitope on a TAT polypeptide bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. This assay can be used to determine if a test antibody, oligopeptide or other organic molecule binds the same site or epitope as a known anti-TAT antibody. Alternatively, or additionally, epitope mapping can be performed by methods known in the art. For example, the antibody sequence can be mutagenized such as by alanine scanning, to identify contact residues. The mutant antibody is initially tested for binding with polyclonal

WO 02/16602

PCT/US01/26626

antibody to ensure proper folding. In a different method, peptides corresponding to different regions of a TAT polypeptide can be used in competition assays with the test antibodies or with a test antibody and an antibody with a characterized or known epitope.

E. Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy (ADEPT)

The antibodies of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (e.g., a peptidyl chemotherapeutic agent, see WO81/01145) to an active anti-cancer drug. See, for example, WO 88/07378 and U.S. Patent No. 4,975,278.

The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to convert it into its more active, cytotoxic form.

Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug, 5-fluorouracil; proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrug into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents; carbohydrate-cleaving enzymes such as β -galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β -lactamase useful for converting drugs derivatized with β -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin V amidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as "abzymes", can be used to convert the prodrugs of the invention into free active drugs (see, e.g., Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a tumor cell population.

The enzymes of this invention can be covalently bound to the anti-TAT antibodies by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional crosslinking reagents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of an antibody of the invention linked to at least a functionally active portion of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (see, e.g., Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984).

F. Full-Length TAT Polypeptides

The present invention also provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as TAT polypeptides. In particular, cDNAs (partial and full-length) encoding various TAT polypeptides have been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below.

As disclosed in the Examples below, various cDNA clones have been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequences of those clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clone using routine methods in the art. The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the TAT polypeptides and encoding nucleic acids described herein, in some cases, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with

WO 02/16602

PCT/US01/26626

the sequence information available at the time.

G. Anti-TAT Antibody and TAT Polypeptide Variants

In addition to the anti-TAT antibodies and full-length native sequence TAT polypeptides described herein, it is contemplated that anti-TAT antibody and TAT polypeptide variants can be prepared. Anti-TAT antibody and TAT polypeptide variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the encoding DNA, and/or by synthesis of the desired antibody or polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

Variations in the anti-TAT antibodies and TAT polypeptides described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the antibody or polypeptide that results in a change in the amino acid sequence as compared with the native sequence antibody or polypeptide. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

Anti-TAT antibody and TAT polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length native antibody or protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide.

Anti-TAT antibody and TAT polypeptide fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating antibody or polypeptide fragments by enzymatic digestion, e.g., by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired antibody or polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, anti-TAT antibody and TAT polypeptide fragments share at least one biological and/or immunological activity with the native anti-TAT antibody or TAT polypeptide disclosed herein.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

Table 6

| | Original Residue | Exemplary Substitutions | Preferred Substitutions |
|----|------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 5 | Ala (A) | val; leu; ile | val |
| | Arg (R) | lys; gln; asn | lys |
| 10 | Asn (N) | gln; his; lys; arg | gln |
| | Asp (D) | glu | glu |
| | Cys (C) | ser | ser |
| | Gln (Q) | asn | asn |
| | Glu (E) | asp | asp |
| 15 | Gly (G) | pro; ala | ala |
| | His (H) | asn; gln; lys; arg | arg |
| | Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; norleucine | leu |
| | Leu (L) | norleucine; ile; val; met; ala; phe | ile |
| 20 | Lys (K) | arg; gln; asn | arg |
| | Met (M) | leu; phe; ile | leu |
| | Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | leu |
| | Pro (P) | ala | ala |
| 25 | Ser (S) | thr | thr |
| | Thr (T) | ser | ser |
| | Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| | Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| 30 | Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; norleucine | leu |

Substantial modifications in function or immunochemical identity of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the anti-TAT antibody or TAT polypeptide variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the anti-TAT antibody or TAT polypeptide to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment). *

A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g., a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g., 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g., binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and human TAT polypeptide. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the anti-TAT antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared

WO 02/16602

PCT/US01/26626

variant or a non-variant version of the anti-TAT antibody.

H. Modifications of Anti-TAT Antibodies and TAT Polypeptides

Covalent modifications of anti-TAT antibodies and TAT polypeptides are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of an anti-TAT antibody or TAT polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking anti-TAT antibody or TAT polypeptide to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-TAT antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g., 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[*p*-azidophenyl]dithio]propioimidate.

Other modifications include deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the antibody or polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence anti-TAT antibody or TAT polypeptide (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence anti-TAT antibody or TAT polypeptide. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Glycosylation of antibodies and other polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylglactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the anti-TAT antibody or TAT polypeptide is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original anti-TAT antibody or TAT polypeptide (for O-linked glycosylation sites). The anti-TAT antibody or TAT polypeptide amino acid

WO 02/16602

PCT/US01/26626

sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the anti-TAT antibody or TAT polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the anti-TAT antibody or TAT polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the anti-TAT antibody or TAT polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of anti-TAT antibody or TAT polypeptide comprises linking the antibody or polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337. The antibody or polypeptide also may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization (for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively), in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

The anti-TAT antibody or TAT polypeptide of the present invention may also be modified in a way to form chimeric molecules comprising an anti-TAT antibody or TAT polypeptide fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide. The presence of such epitope-tagged forms of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the anti-TAT antibody or TAT polypeptide to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Faborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp et al.,

WO 02/16602

PCT/US01/26626

BioTechnology, 6:1204-1210 (1988); the KT3 epitope peptide [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; an α -tubulin epitope peptide [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of an anti-TAT antibody or TAT polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH₂ and CH₃, or the hinge, CH₁, CH₂ and CH₃ regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

1. Preparation of Anti-TAT Antibodies and TAT Polypeptides

The description below relates primarily to production of anti-TAT antibodies and TAT polypeptides by culturing cells transformed or transfected with a vector containing anti-TAT antibody- and TAT polypeptide-encoding nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare anti-TAT antibodies and TAT polypeptides. For instance, the appropriate amino acid sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the anti-TAT antibody or TAT polypeptide may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the desired anti-TAT antibody or TAT polypeptide.

1. Isolation of DNA Encoding Anti-TAT Antibody or TAT Polypeptide

DNA encoding anti-TAT antibody or TAT polypeptide may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the anti-TAT antibody or TAT polypeptide mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human anti-TAT antibody or TAT polypeptide DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue. The anti-TAT antibody- or TAT polypeptide-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

Libraries can be screened with probes (such as oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding anti-TAT antibody or TAT polypeptide is to use PCR methodology [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Techniques for screening a cDNA library are well known in the art. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ^{32}P -labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook et al., *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook et al., *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

2. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for anti-TAT antibody or TAT polypeptide production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook et al., *supra*.

Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaCl_2 , CaPO_4 , liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook et al., *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfactions have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen et al., *J Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g., polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) and Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative

WO 02/16602

PCT/US01/26626

or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting.

Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding protein endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 itvG kan'*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

Full length antibody, antibody fragments, and antibody fusion proteins can be produced in bacteria, in particular when glycosylation and Fc effector function are not needed, such as when the therapeutic antibody is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a toxin) and the immunoconjugate by itself shows effectiveness in tumor cell destruction. Full length antibodies have greater half life in circulation. Production in *E. coli* is faster and more cost efficient. For expression of antibody fragments and polypeptides in bacteria, see, e.g., U.S. 5,648,237 (Carter et al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), and U.S. 5,840,523 (Simmons et al.) which describes translation initiation region (TIR) and signal sequences for optimizing expression and secretion, these patents incorporated herein by reference. After expression, the antibody is isolated from the *E. coli* cell paste in a soluble fraction and can be purified through, e.g., a protein A or G column depending on the isotype. Final purification can be carried out similar to the process for purifying antibody expressed e.g., in CHO cells.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for anti-TAT antibody- or TAT polypeptide-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleet et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

[1979]; *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Methylotropic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species 5 that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated anti-TAT antibody or TAT polypeptide are derived 10 from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9, as well as plant cells, such as cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* have been identified. A variety of viral strains for 15 transfection are publicly available, e.g., the L-1 variant of *Autographa californica* NPV and the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV, and such viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey 20 kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for anti-TAT antibody 30 or TAT polypeptide production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

3. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding anti-TAT antibody or TAT polypeptide may 35 be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The TAT may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the anti-TAT antibody- or TAT polypeptide-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the anti-TAT antibody- or TAT polypeptide-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the anti-TAT antibody- or TAT polypeptide-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980);

WO 02/16602

PCT/US01/26626

EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding anti-TAT antibody or TAT polypeptide.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytchrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

Anti-TAT antibody or TAT polypeptide transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the anti-TAT antibody or TAT polypeptide by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter-enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the anti-TAT antibody or TAT polypeptide coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding anti-TAT antibody or TAT polypeptide.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of anti-TAT antibody or TAT polypeptide in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

4. Culturing the Host Cells

The host cells used to produce the anti-TAT antibody or TAT polypeptide of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham et al., *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

15. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence TAT polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to TAT DNA and encoding a specific antibody epitope.

30. Purification of Anti-TAT Antibody and TAT Polypeptide

Forms of anti-TAT antibody and TAT polypeptide may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (e.g. Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of anti-TAT antibody and TAT polypeptide can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

It may be desired to purify anti-TAT antibody and TAT polypeptide from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the anti-TAT antibody and TAT polypeptide. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular anti-TAT antibody or TAT polypeptide produced.

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Carter et al., *BioTechnology* 10:163-167 (1992) describe a procedure for isolating antibodies which are secreted to the periplasmic space of *E. coli*. Briefly, cell paste is thawed in the presence of sodium acetate (pH 3.5), EDTA, and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) over about 30 min. Cell debris can be removed by centrifugation. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants.

The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being the preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human γ 1, γ 2 or γ 4 heavy chains (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human γ 3 (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrene/divinylbenzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C₄3 domain, the Bakerbond ABX™resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25M salt).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

J. Pharmaceutical Formulations

Therapeutic formulations of the anti-TAT antibodies, TAT binding oligopeptides, TAT binding organic molecules and/or TAT polypeptides used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing the antibody, polypeptide, oligopeptide or organic molecule having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions.

- Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as acetate, Tris, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyltrimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; tonicifiers such as trehalose and sodium chloride; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; surfactant such as polysorbate; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN®, PLURONICS® or polyethylene glycol (PEG). The antibody preferably comprises the antibody at a concentration of between 5-200 mg/ml, preferably between 10-100 mg/ml.

The formulations herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, in addition to an anti-TAT antibody, TAT binding oligopeptide, or TAT binding organic molecule, it may be desirable to include in the one formulation, an additional antibody, e.g., a second anti-TAT antibody which binds a different epitope on the TAT polypeptide, or an antibody to some other target such as a growth factor that affects the growth of the particular cancer. Alternatively, or additionally, the composition may further comprise a chemotherapeutic agent, cytotoxic agent, cytokine, growth inhibitory agent, anti-hormonal agent, and/or cardioprotectant. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), poly(lactides) (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl

WO 02/16602

PCT/US01/26626

acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT® (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuproide acetate), and poly-D-(γ -3-hydroxybutyric acid).

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

5 K. Diagnosis and Treatment with Anti-TAT Antibodies, TAT Binding Oligopeptides and TAT Binding Organic Molecules

To determine TAT expression in the cancer, various diagnostic assays are available. In one embodiment, TAT polypeptide overexpression may be analyzed by immunoohistochemistry (IHC). Paraffin embedded tissue sections from a tumor biopsy may be subjected to the IHC assay and accorded a TAT protein staining intensity criteria as follows:

10 Score 0 - no staining is observed or membrane staining is observed in less than 10% of tumor cells.

Score 1+ - a faint/barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the tumor cells. The cells are only stained in part of their membrane.

Score 2+ - a weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

15 Score 3+ - a moderate to strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

Those tumors with 0 or 1+ scores for TAT polypeptide expression may be characterized as not overexpressing TAT, whereas those tumors with 2+ or 3+ scores may be characterized as overexpressing TAT.

20 Alternatively, or additionally, FISH assays such as the INFORM® (sold by Ventana, Arizona) or PATHVISION® (Vysis, Illinois) may be carried out on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue to determine the extent (if any) of TAT overexpression in the tumor.

TAT overexpression or amplification may be evaluated using an *in vivo* diagnostic assay, e.g., by administering a molecule (such as an antibody, oligopeptide or organic molecule) which binds the molecule to be detected and is tagged with a detectable label (e.g., a radioactive isotope or a fluorescent label) and externally scanning the patient for localization of the label.

25 As described above, the anti-TAT antibodies, oligopeptides and organic molecules of the invention have various non-therapeutic applications. The anti-TAT antibodies, oligopeptides and organic molecules of the present invention can be useful for diagnosis and staging of TAT polypeptide-expressing cancers (e.g., in radioimaging). The antibodies, oligopeptides and organic molecules are also useful for purification or immunoprecipitation of TAT polypeptide from cells, for detection and quantitation of TAT polypeptide *in vitro*, e.g., in an ELISA or a Western blot, to kill and eliminate TAT-expressing cells from a population of mixed cells as a step in the purification of other cells.

30 Currently, depending on the stage of the cancer, cancer treatment involves one or a combination of the following therapies: surgery to remove the cancerous tissue, radiation therapy, and chemotherapy. Anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule therapy may be especially desirable in elderly patients who do not tolerate the toxicity and side effects of chemotherapy well and in metastatic disease where radiation therapy has limited usefulness. The tumor targeting anti-TAT antibodies, oligopeptides and organic molecules of the

WO 02/16602

PCT/US01/26626

invention are useful to alleviate TAT-expressing cancers upon initial diagnosis of the disease or during relapse. For therapeutic applications, the anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule can be used alone, or in combination therapy with, e.g., hormones, antiangiogens, or radiolabelled compounds, or with surgery, cryotherapy, and/or radiotherapy. Anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule treatment can be administered in conjunction with other forms of conventional therapy, either consecutively with, pre- or post-conventional therapy. Chemotherapeutic drugs such as TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustine and mitoxantrone are used in treating cancer, in particular, in good risk patients. In the present method of the invention for treating or alleviating cancer, the cancer patient can be administered anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule in conjunction with treatment with the one or more of the preceding chemotherapeutic agents. In particular, combination therapy with paclitaxel and modified derivatives (see, e.g., EP0600517) is contemplated. The anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule will be administered with a therapeutically effective dose of the chemotherapeutic agent. In another embodiment, the anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule is administered in conjunction with chemotherapy to enhance the activity and efficacy of the chemotherapeutic agent, e.g., paclitaxel. The Physicians' Desk Reference (PDR) discloses dosages of these agents that have been used in treatment of various cancers. The dosing regimen and dosages of these aforementioned chemotherapeutic drugs that are therapeutically effective will depend on the particular cancer being treated, the extent of the disease and other factors familiar to the physician of skill in the art and can be determined by the physician.

In one particular embodiment, a conjugate comprising an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule conjugated with a cytotoxic agent is administered to the patient. Preferably, the immunoconjugate bound to the TAT protein is internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the cancer cell to which it binds. In a preferred embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with the nucleic acid in the cancer cell. Examples of such cytotoxic agents are described above and include maytansinoids, calicheamicins, ribonucleases and DNA endonucleases.

The anti-TAT antibodies, oligopeptides, organic molecules or toxin conjugates thereof are administered to a human patient, in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous or subcutaneous administration of the antibody, oligopeptide or organic molecule is preferred.

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule. The combined administration includes co-administration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities. Preferably such combined therapy results in a synergistic therapeutic effect.

It may also be desirable to combine administration of the anti-TAT antibody or antibodies, oligopeptides or organic molecules, with administration of an antibody directed against another tumor antigen associated with the particular cancer.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

In another embodiment, the therapeutic treatment methods of the present invention involves the combined administration of an anti-TAT antibody (or antibodies), oligopeptides or organic molecules and one or more chemotherapeutic agents or growth inhibitory agents, including co-administration of cocktails of different chemotherapeutic agents. Chemotherapeutic agents include estramustine phosphate, prednimustine, cisplatin, 5-fluorouracil, melphalan, cyclophosphamide, hydroxyurea and hydroxymustine (such as paclitaxel and doxetaxel) and/or anthracycline antibiotics. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in *Cancer Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

The antibody, oligopeptide or organic molecule may be combined with an anti-hormonal compound; e.g., an anti-estrogen compound such as tamoxifen; an anti-progesterone such as onapristone (see, EP 616 812); or an anti-androgen such as flutamide, in dosages known for such molecules. Where the cancer to be treated is androgen independent cancer, the patient may previously have been subjected to anti-androgen therapy and, after the cancer becomes androgen independent, the anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule (and optionally other agents as described herein) may be administered to the patient.

Sometimes, it may be beneficial to also co-administer a cardioprotectant (to prevent or reduce myocardial dysfunction associated with the therapy) or one or more cytokines to the patient. In addition to the above therapeutic regimes, the patient may be subjected to surgical removal of cancer cells and/or radiation therapy, before, simultaneously with, or post antibody, oligopeptide or organic molecule therapy. Suitable dosages for any of the above co-administered agents are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the agent and anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule.

For the prevention or treatment of disease, the dosage and mode of administration will be chosen by the physician according to known criteria. The appropriate dosage of antibody, oligopeptide or organic molecule will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody, oligopeptide or organic molecule is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, oligopeptide or organic molecule, and the discretion of the attending physician. The antibody, oligopeptide or organic molecule is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Preferably, the antibody, oligopeptide or organic molecule is administered by intravenous infusion or by subcutaneous injections. Depending on the type and severity of the disease, about 1 μ g/kg to about 50 mg/kg body weight (e.g., about 0.1-15mg/kg/dose) of antibody can be an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A dosing regimen can comprise administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the anti-TAT antibody. However, other dosage regimens may be useful. A typical daily dosage might range from about 1 μ g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. The progress of this therapy can be readily monitored by conventional methods and assays and based on criteria known to the physician or other persons of skill in the art.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Aside from administration of the antibody protein to the patient, the present application contemplates administration of the antibody by gene therapy. Such administration of nucleic acid encoding the antibody is encompassed by the expression "administering a therapeutically effective amount of an antibody". See, for example, WO96/07321 published March 14, 1996 concerning the use of gene therapy to generate intracellular antibodies.

- 5 There are two major approaches to getting the nucleic acid (optionally contained in a vector) into the patient's cells; *in vivo* and *ex vivo*. For *in vivo* delivery the nucleic acid is injected directly into the patient, usually at the site where the antibody is required. For *ex vivo* treatment, the patient's cells are removed, the nucleic acid is introduced into these isolated cells and the modified cells are administered to the patient either directly or, for example, encapsulated within porous membranes which are implanted into the patient (see, e.g.,
10 U.S. Patent Nos. 4,892,538 and 5,283,187). There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. A commonly used vector for *ex vivo* delivery of the
15 gene is a retroviral vector.

The currently preferred *in vivo* nucleic acid transfer techniques include transfection with viral vectors (such as adenovirus, Herpes simplex I virus, or adeno-associated virus) and lipid-based systems (useful lipids for lipid-mediated transfer of the gene are DOTMA, DOPE and DC-Chol, for example). For review of the currently known gene marking and gene therapy protocols see Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992).

20 See also WO 93/25673 and the references cited therein.

The anti-TAT antibodies of the invention can be in the different forms encompassed by the definition of "antibody" herein. Thus, the antibodies include full length or intact antibody, antibody fragments, native sequence antibody or amino acid variants, humanized, chimeric or fusion antibodies, immunoconjugates, and functional fragments thereof. In fusion antibodies an antibody sequence is fused to a heterologous polypeptide sequence. The antibodies can be modified in the Fc region to provide desired effector functions. As discussed in more detail in the sections herein, with the appropriate Fc regions, the naked antibody bound on the cell surface can induce cytotoxicity, e.g., via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or by recruiting complement in complement dependent cytotoxicity, or some other mechanism. Alternatively, where it is desirable to eliminate or reduce effector function, so as to minimize side effects or therapeutic complications, certain other Fc regions may be used.

In one embodiment, the antibody competes for binding or bind substantially to, the same epitope as the antibodies of the invention. Antibodies having the biological characteristics of the present anti-TAT antibodies of the invention are also contemplated, specifically including the *in vivo* tumor targeting and any cell proliferation inhibition or cytotoxic characteristics.

25 30 35 Methods of producing the above antibodies are described in detail herein.

The present anti-TAT antibodies, oligopeptides and organic molecules are useful for treating a TAT-expressing cancer or alleviating one or more symptoms of the cancer in a mammal. Such a cancer includes

WO 02/16602

PCT/US01/26626

prostate cancer, cancer of the urinary tract, lung cancer, breast cancer, colon cancer and ovarian cancer, more specifically, prostate adenocarcinoma, renal cell carcinomas, colorectal adenocarcinomas, lung adenocarcinomas, lung squamous cell carcinomas, and pleural mesothelioma. The cancers encompass metastatic cancers of any of the preceding. The antibody, oligopeptide or organic molecule is able to bind to at least a portion of the cancer cells that express TAT polypeptide in the mammal. In a preferred embodiment, the antibody, oligopeptide or organic molecule is effective to destroy or kill TAT-expressing tumor cells or inhibit the growth of such tumor cells, *in vitro* or *in vivo*, upon binding to TAT polypeptide on the cell. Such an antibody includes a naked anti-TAT antibody (not conjugated to any agent). Naked antibodies that have cytotoxic or cell growth inhibition properties can be further harnessed with a cytotoxic agent to render them even more potent in tumor cell destruction. Cytotoxic properties can be conferred to an anti-TAT antibody by, e.g., conjugating the antibody with a cytotoxic agent, to form an immunoconjugate as described herein. The cytotoxic agent or a growth inhibitory agent is preferably a small molecule. Toxins such as calicheamicin or a maytansinoid and analogs or derivatives thereof, are preferable.

The invention provides a composition comprising an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule of the invention, and a carrier. For the purposes of treating cancer, compositions can be administered to the patient in need of such treatment, wherein the composition can comprise one or more anti-TAT antibodies present as an immunoconjugate or as the naked antibody. In a further embodiment, the compositions can comprise these antibodies, oligopeptides or organic molecules in combination with other therapeutic agents such as cytotoxic or growth inhibitory agents, including chemotherapeutic agents. The invention also provides formulations comprising an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule of the invention, and a carrier. In one embodiment, the formulation is a therapeutic formulation comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

Another aspect of the invention is isolated nucleic acids encoding the anti-TAT antibodies. Nucleic acids encoding both the H and L chains and especially the hypervariable region residues, chains which encode the native sequence antibody as well as variants, modifications and humanized versions of the antibody, are encompassed.

The invention also provides methods useful for treating a TAT polypeptide-expressing cancer or alleviating one or more symptoms of the cancer in a mammal, comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule to the mammal. The antibody, oligopeptide or organic molecule therapeutic compositions can be administered short term (acute) or chronic, or intermittent as directed by physician. Also provided are methods of inhibiting the growth of, and killing a TAT polypeptide-expressing cell.

The invention also provides kits and articles of manufacture comprising at least one anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule. Kits containing anti-TAT antibodies, oligopeptides or organic molecules find use, e.g., for TAT cell killing assays, for purification or immunoprecipitation of TAT polypeptide from cells. For example, for isolation and purification of TAT, the kit can contain an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule coupled to beads (e.g., sepharose beads). Kits can be provided which contain the antibodies, oligopeptides or organic molecules for detection and quantitation of TAT *in vitro*, e.g., in an ELISA or a

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Western blot. Such antibody, oligopeptide or organic molecule useful for detection may be provided with a label such as a fluorescent or radiolabel.

L. Articles of Manufacture and Kits

Another embodiment of the invention is an article of manufacture containing materials useful for the treatment of anti-TAT expressing cancer. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for treating the cancer condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule of the invention. The label or package insert indicates that the composition is used for treating cancer. The label or package insert will further comprise instructions for administering the antibody, oligopeptide or organic molecule composition to the cancer patient. Additionally, the article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

Kits are also provided that are useful for various purposes, e.g., for TAT-expressing cell killing assays, for purification or immunoprecipitation of TAT polypeptide from cells. For isolation and purification of TAT polypeptide, the kit can contain an anti-TAT antibody, oligopeptides or organic molecule coupled to beads (e.g., sepharose beads). Kits can be provided which contain the antibodies, oligopeptides or organic molecules for detection and quantification of TAT polypeptide *in vitro*, e.g., in an ELISA or a Western blot. As with the article of manufacture, the kit comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. The container holds a composition comprising at least one anti-TAT antibody, oligopeptide or organic molecule of the invention. Additional containers may be included that contain, e.g., diluents and buffers, control antibodies. The label or package insert may provide a description of the composition as well as instructions for the intended *in vitro* or diagnostic use.

M. Uses for TAT Polypeptides and TAT-Polypeptide Encoding Nucleic Acids

Nucleotide sequences (or their complement) encoding TAT polypeptides have various applications in the art of molecular biology, including uses as hybridization probes, in chromosome and gene mapping and in the generation of anti-sense RNA and DNA probes. TAT-encoding nucleic acid will also be useful for the preparation of TAT polypeptides by the recombinant techniques described herein, wherein those TAT polypeptides may find use, for example, in the preparation of anti-TAT antibodies as described herein.

The full-length native sequence TAT gene, or portions thereof, may be used as hybridization probes for a cDNA library to isolate the full-length TAT cDNA or to isolate still other cDNAs (for instance, those encoding naturally-occurring variants of TAT or TAT from other species) which have a desired sequence identity to the native TAT sequence disclosed herein. Optionally, the length of the probes will be about 20 to about 50 bases. The hybridization probes may be derived from at least partially novel regions of the full length native

WO 02/16602

PCT/US01/26626

nucleotide sequence wherein those regions may be determined without undue experimentation or from genomic sequences including promoters, enhancer elements and introns of native sequence TAT. By way of example, a screening method will comprise isolating the coding region of the TAT gene using the known DNA sequence to synthesize a selected probe of about 40 bases. Hybridization probes may be labeled by a variety of labels, including radiomucleotides such as ^{32}P or ^{35}S , or enzymatic labels such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems. Labeled probes having a sequence complementary to that of the TAT gene of the present invention can be used to screen libraries of human cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of such libraries the probe hybridizes to. Hybridization techniques are described in further detail in the Examples below. Any EST sequences disclosed in the present application may similarly be employed as probes, using the methods disclosed herein.

Other useful fragments of the TAT-encoding nucleic acids include antisense or sense oligonucleotides comprising a single-stranded nucleic acid sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target TAT mRNA (sense) or TAT DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise a fragment of the coding region of TAT DNA. Such a fragment generally comprises at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon a cDNA sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) and van der Krol et al. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acid sequences results in the formation of duplexes that block transcription or translation of the target sequence by one of several means, including enhanced degradation of the duplexes, premature termination of transcription or translation, or by other means.

Such methods are encompassed by the present invention. The antisense oligonucleotides thus may be used to block expression of TAT proteins, wherein those TAT proteins may play a role in the induction of cancer in mammals. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO 91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (i.e., capable of resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleotide sequences.

Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10048, and other moieties that increases affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid sequence, such as poly-(L-lysine). Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by any gene transfer method, including, for example, CaPO₄-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus. In a preferred procedure, an antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Suitable retroviral

WO 02/16602

PCT/US01/26626

vectors include, but are not limited to, those derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors designated DCT5A, DCTS_B and DCTS_C (see WO 90/13641).

Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleotide sequence by formation of a conjugate with a ligand binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand binding molecule does not substantially interfere with the ability of the ligand binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

Antisense or sense RNA or DNA molecules are generally at least about 5 nucleotides in length, alternatively at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, or 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about"

means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length.

The probes may also be employed in PCR techniques to generate a pool of sequences for identification of closely related TAT coding sequences.

Nucleotide sequences encoding a TAT can also be used to construct hybridization probes for mapping the gene which encodes that TAT and for the genetic analysis of individuals with genetic disorders. The nucleotide sequences provided herein may be mapped to a chromosome and specific regions of a chromosome using known techniques, such as *in situ* hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, and hybridization screening with libraries.

When the coding sequences for TAT encode a protein which binds to another protein (example, where the TAT is a receptor), the TAT can be used in assays to identify the other proteins or molecules involved in the binding interaction. By such methods, inhibitors of the receptor/ligand binding interaction can be identified. Proteins involved in such binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction. Also, the receptor TAT can be used to isolate correlative ligand(s). Screening assays can be designed to find lead compounds that mimic the biological activity of a native TAT or a receptor for TAT. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and

WO 02/16602

PCT/US01/26626

cell based assays, which are well characterized in the art.

Nucleic acids which encode TAT or its modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding TAT can be used to clone genomic DNA encoding TAT in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding TAT. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for TAT transgene incorporation with tissue-specific enhancers. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding TAT introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding TAT. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the pathological condition, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

Alternatively, non-human homologues of TAT can be used to construct a TAT "knock out" animal which has a defective or altered gene encoding TAT as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding TAT and altered genomic DNA encoding TAT introduced into an embryonic stem cell of the animal. For example, cDNA encoding TAT can be used to clone genomic DNA encoding TAT in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding TAT can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their development of pathological conditions due to absence of the TAT polypeptide.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Nucleic acid encoding the TAT polypeptides may also be used in gene therapy. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA.

5 Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by 10 uncharged groups.

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. The currently preferred *in vivo* gene transfer techniques include transfection with viral (typically retroviral) vectors and viral coat protein-liposome mediated transfection (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with 15 an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof specific for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 20 4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). For review of gene marking and gene therapy protocols see Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

The nucleic acid molecules encoding the TAT polypeptides or fragments thereof described herein are useful for chromosome identification. In this regard, there exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since relatively few chromosome marking reagents, based upon actual sequence data are presently available. Each TAT nucleic acid molecule of the present invention can be used as a chromosome marker.

20 The TAT polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may also be used diagnostically for tissue typing, wherein the TAT polypeptides of the present invention may be differentially expressed in one tissue as compared to another, preferably in a diseased tissue as compared to a normal tissue of the same tissue type. TAT nucleic acid molecules will find use for generating probes for PCR, Northern analysis, Southern analysis and Western analysis.

25 This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic the TAT polypeptide (agonists) or prevent the effect of the TAT polypeptide (antagonists). Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the TAT polypeptides

WO 02/16602

PCT/US01/26626

encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins, including e.g., inhibiting the expression of TAT polypeptide from cells. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with a TAT polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the TAT polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the TAT polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the TAT polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular TAT polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, e.g., cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL4-lacZ reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for β -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKERTM) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-

WO 02/16602

PCT/US01/26626

hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

Compounds that interfere with the interaction of a gene encoding a TAT polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

To assay for antagonists, the TAT polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the TAT polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the TAT polypeptide. Alternatively, antagonists may be detected by combining the TAT polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound TAT polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The TAT polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of TAT polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the TAT polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfet COS cells or other cells that are not responsive to the TAT polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled TAT polypeptide. The TAT polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, labeled TAT polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro- sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with labeled TAT polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of

WO 02/16602

PCT/US01/26626

the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with TAT polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments.

5 Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the TAT polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the TAT polypeptide.

Another potential TAT polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature TAT polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney et al., *Science*, 241: 456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251:1360 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the TAT polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the TAT polypeptide (antisense - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the TAT polypeptide. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the TAT polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the TAT polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. 30 Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded 35 and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO

WO 02/16602

PCT/US01/26626

97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

Isolated TAT polypeptide-encoding nucleic acid can be used herein for recombinantly producing TAT polypeptide using techniques well known in the art and as described herein. In turn, the produced TAT polypeptides can be employed for generating anti-TAT antibodies using techniques well known in the art and as described herein.

Antibodies specifically binding a TAT polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders, including cancer, in the form of pharmaceutical compositions.

If the TAT polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EXAMPLE 1: Identification of TAT Polypeptides and/or Encoding Nucleic Acids by GEPIS

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and interesting EST sequences were identified by GEPIS. Gene expression profiling *in silico* (GEPIS) is a bioinformatics tool developed at Genentech, Inc. that characterizes genes of interest for new cancer therapeutic targets. GEPIS takes advantage of large amounts of EST sequence and library information to

WO 02/16602

PCT/US01/26626

determine gene expression profiles. GEPIS is capable of determining the expression profile of a gene based upon its proportional correlation with the number of its occurrences in EST databases, and it works by integrating the LIFESEQ® EST relational database and Genentech proprietary information in a stringent and statistically meaningful way. In this example, GEPIS is used to identify and cross-validate novel tumor antigens, although GEPIS can be configured to perform either very specific analyses or broad screening tasks. For the initial screen, GEPIS is used to identify EST sequences from the LIFESEQ® database that correlate to expression in a particular tissue or tissues of interest (often a tumor tissue of interest). The EST sequences identified in this initial screen (or consensus sequences obtained from aligning multiple related and overlapping EST sequences obtained from the initial screen) were then subjected to a screen intended to identify the presence of at least one transmembrane domain in the encoded protein. Finally, GEPIS was employed to generate a complete tissue expression profile for the various sequences of interest. Using this type of screening bioinformatics, various TAT polypeptides (and their encoding nucleic acid molecules) were identified as being significantly overexpressed in a particular type of cancer or certain cancers as compared to other cancers and/or normal non-cancerous tissues. The rating of GEPIS hits is based upon several criteria including, for example, tissue specificity, tumor specificity and expression level in normal essential and/or normal proliferating tissues. The following is a list of molecules whose tissue expression profile as determined by GEPIS evidences high tissue expression and significant upregulation of expression in a specific tumor or tumors as compared to other tumor(s) and/or normal tissues and optionally relatively low expression in normal essential and/or normal proliferating tissues. As such, the molecules listed below are excellent polypeptide targets for the diagnosis and therapy of cancer in mammals.

| | Molecule | <u>upregulation of expression in:</u> | <u>as compared to:</u> |
|----|------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| 20 | DNA71290-1630 (TAT169) | breast tumor | normal breast tissue |
| | DNA71290-1630 (TAT169) | lung tumor | normal lung tissue |
| | DNA71290-1630 (TAT169) | liver tumor | normal liver tissue |
| | DNA71290-1630 (TAT169) | stomach tumor | normal stomach tissue |
| 25 | DNA76393-1664 (TAT170) | breast tumor | normal breast tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | colon tumor | normal colon tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | lung tumor | normal lung tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | kidney tumor | normal kidney tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | liver tumor | normal liver tissue |
| 30 | DNA76393-1664 (TAT170) | ovary tumor | normal ovary tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | pancreas tumor | normal pancreas tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | prostate tumor | normal prostate tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | rectum tumor | normal rectum tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | brain tumor | normal brain tissue |
| 35 | DNA76393-1664 (TAT170) | stomach tumor | normal stomach tissue |
| | DNA76393-1664 (TAT170) | uterus tumor | normal uterus tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | prostate tumor | normal prostate tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | pancreas tumor | normal pancreas tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | skin tumor | normal skin tissue |
| 40 | DNA53971-1359 (TAT171) | breast tumor | normal breast tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | colon tumor | normal colon tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | kidney tumor | normal kidney tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | liver tumor | normal liver tissue |
| | DNA53971-1359 (TAT171) | stomach tumor | normal stomach tissue |
| 45 | DNA53971-1359 (TAT171) | neuroendocrine tumor | normal neuroendocrine tissue |

WO 02/16602

PCT/US01/26626

| <u>Molecule</u> | <u>upregulation of expression in:</u> | <u>as compared to:</u> |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| DNA53971-1359 (TAT171) | nervous system tumor | normal nervous system tissue |
| DNA53971-1359 (TAT171) | thymus tumor | normal thymus tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | uterus tumor | normal uterus tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | ovary tumor | normal ovary tissue |
| 5 DNA56439-1376 (TAT172) | breast tumor | normal breast tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | colon tumor | normal colon tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | kidney tumor | normal kidney tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | pancreas tumor | normal pancreas tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | prostate tumor | normal prostate tissue |
| 10 DNA56439-1376 (TAT172) | skin tumor | normal skin tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | liver tumor | normal liver tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | pituitary tumor | normal pituitary tissue |
| DNA56439-1376 (TAT172) | nervous system tumor | normal nervous system tissue |

15 EXAMPLE 2: Tissue Expression Profiling Using GeneExpress®

A proprietary database containing gene expression information (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) was analyzed in an attempt to identify polypeptides (and their encoding nucleic acids) whose expression is significantly upregulated in a particular tumor tissue(s) of interest as compared to other tumor(s) and/or normal tissues. Specifically, analysis of the GeneExpress® database was conducted using either software available through Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, for use with the GeneExpress® database or with proprietary software written and developed at Genentech, Inc. for use with the GeneExpress® database. The rating of positive hits in the analysis is based upon several criteria including, for example, tissue specificity, tumor specificity and expression level in normal essential and/or normal proliferating tissues. The following is a list of molecules whose tissue expression profile as determined from an analysis of the GeneExpress® database evidences high tissue expression and significant upregulation of expression in a specific tumor or tumors as compared to other tumor(s) and/or normal tissues and optionally relatively low expression in normal essential and/or normal proliferating tissues. As such, the molecules listed below are excellent polypeptide targets for the diagnosis and therapy of cancer in mammals.

| | <u>Molecule</u> | <u>upregulation of expression in:</u> | <u>as compared to:</u> |
|----|------------------------|---|---|
| 30 | DNA71290-1630 (TAT169) | breast tumor stomach tumor lung tumor liver tumor | normal tissues tumor tissues breast stomach lung liver |
| 35 | DNA76393-1664 (TAT170) | breast tumor colon tumor lung tumor liver tumor stomach tumor kidney tumor pancreas tumor prostate tumor uterus tumor rectum tumor ovary tumor brain tumor | breast colon lung liver stomach kidney pancreas prostate uterus rectum ovary brain |
| 40 | | | |
| 45 | | | |

EXAMPLE 3: Use of TAT as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding TAT as a hybridization probe for, i.e., diagnosis of the presence of a tumor in a mammal.

DNA comprising the coding sequence of full-length or mature TAT as disclosed herein can also be employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of TAT) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled TAT-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

5 DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence TAT can then be identified using standard techniques known in the art.

EXAMPLE 4: Expression of TAT in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of TAT by recombinant expression in 10 *E. coli*.

The DNA sequence encoding TAT is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR 15 amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyHis leader (including the first six STII codons, polyHis sequence, and enterokinase cleavage site), the TAT coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

20 The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook et al., *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

25 Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell 30 pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized TAT protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

TAT may be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA 35 encoding TAT is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(facIq)). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml

WO 02/16602

PCT/US01/26626

carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g sodium citrate•2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 1.10 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO₄) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

5 *E. coli* paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein are pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

10 The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The 15 refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the 20 solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance 25 are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin 30 from the samples.

Fractions containing the desired folded TAT polypeptide are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

35 Certain of the TAT polypeptides disclosed herein have been successfully expressed and purified using this technique(s).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

EXAMPLE 5: Expression of TAT in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of TAT by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the TAT DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the TAT DNA using ligation methods such as described in Sambrook et al., *supra*. The resulting vector is called pRK5-TAT.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 µg pRK5-TAT DNA is mixed with about 1 µg DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya et al., *Cell*, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 µl of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. To this mixture is added, dropwise, 500 µl of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 µCi/ml ³⁵S-cysteine and 200 µCi/ml ³⁵S-methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of TAT polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, TAT may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompanyrac et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 µg pRK5-TAT DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 µg/ml bovine insulin and 0.1 µg/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed TAT can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment, TAT can be expressed in CHO cells. The pRK5-TAT can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO₄ or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ³⁵S-methionine. After determining the presence of TAT polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed TAT can then be concentrated and purified by any selected method.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Epitope-tagged TAT may also be expressed in host CHO cells. The TAT may be subcloned out of the PRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged TAT insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged TAT can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni²⁺-chelate affinity chromatography.

5 TAT may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed 10 as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (e.g. extracellular domains) of the respective proteins are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or is a poly-His tagged form.

15 Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used expression in CHO cells is as described in Lucas et al., *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

20 Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect® (Qiagen), Dospel® or Fugene® (Boehringer Mannheim). The cells are grown as described in Lucas et al., *supra*. Approximately 3 × 10⁷ cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

25 The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2 μm filtered PS20 with 5% 0.2 μm diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL, 30 and 2000 mL spinners are seeded with 3 × 10⁵ cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at 1.2 × 10⁶ cells/mL. On day 0, the cell number pH is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (e.g., 35% polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 35

WO 02/16602

PCT/US01/26626

70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22 μm filter. The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfun (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc-containing) constructs are purified from the conditioned media as follows. The 10 conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 μL of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed 15 by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

Certain of the TAT polypeptides disclosed herein have been successfully expressed and purified using this technique(s).

EXAMPLE 6: Expression of TAT in Yeast

The following method describes recombinant expression of TAT in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of TAT from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding TAT and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of TAT. For secretion, DNA encoding TAT can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native TAT 25 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of TAT.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with 30 Coomassie Blue stain.

Recombinant TAT can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing TAT may further be purified using selected column chromatography resins.

Certain of the TAT polypeptides disclosed herein have been successfully expressed and purified using 35 this technique(s).

WO 02/16602

PCT/US01/26626

EXAMPLE 7: Expression of TAT in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of TAT in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for TAT is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding TAT or the desired portion of the coding sequence of TAT such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

10 Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilly et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

15 Expressed poly-his tagged TAT can then be purified, for example, by Ni²⁺-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert et al., *Nature*, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 µm filter. A Ni²⁺-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A₂₈₀ with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A₂₈₀ baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni²⁺-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₁₀-tagged TAT are pooled and dialyzed against loading buffer.

20 Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) TAT can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

Certain of the TAT polypeptides disclosed herein have been successfully expressed and purified using this technique(s).

EXAMPLE 8: Preparation of Antibodies that Bind TAT

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind TAT.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include purified TAT, fusion proteins containing TAT, and cells expressing recombinant TAT on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

Mice, such as Balb/c, are immunized with the TAT immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-TAT antibodies.

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of TAT. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against TAT. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against TAT is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-TAT monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

Antibodies directed against certain of the TAT polypeptides disclosed herein have been successfully produced using this technique(s).

EXAMPLE 9: Purification of TAT Polypeptides Using Specific Antibodies

Native or recombinant TAT polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-TAT polypeptide, mature TAT polypeptide, or pre-TAT polypeptide is purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the TAT polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the anti-TAT polypeptide antibody to an activated chromatographic resin.

Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Fiscaaway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CnBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody

WO 02/16602

PCT/US01/26626

is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of TAT polypeptide by preparing a fraction from cells containing TAT polypeptide in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble TAT polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

A soluble TAT polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of TAT polypeptide (*e.g.*, high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/TAT polypeptide binding (*e.g.*, a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotropic such as urea or thiocyanate ion), and TAT polypeptide is collected.

Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

15

Table 7

| Material | ATCC Dep. No. | Deposit Date |
|---------------|---------------|--------------------|
| DNA71290-1630 | 203275 | September 22, 1998 |
| DNA76393-1664 | 203323 | October 6, 1998 |
| DNA53971-1359 | 209750 | April 7, 1998 |
| DNA56439-1376 | 209864 | May 14, 1998 |
| DNA64852-1589 | 230127 | August 18, 1998 |

These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposits will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the

WO 02/16602

PCT/US01/26626

deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 02/16602

PCT/US01/26626

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody which binds to a polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
5 (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
(c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
10 (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
(e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
15 (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or
(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.
- 20 2. The antibody of Claim 1 which binds to a polypeptide comprising:
 - (a) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10);
25 (b) the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
(c) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), with its associated signal peptide;
30 (d) an amino acid sequence of the extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 9 (SEQ ID NO:9), or Figure 10 (SEQ ID NO:10), lacking its associated signal peptide;
(e) an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5);
35 (f) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 4 (SEQ ID NO:4), or Figure 5 (SEQ ID NO:5); or

WO 02/16602

PCT/US01/26626

(g) an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the cDNA deposited under any ATCC accession number shown in Table 7.

3. The antibody of Claim 1 which is a monoclonal antibody.
5. The antibody of Claim 1 which is an antibody fragment.
10. The antibody of Claim 1 which is a chimeric or a humanized antibody.
15. The antibody of Claim 1 which is conjugated to a growth inhibitory agent.
20. The antibody of Claim 1 which is conjugated to a cytotoxic agent.
25. The antibody of Claim 7, wherein the cytotoxic agent is selected from the group consisting of toxins, antibiotics, radioactive isotopes and nucleolytic enzymes.
30. The antibody of Claim 7, wherein the cytotoxic agent is a toxin.
35. The antibody of Claim 9, wherein the toxin is selected from the group consisting of maytansinoid and calicheamicin.
40. The antibody of Claim 9, wherein the toxin is a maytansinoid.
45. The antibody of Claim 1 which is produced in bacteria.
50. The antibody of Claim 1 which is produced in CHO cells.
55. The antibody of Claim 1 which induces death of a cell to which it binds.
60. The antibody of Claim 1 which is detectably labeled.

1/10

FIGURE 1

TAAACAGCTACAATATCCAGGGCCAGTCACTTGCCATTCTCATACACCGCTCAGAGAGAAGAAACTGACTGA
AACGTTTGAGATGAAAGAAAGTTCTCTCTGATCACAGCCATCTTGGCAGTGCTGGCTGGTTTCCCAGCTCTCA
AGACCAAGAACAGAGAAAAAGAAGTATCAGTGACACCCATGAAATTAGCTTCAGGGTTTTGTGTTCCCTAACCC
ATATCCATTTCGCCACTTCCACCAATTCCATTTCACAGAATTCCATGGTTTAGACGTAATTTCCTATTCCAAT
ACCTGAATCTGCCCTACAACCTCCCTCTAGCGAAGAGTAAACAAGAAGGATAAGTCACGATAAACCTGGTCA
CCTGAAATTGAAATTGAGCCACTTCCCTGARGAATCAAATTCTGTTAATAAAGAARARARATGTAATTGAA
ATAGCACACAGCATTCTCTAGTCAATATCTTAGTGATCTTCTTAATAAACATGAAAGCAAAAGATTGGTTTC
TTAATTCCACA

2/10

FIGURE 2

GGAGAGAGGCCGCGGGTGAAGGCCATTGATGCAGCCTGCCGGCCCTCGGAGCGCGCGRGCCAGACGCTG
ACCAAGTTCCCTCCTCGGTCTCCCTCCAGCTCCGCGTGCCTCCAGCCAGCAGCCGGAGCCATGCGACCCCCAGG
GCCCGCCGCGCTCCCGCAGCGCTCCCGCCCTCTCTCTCTCTGCTGCTGCTGCAGCTGCCAGCTGCCGGCGCTCGAGCG
CCTCTGAGATCCCAAAGGGGAAGCAAAGGCCAGCTCCGCCAGAGGGGGGTGGTGGACCTGTATAATGGGATGT
GCTTACAAGGCCAGCAAGACTGCCCTGGTGTGAGACGCCCTGGGCCATGTTATTCGGGTTACACCTGGGA
TCCCAGGTGGATGGATTCAAGAGAAAAGGGGAATGCTGAGGAAAGCTTGAGGAGCTGGACACCCA
ACTACAACGACTGTTCATGGAGTTGAAATTATGGCATAGATCTGGGAAAATTGCGGACTCTACATTACAA
AGATCCGTTCAARATAGTGTCTAAGAGTTTGTTCAGCTGGCTACTTCGGCTAAATGCCAGAATTCATGCTGTC
AGCCTGGTAACTCACATTCAATGGAGCTGAATGTTCAAGGCCCTCTCCATTGAAGCTTATTTGGACC
AAGBAGGCCCTGAATGAATTCACAATTAAATTCACTGCCACTTCTTCTGTGAAGGACTTTGTGAAGGAAATG
GTGCTGGATTAGTGGATGTTGCTATCTGGGTTGGCACTTGTTCAGAPTAACCCAAAGGAGATGCTTCTACTGGAT
GGAATTTCAGTTCTCCCATATTATTGAAGAACTACCCAAAATAATGCTTTAATTTCATTTGCTACCCCTTTTT
TTATTATGCCATTGGAAATGGTCTCTTAAATGACATTAAATAAGTTATGTATACATCTGAATGAAAAGCAAAG
CTAAATPATGTTACAGACCAAAAGTGTGATTTCACACTGTTTAAATCTGCAATTCTCATTTGCTTCAATCAA
AAGTGGTTCAATTTTTTAGTTGGTTAGATACTTCTTCATAGTCACATTCTCTAACCTATAATTGGA
ATATTGTTGTTGGCTTTGTTTCTCTAGTATAGCATTAAATAAAAGCTACCAATCTTGAC
AATTGTAATGTTAAGAATTTTTTATATCTGTTAAATAAAAATTCTTCCACAA

3/10

FIGURE 3

CCCAAGGGAAAGAGGTGATCCGACCCGGGAAAGGTGCGTGGGCAGGGCAGTTGGGAARGCGGCAGGCCCGCCCG
 CCCCGCAGCCCCCTTCCTCTCTTCTCCACCTCTTATCAGCCTCTCAGCAGGGCAGGCCCTGAGCATCGA
 AGACAGGAGGAACCTGGAGCCTCATGGCCGGCCGGGGCCGGCCCTCGGGCTTAAATAGGAGCTCGGGCTCTG
 GCTGGGACCCGACCGCTGGCGGCGCTCCGCTCTCCGCGGTGA**TG**GAAAACCCCAGCCGGCGCCGC
 CCTGGGACGGCCCTTCGCTCTCTCTGGCCACTCTCGCCGGCCGGCCAGGCCCTTGCGGGAGAGTCTAT
 CTGTTCCGCCAGAGCCCCGGCCAATAACAGCATCACCTCACGGGCAAGTGGAGCCAGCGGCCCTCCCAAGCA
 GTACCCCCCTGTTCCGCCCTCTGGCACTGTCTTGGCTGCTGGGGCCGGCATATGCTCCGACTCACCGATGUG
 GAGGAAGAACCCAGTACGTCAGTAACGGCTGCGCGRCTTTCGCGAGCGGGCAGGGCTGGGGCTGTATGAAGGA
 GATCGAGGGCGCGGGAGGGCGCTGAGAGCGTGCACAGGGTGTTCAGGGCGCTCCAGGGCGACCC
 CGAGACGTCGGCGAGCTGGAGGCTGACGGCTGGACGGCTTGCGAGGGACCGTTGGCGGAACAGGGCGCTGGACCT
 GTACCTGGTTGGCGCTGGACGGCTGGACGGCTGGACGGCTGGACGGCTGGACGGCTGGACGGCTGGAC
 GGTGACCGAGATAACGTCCTCTCTCCAGCCACCCGGCCAACTCTTACTACCGCGGGCTAGGGCTGCC
 TCCCATCGCCAGGGTGACACTGTCGGCTGCGACAGAGCCCCAGGGCTTCACGCCCTCCGGCCAGTCCCTGCC
 CAGCAGGGCAATTGAGATTGAGACAGGGCTGAGCTCCAGAAACGCCCTGGACCTGGAGCTGGAGGTTCCCTGGTC
 GTCTGGGGACTGTGGGGAGGCCACTGTGGGAGGCTGGGACCAAGAGCAGGACTCGCTAACGTCGGGCTCCAGGCC
 CGCCACACCGAGGCCCTGGGCCCCGGAGCCATGGGGTGTGGGGCTCTGTGCAGGGCTCTGTGCAGGG
 CGAGGGCAAGGGGTTTCGCGCTCTGACCCGCGTGGCCGGGACCAATCTCTGCACTGAAGGGCCC
 TCTGGTGGCCGGACGGCACTGGAAACAGCCTCTCTTCCAAACCTTGTCTTGAAGGGGCCCTGTGCC
 GTCTCTCTCAGGCTCTCCCTGGAGATAAGGCTACCCCAAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGCTCTCT
 ATAAAGTTATGCTGCTCAGGAGATTGCTCTCATGTCAGGGCCCTGGCTCCAGTGGCTCCAGTGGTCAAGTAACCTCA
 GACCTGGTGTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACCTCCCGAGGGCGCATCCAGCGGGGGCRCTTGAGAAGTGAAT
 AAATGGGGCGTTTCGNAACGGTCAGTTTCCATTTATGATCTCTCTGAAATAAGACTATCTCT
 TGCTCAGCRAA

WO 02/16602

PCT/US91/26626

4/10

FIGURE 4

WO 02/16602

PCT/US91/26626

5/10

FIGURE 5

WO 02/16602

PCT/US01/26626

6/10

FIGURE 6

MKKVLLLITAILAVAVGFPVSDQEREKRSISDSDELASGFFVPYPPFRPLPPFPRFPWFRRNFPPIPES
APTTPLPSEK

Signal sequence.
amino acids 1-17

WO 02/16602

PCT/US01/26626

7/10

FIGURE 7

MRPQGPAAASPQRRLRGLLLLLQLPAPSSASEIPKGKQKAQLRQREVVDLYNGMCLQGPAGVPGRDGSPGANVIP
GTGCTIPGRDGPKGKGECLRSFEEESWTPNYKQCSWSLNYGIDLGKIAECTFTKMRNSNSALRVLFGSGSIRLKCR
NACCQRWYFTFNGAECGPLPIEAIYLDQGSPEMNSTINIHRTSSVEGLCEGIGAGLVDVAIWVGTCSDYPKGD
ASTGNNNSVSRIIIEELPK

Signal sequence.
amino acids 1-30

N-glycosylation site.
amino acids 186-189

N-myristoylation sites.
amino acids 67-72, 117-122, 163-168, 199-204, 203-208

WO 02/16602

PCT/US01/26626

8/10

FIGURE 8

MENPSPAAALGKALCALLLATIGAACQPLGGESICCSARAPAKYSITFTGKNSQTAFFPKQYPLFRPPAQWSSILLGA
AHSSDYSMWRKNQYVSNGLRLDPAERGEAWALMKEIEAACEALQSVHEVFSAPAVPSGTGQTSALEVQRHSLV
FVVRIIVPSPDWFGVGDSDLICDGDWRRQAAALDLYYFDAGTDSGFTFSSPNFATIPQDVITIITSSSPSPANSF
YYPRILKALPIJARVTLLRLRQSPRAFIAPPAPVLPSRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGHCGRLGTKS
RTRYVRVQ PANNGSPCPELSEEAECPDNVC

Signal sequence.
amino acids 1-26

Glycosaminoglycan attachment site.
amino acids 131-134

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.
amino acids 144-147

N-myristoylation sites.
amino acids 26-31, 74-79, 132-137, 134-139, 190-195, 287-292, 290-295

WO 02/16602

PCT/US01/26626

9/10

FIGURE 9

MGVWLNKDDYIRDLKRIILCFLIVYMAILVGTDQDFYSLLGVSKTASSREIRQAFKKLALKIIPDKNPNNPNARG
 DFLKINRAYEVLKDEDLRLKKYDXYGEKGLEDNQGGQYESWNYYRYDPFGIYDDDEPEITITLERREPDAAVNSGELW
 VNFYSPGCSCHDLAPLWRDFAKEVGDLLRIGAVNCGDDRMICRMKGVNNSYPSLFIIFRSGMAPVKYHGDRSKESL
 USFAMQHVRSTVTTELWTGNFVNISIQTAFAAAGIGWLITFCSKGGDCLTSQTRLRLSGMLFLNSLDAKEIYLEVIHN
 LPDFEILLSANTLEDRJAHHRWLLFFHFGKNEENSDEPLKKLYDLNLKNDHIOVGRFDCCSSADPICSNLYVFQPSIA
 VFPGQGTKEYEIHGGKKLYDILIAFAKESVNASHVTTLGPQNFPANDKEPNLVDFFFAPWCPPCRALLPELRRASNL
 LYQLKFGCTLDCTVHEGLCNMYNIQAYPTTVFNQSNIHEYEGHRSAEQILEFIEDLMNPKSVSLLPTTFFNELVT
 QRKHNEVVMVDFYSPWCHPCQVLMPEWKRMARTLTGLINVGSIDCQQYHSFCAQENVQRYPEIIRFFFFPKSNKAYQ
 YHSYNGWNRDAYSLRIRWGLGLPQVSTDLPQTFSEKVLQGKNHWVIDFYAPWCGPCQNFAPEFELLARMIKGKV
 KAGKVDCQAYAQTCQKAGIRAYPTVKFYFYERAKRNFOEQINTRDAKAIAAISEKLETLRNQGKRKNKDEL

Signal sequence.

amino acids 1-48

N-glycosylation site.

amino acids 484-487

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.

amino acids 445-448

N-myristoylation sites.amino acids 2-7, 41-46, 103-108, 110-115, 157-162, 182-187, 243-248, 458-463,
566-571**Amidation sites.**

amino acids 389-392, 739-742

Endoplasmic reticulum targeting sequence.

amino acids 744-748

Cytochrome c family heme-binding site signature.

amino acids 158-163

Thioredoxin.

amino acids 128-234, 406-509, 511-592, 623-703

DnaJ domain.

amino acids 35-100

WO 02/16602

PCT/US01/26626

10/10

FIGURE 10

MAQQACPRAMAKNGLVICILVITLLLQTTSHSRLKARKHSKRRVRDKGDLKTQIEKLWTEVNALKEIQALQT
VCLRGTKVHKKCVLASEGLRKHFHEANEDCISKGGILVIPRNSDEINALQDYGKRSLPGVNDFWLGINDMVTEGKF
VDVNGIAISFLNWDRAQPNNGKRENCVLFSQSAQGKWSDEACRSSSERVIECFTIPK

Signal peptide.
amino acids 1-31

N-myristoylation sites.
amino acids 14-20, 155-161

Amidation sites.
amino acids 126-130, 170-174

C-type lectin domain signature.
amino acids 176-201

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016602 A3(51) International Patent Classification⁵: C12N 15/00,
C07K 16/30, A61K 47/4894019 (US). WOOD, William, I. [US/US]; 35 Southdown
Court, Hillsborough, CA 94010 (US). WU, Thomas, D.
[US/US]; 113 Elsie Street, San Francisco, CA 94110 (US);
ZHANG, Zemin [CN/US]; 876 Taurus Drive, Foster City,
CA 94404 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/26626

(22) International Filing Date: 23 August 2001 (23.08.2001)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/US00/23328 24 August 2000 (24.08.2000) US

PCT/US00/32678 1 December 2000 (01.12.2000) US

PCT/US01/06520 28 February 2001 (28.02.2001) US

PCT/US01/17800 1 June 2001 (01.06.2001) US

PCT/US01/19692 20 June 2001 (20.06.2001) US

PCT/US01/21066 29 June 2001 (29.06.2001) US

PCT/US01/21735 9 July 2001 (09.07.2001) US

(74) Agent: KRESNAK, Mark, T.; c/o Genentech, Inc., MS
49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CT, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi, J. [US/US]; 1456 Turntow Street, San Mateo, CA 94402 (US); GODDARD, Audrey [US/CA]; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); GODOWSKI, Paul, J. [US/US]; 2627 Easton Drive, Burlingame, CA 94010 (US); GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US); POLAKIS, Paul [US/US]; 1449 Cortez Avenue, Burlingame, CA 94010 (US); WILLIAMS, P., Mickey [US/US]; 509 Alto Avenue, Half Moon Bay, CA(76) Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
6 February 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/016602 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF TUMOR

(57) Abstract: The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Int'l Application No PCT/US 01/26626 |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/00 C07K16/30 A61K47/48 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 00 12708 A (GENENTECH, INC.) 9 March 2000 (2000-03-09) claims 12,17-20 figure 246 --- | 1-5 |
| X | WO 99 46281 A (GENENTECH, INC.) 16 September 1999 (1999-09-16) claims 12,17,18 figures 87,190 seq.id.nos 236 and 459 --- | 1-5 |
| X | WO 99 40189 A (GENSET) 12 August 1999 (1999-08-12) claims 6-12,17,20 seq.id.no. 123 --- | 1-5 -/- |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | |
| *D* document pertaining to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 1 July 2002 | | Date of mailing of the international search report 09/07/2002 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apn al. Fax: (+31-70) 340-3076 | | Authorized officer Nooij, F |

Form PCT/ISA/010 (second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/26626 |
|--|--|--|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 00 23108 A (DIADEXUS LLC) 27 April 2000 (2000-04-27) claims seq. id.no.2 ---- | 1-5,8,15 |
| A | EP 0 388 914 A (BEHRINGERWERKE AG) 26 September 1990 (1990-09-26) the whole document ---- | 1-15 |
| A | R. CHARI ET AL.: "Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs." CANCER RESEARCH, vol. 52, no. 1, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 127-131, XP000453560 Baltimore, MD, USA abstract ---- | 1-15 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (Rev. 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | | In | Application No |
|--|------------------|--|--|----------------|
| | | | PCT/US | 01/26626 |
| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
| WO 0012708 | A 09-03-2000 | AU 5590899 A .. EP 1144629 A2 WO 0012708 A2 AU 6041399 A EP 1115863 A1 WO 0017353 A1 | 21-03-2000 17-10-2001 09-03-2000 10-04-2000 18-07-2001 30-03-2000 | |
| WO 9946281 | A 16-09-1999 | US 6391311 B1 AU 3072199 A CA 2321677 A1 WO 9946281 A2 ZA 9901937 A AU 3075099 A CA 2322792 A1 EP 1064382 A2 WO 9947677 A2 US 2002072496 A1 US 2002072067 A1 US 2002072092 A1 US 2002072497 A1 AU 735081 B2 AU 1532499 A CA 2309358 A1 EP 1032667 A2 WO 9927098 A2 AU 741133 B2 AU 3757099 A CA 2324297 A1 EP 1071773 A1 JP 2002512032 T WO 9954467 A1 AU 1070399 A CA 2305385 A1 EP 1025227 A2 WO 9920756 A2 | 21-05-2002 27-09-1999 16-09-1999 16-09-1999 17-04-2000 11-10-1999 23-09-1999 03-01-2001 23-09-1999 13-06-2002 13-06-2002 13-06-2002 13-06-2002 28-06-2001 15-06-1999 03-06-1999 06-09-2000 03-06-1999 22-11-2001 08-11-1999 28-10-1999 31-01-2001 23-04-2002 28-10-1999 10-05-1999 29-04-1999 09-08-2000 29-04-1999 | |
| WO 9940189 | A 12-08-1999 | AU 1049199 A AU 1503099 A AU 2294499 A CA 2302644 A1 CA 2311572 A1 CA 2316182 A1 EP 1029045 A2 EP 1037977 A2 EP 1053318 A2 WO 9925825 A2 WO 9931236 A2 WO 9940189 A2 JP 2001523453 T JP 2002502605 T JP 2002508182 T US 6312922 B1 | 07-06-1999 05-07-1999 23-08-1999 27-05-1999 24-06-1999 12-08-1999 23-08-2000 27-09-2000 22-11-2000 27-05-1999 24-06-1999 12-08-1999 27-11-2001 29-01-2002 19-03-2002 06-11-2001 | |
| WO 0023108 | A 27-04-2000 | EP 1126877 A1 WO 0023108 A1 | 29-08-2001 27-04-2000 | |
| EP 388914 | A 26-09-1990 | DE 3909799 A1 AT 140486 T | 27-09-1990 15-08-1996 | |

Form PCT/ISA/210 (parent family annex) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Int'l Application No PCT/US 01/26626 | |
|--|------------------|---|--|
| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
| EP 388914 | A | AT 166882 T AT 166883 T AU 628948 B2 AU 5215090 A CA 2012993 A1 DE 59010418 D1 DE 59010825 D1 DE 59010826 D1 DK 388914 T3 DK 727435 T3 DK 727436 T3 EP 0388914 A1 EP 0727435 A1 EP 0727436 A1 ES 2090052 T3 ES 2116789 T3 ES 2116790 T3 GR 3020610 T3 JP 3002200 A JP 3043772 B2 KR 189046 B1 PT 93536 A , B US 2002068056 A1 | 15-06-1998 15-06-1998 24-09-1992 08-11-1990 24-09-1990 22-08-1996 09-07-1998 09-07-1998 04-11-1996 01-02-1999 01-02-1999 26-09-1990 21-08-1996 21-08-1996 16-10-1996 16-07-1998 16-07-1998 31-10-1996 08-01-1991 22-05-2000 01-06-1999 07-11-1990 06-06-2002 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------------|------------|
| A 6 1 K 45/00 | A 6 1 K 45/00 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K 47/48 | A 6 1 K 47/48 | |
| A 6 1 K 48/00 | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 35/00 | |
| C 0 7 K 16/32 | C 0 7 K 16/32 Z N A | |
| | A 6 1 K 37/02 | |

(31) 優先権主張番号 PCT/US01/17800
 (32) 優先日 平成13年6月1日(2001.6.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US01/19692
 (32) 優先日 平成13年6月20日(2001.6.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US01/21066
 (32) 優先日 平成13年6月29日(2001.6.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US01/21735
 (32) 優先日 平成13年7月9日(2001.7.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R0,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 ゴッダード, オードリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1 , サンフランシスコ, コンゴ ストリート 1 1 0
 (72) 発明者 ゴドフスキー, ポール, ジェイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリンゲーム, イーストン ドライブ 2 6 2
 7
 (72) 発明者 ガーニー, オースティン, エル .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2 , ベルモント, デビー レーン 1
 (72) 発明者 ボラキス, ポール
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリンゲーム, コーテツ アベニュー 1 4 4
 9
 (72) 発明者 ウィリアムス, ピー.ミッキー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 9 , ハーフ ムーン ベイ, アルト アベニュー 5
 0 9
 (72) 発明者 ウッド, ウィリアム, アイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , ヒルズバラ, サウスダウン コート 3 5
 (72) 発明者 ウー, トーマス ディー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0 , サンフランシスコ, エルシー ストリート 1 1
 3
 (72) 発明者 チャン, ツオーミン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4 , フォスター・シティ, トーラス ドライブ 8 7 6
 F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 BA61 DA02 DA06 EA02 EA04 GA03 GA11

HA01 HA15
4C076 AA95 CC27 EE59 FF68
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA03 MA01 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 CC32 DD21 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 CB22 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74