

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-104212

(P2006-104212A)

(43) 公開日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C O 7 K 16/32 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/32 Z N A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 C	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 E	
	A 6 1 K 39/395 L	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 106 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-363921 (P2005-363921)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成17年12月16日 (2005.12.16)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2002-522275 (P2002-522275)		GENENTECH, INC.
原出願日	平成13年8月23日 (2001.8.23)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(31) 優先権主張番号	PCT/US00/23328		0-4990・サウス・サン・フランシス
(32) 優先日	平成12年8月24日 (2000.8.24)	(74) 代理人	100109726
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	PCT/US00/32678	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成12年12月1日 (2000.12.1)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
(31) 優先権主張番号	PCT/US01/06520		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
(32) 優先日	平成13年2月28日 (2001.2.28)		02, サンマテオ, タリータウン ストリ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ート 1456
		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】

【課題】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。

【解決手段】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する細胞表面ポリペプチド、あるい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する分泌ポリペプチドを同定し、さら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。

【選択図】なし

## 【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 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 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 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 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 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 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) ATCC 寄託番号 203275、203323、209864 又は 203127 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。

10

20

## 【請求項 2】

(a) 図 6 (配列番号: 6)、図 7 (配列番号: 7)、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 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 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 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 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 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) ATCC 寄託番号 203275、203323、209864 又は 203127 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。

30

40

## 【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。

## 【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。

50

## 【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ェアミシンからなる群より選択される、請求項 9 の抗体。

10

## 【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】

細菌で産生される請求項 1 の抗体。

## 【請求項 13】

C H O 細胞で産生される請求項 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。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の開示】

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は、哺乳動物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（Boring ら、CA Cancer J. Clin., 43: 7 [1993]）。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。

30

## 【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索してきた。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体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、ハーセプチン（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、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター 2（HER2）プロト-オノジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組み換え DNA 誘導ヒト化モノクローナル抗体である。HER2 タンパク質の過剰発現は、原発性乳癌の 25-30% 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 CD20 抗原に対する遺伝子操作キメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方は、C H O 細胞で組み換え操作によって産生される。

40

50

## 【 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剤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する細胞表面ポリペプチド、あるい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す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、一つ又は複数の型の癌細胞又はその表面で、一つ又は複数の型の正常な非癌細胞又はその表面と比較して、より多く発現する種々の細胞ポリペプチド(そしてそ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(「TAT」ポリペプチド)と呼ばれ、哺乳動物における癌治療及び診断の効果的な標的と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(「TAT」ポリペプチド)をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

## 【 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TATポリペプチド、ここで記載の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。

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

## 【 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ATCCに寄託された任意のヒトタンパク質cDNA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

10

20

30

40

50

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得る、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 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 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。

## 【 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 D N A 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 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 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。

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。

## 【 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ずれかの単離された 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。

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 D N A 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。

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。本発明の抗体は、C H O 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。

#### 【0013】

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よ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よ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

#### 【0014】

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だ組成物に関する。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。

#### 【0015】

##### 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

50

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。場合によっては、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、T A T結合オリゴペプチド及びT A T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結合し得る。本発明の方法に用いられる抗体及びT A T結合オリゴペプチドは、随意的に、C H O細胞又は細菌細胞で産生され得る。

本発明のさらにその他の実施態様は、哺乳動物のT A T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、T A T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、それによっ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。場合によっては、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、T A T結合オリゴペプチド又はT A T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。本発明の方法に用いられる抗体及びオリゴペプチドは、随意的に、C H O細胞又は細菌細胞で産生され得る。

本発明のさらにその他の実施態様は、T A Tポリペプチドを含むと思われる試料でT A T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T A T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T A T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含まれていて、そのような結合の存在は、試料中のT A Tポリペプチドの存在を示す。場合によっては、この試料は、T A Tポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いるT A T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T A Tポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することが含まれ、コントロール試料と比較して、試験試料でのT A T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T A T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)試験試料中での、抗体、オリゴペプチド又は小有機分子とT A Tポリペプチドの間で形成される複合体を検出することが含まれ、複合体の形成は、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられた抗体、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;

10

20

30

40

50



(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

(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。

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;

(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

(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;

(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;

10

20

30

40

50

(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；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ェ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。

10

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；

20

(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

30

(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；

40

(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

50

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；

10

（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；

20

（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単離された抗体。

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；

30

（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；

40

（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。

50

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ェ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. 細菌で産生される請求項15の抗体。 10
27. CHO細胞で産生される請求項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。
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。 20
- 【0018】
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； 30
- (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； 50

- (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。 20
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。
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; 30
- (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ポリペプチドと結合する T A T 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; 50

- (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 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。 20
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。
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。 30
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。
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。 40
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 50

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選択される、請求項 64 の方法。

66. 細胞毒性剤が毒素である請求項 64 の方法。

67. 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 66 の方法。

68. 毒素がメイタンシノイドである請求項 66 の方法。

69. 前記抗体を細菌で産生する請求項 59 の方法。

70. 前記抗体を CHO 細胞で産生する請求項 59 の方法。

71. 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 59 の方法。

72. 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 59 の方法。

73. 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 59 の方法。

74. (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。

75. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 74 の方法。

76. 前記抗体が抗体断片である請求項 74 の方法。

77. 前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である請求項 74 の方法。

78. 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 74 の方法。

79. 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 74 の方法。

80. 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 79 の方法。

81. 細胞毒性剤が毒素である請求項 79 の方法。

82. 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 81 の方法。

83. 毒素がメイタンシノイドである請求項 81 の方法。

84. 前記抗体を細菌で産生する請求項 74 の方法。

85. 前記抗体を CHO 細胞で産生する請求項 74 の方法。

86. 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 74 の方法。

87. 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 74 の方法。

88. (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

10

20

30

40

50

確かめることを含んで成る方法。

８９． 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８８の方法。

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。

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。

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。

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

10

20

30

40

50



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。「T A Tポリペプチド」という用語は、また、ここに記載のT A T / 数字ポリ  
ペプチドの変異体を含む。

#### 【0021】

「天然配列T A Tポリペプチド」には、天然由来の対応するT A T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T A Tポリペプチ  
ドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもでき  
る。「天然配列T A Tポリペプチド」という用語には、特に、特定のT A Tポリペプチド  
の自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態  
(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立  
遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列T A T  
ポリペプチドは、添付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T A T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T A Tポリペプチドの開始アミノ酸残  
基として用いることも考えられるし、可能でもある。

10

#### 【0022】

T A T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T A Tポリペプチドの形態を意味する。通常、T A TポリペプチドE  
CDは、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなド  
メインを0.5%未満しか持たない。本発明のT A Tポリペプチドについて同定された任  
意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常  
的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密  
な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインの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、T A Tポリペプチドの細胞外ドメイン  
は、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン/細胞外ドメインの境界のいず  
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

30

#### 【0023】

ここに開示する種々のT A Tポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、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 -  
末端境界は変化するが、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ら, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinjeら, 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。

40

#### 【0024】

「T A Tポリペプチド変異体」とはT A Tポリペプチド、好ましくは、ここに開示する  
ような完全長天然配列T A Tポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチド  
を欠くT A Tポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有  
しないT A Tポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長T A Tポリペプチ  
ド配列の任意の他の断片(例えば、完全長T A Tポリペプチドの完全なコード配列の一部  
のみを示す核酸によってコードされるもの)と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性  
を有するここで定義するような活性T A Tポリペプチドを意味する。このようなT A Tポリ

50

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T A Tポリペプチドが含まれる。通常、T A Tポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列T A Tポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くT A Tポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するT A Tポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長T A Tポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、T A T変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、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、T A T変異体ポリペプチドは、天然T A T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T A T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T A Tポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる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T A Tポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば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の長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なること

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、「T A T」が対象となる仮説的T A Tポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となるT A T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「T A T」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。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】

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

#### 【0028】

通常、T A T変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、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T A Tコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、T A T核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム

用の完全なソースコードが下記の表 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TXU5100 87の下で登録されている。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。

#### 【 0 0 3 0 】

10

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

分率  $W/Z$  の 100 倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチドである。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、「T A T - D N A」が対象となる仮説的T A Tコード化核酸配列を表し、「比較D N A」が対象となる「T A T - D N A」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮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ALIGN-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ェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長T A Tポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。T A T変異体ポリペプチドは、T A T変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

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クエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGE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

50

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知られている。

#### 【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読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

10

#### 【0034】

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

20

30

#### 【0035】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50 °Cにおいて0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 M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 °C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/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3) 42 °Cにおける50%ホルムアミド、5xSSC (0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42 °Cにおける0.2xSSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中の洗浄及び55 °Cでの50%ホルムアミド、次いで55 °CにおけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

40

#### 【0036】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば

50

、温度、イオン強度及び% SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、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。

#### 【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十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~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。

#### 【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。

#### 【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

10

20

30

40

50

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】

10

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×-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。

20

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単糖類、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。

30

#### 【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。

40

「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又はＴＡＴ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。

#### 【００４４】

50

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

ここに開示するポリペプチド又は抗体、TAT 結合オリゴペプチド、TAT 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もよい。

「治療的有效量」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、TAT 結合オリゴペプチド、TAT 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。

10

#### 【0045】

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

20

抗 TAT 抗体、TAT ポリペプチド、TAT 結合オリゴペプチド又は TAT 結合有機分子の「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗 TAT 抗体、TAT ポリペプチド、TAT 結合オリゴペプチド又は TAT 結合有機分子の「細胞毒性量」は、経験的及び日常的手段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 TAT モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を持つ抗 TAT 抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗 TAT 抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示すということであれば抗 TAT 抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、ここでの抗体と相互置き換え可能に用いられる。

30

#### 【0046】

「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（Lowry）法によって決定した場合 95 重量%以上の、最も好ましくは 99 重量%以上の抗体まで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 15 の N 末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは（3）クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下での SDS-PAGE によ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。

40

#### 【0047】

基本 4 - 鎖抗体ユニットは 2 つの同一の軽（L）鎖と 2 つの同一の重（H）鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである（IgM 抗体は、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

50



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、 $\mu$  及び  $\delta$  鎖の各々に対しては 3 つの定常ドメイン ( $C_H$ ) が、 $\mu$  及び  $\delta$  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 amino 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。

10

#### 【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 amino 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 amino 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  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$  及び  $\lambda$  と呼ばれる重鎖を有する。さらに  $\gamma$  及び  $\mu$  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。

20

#### 【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-amino 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 amino 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 amino 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  $\beta$ -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、 $\beta$ -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ら, 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。

30

#### 【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 amino 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 amino 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ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 及び / 又は「高度可変ループ」からの残基 (すなわち、 $V_L$  においては、およそ残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 及び 91-96 (L3)、及び  $V_H$  においては、およそ 26-32 (H1)、53-55 (H2) 及び 96-101 (H3); Chothia 及び Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) を含んでなる。

40

#### 【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

50

自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler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. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで関心あるキメラ抗体には、非ヒト霊長類(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、 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は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'、 $(Fab')_2$ 、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]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

#### 【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」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン( $V_H$ )、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン( $C_{H1}$ )からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $(Fab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの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Fab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $(Fab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

#### 【0055】

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

「Fv」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は

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

#### 【0056】

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

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第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。

#### 【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、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Opin. 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IgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原(すなわち、たった約 $1 \times 10^{-7}$  M、好ましくはたった約 $1 \times 10^{-8}$ 、そして最も好ましくはたった約 $1 \times 10^{-9}$  Mの結合親和性(K<sub>d</sub>)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上に定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

「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

10

20

30

40

50

て調製及び精製することができる。T A T 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T A T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。T A T 結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリ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；P C T 公開第W O 84 / 03506号、及びW O 84 / 03564号；Geysenら，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，81:3998-4002 (1984)；Geysenら，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，82:178-182 (1985)；Geysenら，in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysenら，J. Immunol. Meth.，102:259-274 (1987)；Schoofsら，J. Immunol.，140:611-616 (1988)，Cwirlla,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. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol.，2:668参照）。

10

20

30

40

#### 【0059】

「T A T 結合有機分子」とは、ここに記載されるようなT A Tポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。T A T 結合有機分子は既知の方法（例えばP C T 公開第W O 00 / 00823号及びW O 00 / 39585号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。T A T 結合有機分子は通常、約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T A Tポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリ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P C T 公開第W O 00 / 00823号及びW O 00 / 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、蛍光標示細胞分取器（F A C S）分析又は放射免疫沈降（R I A）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】

「T A T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

50

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

10

#### 【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、T A T ポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン (P S) 転位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。

20

#### 【0062】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域（天然配列 F c 領域又はアミノ酸配列変異体 F c 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；F c レセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (A D C C)；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）のダウンレギュレーション；及び B 細胞活性化が含まれる。

30

#### 【0063】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「A D C C」とは、ある種の細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー (N K) 細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在する F c レセプター (F c R s) と結合した分泌 I g 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。A D C C を媒介する主要な細胞 N K 細胞は F c R I I I のみを発現するのに対し、単球は F c R I、F c R I I 及び F c R I I I を発現する。造血細胞での F c R 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 A D C C 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 A D C C アッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞 (P B M C) 及びナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、関心ある分子の A D C C 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。

40

50

## 【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、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIレセプターには、FcRIIA（「活性型レセプター」）及びFcRIIB（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif ;ITAM）を含んでいる。阻害型レセプターFcRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ;ITIM）を含んでいる（Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照）。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel 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。

10

## 【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FcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞毒性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCsとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

20

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系（Clq）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、CDC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。

30

## 【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。

40

## 【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、TAT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TATポリペプチドを過剰発現する細胞である。TAT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、

50

例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、脾臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害 (ADCC) 又は補体依存性障害 (CDC) によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清 (すなわち、補体の無い) を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、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 (PI)、トリパンプルー (Mooreら、Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) 又は 7AAD の取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、BT474 細胞での PI 取り込みで、PI 取り込みを誘導するものである。

10

#### 【0068】

「TAT 発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入された TAT ポリペプチドを発現する。「TAT 発現癌」は、細胞表面上に存在する TAT ポリペプチドを有する、又は TAT 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、「TAT 発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルの TAT ポリペプチドを生成し、抗 TAT 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的効果を有する。他の実施態様では、任意には「TAT 発現癌」は、抗 TAT 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 TAT ポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌 TAT ポリペプチドの産生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。TAT ポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルの TAT ポリペプチドを有する、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ツハイブリダイゼーション; (FISH; 1998 年 10 月に公開の国際公開 98/45479 を参照せよ)、サザン ブロットティング、ノーザン ブロットティング、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、種々のインビボアッセイは、熟練技術者にとって入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

20

30

40

#### 【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

50

なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3、又はI g G - 4 サブタイプ、I g A ( I g A - 1 及び I g A - 2 を含む )、I g E、I g D 又はI g M などの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

#### 【 0 0 7 0 】

「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。

10

#### 【 0 0 7 1 】

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、 $A t^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$  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、ピンカアルカロイド類（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピ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されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

20

#### 【 0 0 7 2 】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にT A T 発現癌細胞の成長をインビトロ又はインビボの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T A T 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G 1 停止又はM 期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM 期ブロッカーは、ピンカス（ピンクリスチン及びピンブラスチン）、タキソール、及びトポイソメラーゼII 阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG 1 停止させるこれらの薬剤は、S 期停止にも波及し、例えば、DNA アルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5 -フルオロウラシル、及びa r a - 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 スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

30

40

#### 【 0 0 7 3 】

「ドキソルピシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルピシンの完全な化学名は、(8 S -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。

#### 【 0 0 7 4 】

「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

50



、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 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；インヒピン；アクチピン；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；腫瘍壊死因子、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。

【0075】

「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。

【0076】

表1

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

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

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 JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

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

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

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

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

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

```

10

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_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

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

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

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

```

nw

10

20

30

40

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 ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

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

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

```

10

20

30

表1(続)

...nw

```

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

```

10

20

30

40

表1(続)

```

/*
 *
 * 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)
    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);

```

getmat

10

20

30

40



## 表1(続)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

30

pr\_align

40

表1(続)

```

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];
        nm = 0;
    }
}

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

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

```

...pr\_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続)

...dumpblock

```

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

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int      ix;      /* index in out[] holding seq line */

    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char *pn, *px, *py;

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

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

```

10

20

30

40

表1(続)

```

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] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i--;)
        *px++ = ' ';

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

```

...putline

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**



## 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);
}

```

10

```

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);
}

```

g\_calloc

20

```

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

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

```

readjumps

30

40

## 表1(続)

## ...readjumps

```

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

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

```

10

20

30

40



表 1(続)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(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);
}

```

writejumps

10

【 0 0 7 7 】

表 2

20

TAT	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYY	(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 ÷ 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	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(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 ÷ 10 = 50%

【 0 0 7 9 】

表 4

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

10

$6 \div 14 = 42.9\%$

【 0 0 8 0 】

表 5

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

20

% 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) =

30

$4 \div 12 = 33.3\%$

【 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 】

40

### 1 . ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下 (sc) 又は腹腔内 (ip) 注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原 (特に、合成ペプチドが用いられる場合) を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン (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、 $\text{SOCl}_2$ 、又は R 及び  $\text{R}^1$  が異なるアルキル基である  $\text{R}^1 \text{N} = \text{C} = \text{NR}$  を用いて結合させることができる。

50

## 【 0 0 8 3 】

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート  $100 \mu\text{g}$  又は  $5 \mu\text{g}$  (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バント 3 容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1 ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の  $1/5$  ないし  $1/10$  のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7 ないし 14 日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウパ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

## 【 0 0 8 4 】

## 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髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁 (Academic Press, 1986))。

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髓腫細胞(融合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する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、親の骨髓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HPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT - 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

## 【 0 0 8 5 】

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

30

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産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

## 【 0 0 8 6 】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munsonら., *Anal. Biochem.*, 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/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖

50

させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁 (Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー (例えばプロテインA又はプロテインG-セファロースを用いる) 又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な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。

10

#### 【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を発現ベクター中に入れ、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産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra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産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ボ組換え (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., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド (異種ポリペプチド) のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

40

#### 【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

50

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。

20

#### 【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))。

30

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

40

#### 【0094】

ヒト化抗TAT抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて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Fabであってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷IgG1抗

50

体であってもよい。

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

#### 【0095】

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、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson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-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)、又はGriffiths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。

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第 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、固形腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto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産生することができる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリ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F(ab')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167[1992])。他のアプローチ法では、F(ab')<sub>2</sub>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F(ab')<sub>2</sub>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の

ための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖 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、インピ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単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 RIII (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- $\gamma$ 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン) と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片 (例えば F(ab')<sub>2</sub> 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産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている (Millstein ら, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ (四部雑種) は 10 個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第 93/08829 号及び Traunecker ら、EMBO J. 10:3655-3659(1991) に開示されている。

【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<sub>H</sub>2 及び C<sub>H</sub>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<sub>H</sub>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。

10

20

30

40

50

## 【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分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh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、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は $C_H3$ ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの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「キャピティ」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。

## 【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ジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第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。

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

## 【0102】

最近の進歩により、大腸菌からの $F a b'$ -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. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(a b')$ <sub>2</sub>分子の製造を記述している。各 $F a b'$ 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びErB2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。

## 【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。Kostelny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 $F a b'$ 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して



抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger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 $F_v(s F_v)$ ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J.Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

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

10

#### 【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

20

#### 【0105】

##### 7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3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。

30

40

#### 【0106】

##### 8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞毒性(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

50

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 (A D C C) を有する可能性がある。Caronら, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff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A D C C能力を向上させることもできる。Stevensonら, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1998)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、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>又はIgG<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープを意味する。

10

#### 【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(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス(saponaire officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコセセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>I<sub>n</sub>、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Reが含まれる。

20

30

#### 【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(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, 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。

40

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、トリコセセン(tricothene)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】

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

50

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。

10

#### 【0111】

#### メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第 5, 208, 020 号、同 5, 416, 064 号、欧州特許第 0 425 235 B 1 号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996) には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体 C 242 に結合する DM 1 と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari ら, *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992) には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体 A 7、又は 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 T A . 1 に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。T A . 1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性はヒト乳癌株化細胞 SK-BR-3 におけるインビトロで試験され、細胞当たり  $3 \times 10^5$  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。A 7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞毒性を示した。

20

30

#### 【0112】

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

抗 T A T 抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗 T A T 抗体を化学的に結合させることにより調製される。1 分子の毒素 / 抗体は、裸抗体の使用において細胞毒性を高めることが予想されているが、抗体分子当たり、平均 3 - 4 のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞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。

40

例えば、米国特許第 5, 208, 020 号又は欧州特許第 0 425 235 B 1 号、及び Chari ら, *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

50

。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(S P D 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(I T)、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H C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。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(S P P)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)(Carlsson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TAT抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重ストランドDNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第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- $1^I$ 、P S A G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TAT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、並びにエスベラマイシン(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鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテ

10

20

30

40

50

ン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(P A P I、P A P I I 及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

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

#### 【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を利用される。例には、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$  及び  $Lu$  の放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使われる場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば  $tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

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  $tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$  及び  $In^{111}$  は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker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、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta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ジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジ

10

20

30

40

50

ュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

#### 【0118】

##### 10. 免疫リボソーム

ここで開示されている抗TAT抗体は、免疫リボソームとして処方することもできる。「リボソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リボソームの成分は、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。抗体を含有するリボソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang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ボソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリボソームは、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。リボ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ボソームが得られる。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ボ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、化学療法剤はリボ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; Geysenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysenら, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysenら, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofsら, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwiria, 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. Sci. USA, 88:83

63、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リを検索して、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(Cwirlla, 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の分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号、同第 5 4 0 3 4 8 4 号、同第 5 5 7 1 6 8 9 号、及び同第 5 6 6 3 1 4 3 号。

10

20

#### 【0120】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム(WO 9 5 / 3 4 6 8 3 ; 米国特許第 5 6 2 7 0 2 4 号)、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 5 7 6 6 9 0 5 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想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり(WO 9 8 / 1 4 2 7 7)及びファージディスプレイライブラリは二分子相互作用(WO 9 8 / 2 0 1 6 9 ; WO 9 8 / 2 0 1 5 9)及び拘束性ヘリックスペプチドの特性(WO 9 8 / 2 0 0 3 6)を分析及び制御するために使用されている。WO 9 7 / 3 5 1 9 6 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 9 7 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリ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 Biotech., 9:187)。WO 9 7 / 4 7 3 1 4 は、ファージディスプレイライブラリでもよいコンビナトリアルライブ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ブ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 9 7 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5 4 9 8 5 3 8 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、及びWO 9 8 / 1 5 8 3 3 に記載される。

30

40

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

50

08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。

【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WO00/00823及びWO00/39585号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。TAT結合有機分子は通常、約2000ダルトン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及びWO00/39585号参照）。TAT結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

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



の減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

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

10

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

20

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。

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-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ; プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの; D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ; 炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ; 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; 及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変

40

50

換するのに有用なペニシリン V アミダーゼ又はペニシリン G アミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458[1987]を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

#### 【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 T A T 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 D N A 技術を使用して作成することができる (Neubergerら, Nature 312:604-608[1984])。 10

#### 【0126】

##### F. 完全長 T A T ポリペプチド

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

下記の実施例に開示するように、種々の c D N A クローンが A T C C に寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した T A T ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。 20

#### 【0127】

##### G. 抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチド変異体

ここに記載した抗 T A T 抗体及び完全長天然配列 T A T ポリペプチドに加えて、抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチド変異体も調製できると考えられる。抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチド変異体は、コード化 D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び / 又は所望の抗体又はポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗 T A T 抗体の翻訳後プロセス又は T A T ポリペプチドの翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。 30

#### 【0128】

ここに記載した抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第 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 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び / 又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 1 から 5 のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。 40

#### 【0129】

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

抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成することが含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することが含まれる。D N A 断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドと少なくとも 1 つの生物学的及び / 又は免疫学的活性を共有する。

10

#### 【 0 1 3 0 】

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。

20

#### 【 0 1 3 1 】

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
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu(L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

30

40

#### 【 0 1 3 2 】

抗 T A T 抗体又は T A T 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 ) 側鎖の高を維持しながら、それらの効果において実質的に

50

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) 鎖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 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、抗TAT抗体又はTATポリペプチド変異体DNAを作成することもできる。

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

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

#### 【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、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、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  
20  
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、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の  
-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。  
30

本発明の範囲内に含まれる抗TAT抗体又はTATポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列抗TAT抗体又はTATポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び/又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び/又は天然配列抗TAT抗体又はTATポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。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ル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ル化とは、典型的にはN-結合又はO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位を作り出される。O-結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシル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ル化部位の付加は、アミノ酸配列を

10

20

30

40

50

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

#### 【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Aplin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、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)によって、そしてEdgeら, 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。

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

、6 E 1 0、G 4、B 7 及び 9 E 1 0 抗体 [Evan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)] ; K T 3 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 T 7 遺伝子 1 0 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。

#### 【 0 1 4 3 】

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態 (「イムノアドヘシン」とも呼ばれる) については、そのような融合体は I g G 分子の F c 領域であり得る。I g 融合体は、好ましくは I g 分子内の少なくとも 1 つの可変領域に換えて抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドの可溶化 (膜貫通ドメイン欠失又は不活性化) 形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、I g G 分子のヒンジ、C H<sub>2</sub> 及び C H<sub>3</sub>、又はヒンジ、C H<sub>1</sub>、C H<sub>2</sub> 及び C H<sub>3</sub> 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。

#### 【 0 1 4 4 】

##### I . 抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗 T A T 抗体及び T A T 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 T A T 抗体及び T A T 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 T A T 抗体及び T A T 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 T A T 抗体又は T A T 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 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドを生成させてもよい。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 1 . 抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドをコードする D N A の単離

抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドをコードする D N A は、抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチド m R N A 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 c D N A ライブラリから得ることができる。従って、ヒト抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチド D N A は、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリから簡便に得ることができる。また抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法 (例えば、自動化核酸合成) により得ることができる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (少なくとも約 20 - 80 塩基のオリゴヌクレオチド等) によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる c D N A 又はゲノムライブラリ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 T A T 抗体又は T A T 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、P C R 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, 1

995) ]。

【 0 1 4 6 】

c D N Aライブラリをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のD N A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、<sup>3 2</sup> P 標識された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ェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら、に示されている。

10

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

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

20

【 0 1 4 7 】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

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

【 0 1 4 8 】

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、C a C l<sub>2</sub>、C a P O<sub>4</sub>、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook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・トゥ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Hsia o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、D N Aを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら、Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansourら、Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

30

40

【 0 1 4 9 】

ここに記載のベクターにD N Aをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するも

50



のではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌 K 1 2 株 M M 2 9 4 ( A T C C 3 1 , 4 4 6 ) ; 大腸菌 X 1 7 7 6 ( A T C C 3 1 , 5 3 7 ) ; 大腸菌株 W 3 1 1 0 ( A T C C 2 7 , 3 2 5 ) 及び K 5 7 7 2 ( A T C C 5 3 , 6 3 5 ) 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 marcescens*)、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・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行の D D 2 6 6 , 7 1 0 に記載されたバチルス・リチェニフォルミス 4 1 P )、シュドモナス、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 3 1 1 0 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 3 1 1 0 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 *t o n A* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 1 A 2 ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 9 E 4 ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3 p h o A E 1 5 ( a r g F - l a c ) 1 6 9 d e g P o m p T k a n r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7 ( A T C C 5 5 , 2 4 4 ) ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3 p h o A E 1 5 ( a l g F - l a c ) 1 6 9 d e g P o m p T r b s 7 i l v G k a n r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 *d e g P* 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 及び 1 9 9 0 年 8 月 7 日発行の米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 8 3 号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば P C R 又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【 0 1 5 0 】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤 (例えば、毒素) と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及び F c エフェクター機能が不要な場合に、細菌で産生することができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 3 7 号 (Carter ら)、米国特許第 5 , 7 8 9 , 1 9 9 号 (Joly ら)、及び翻訳開始部位 (T I R) 及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第 5 , 8 4 0 , 5 2 3 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、C H O 細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにしておこなうことができる。

#### 【 0 1 5 1 】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach 及び Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行の欧州特許第 1 3 9 , 3 8 3 号); クリュイベロミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第 4 , 9 4 3 , 5 2 9 号; Fleer ら, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセスラクチス (*K. lactis*) (MW98-8 C, CBS683, CBS4574; Louvencourt ら, J. Bacteriol. 154(2): 737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (A T C C 1 2 , 4 2 4)、クリュイベロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (A T C C 1 6 , 0 4 5)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (A T C C 2 4 , 1 7 8)、クリュイベロミセス・ワル

チイ(*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (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*) ; ヤロウイア(*Yarrowia*) (欧州特許第402, 226号) ; ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第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 reesia*) (欧州特許第244, 234号) ; アカパンカピ(Caseら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日発行の欧州特許第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、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピチア(*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 Methylophilous*, 269 (1982)に記載されている。

#### 【0152】

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

#### 【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ン化された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) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR(CHO, Urlaubら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)) ; サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト頸管腫瘍細胞(HEL4, ATCC CCL 2) ; イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065) ; マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51) ; TRI細胞(Matherら, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)) ; MRC 5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る。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、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、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

10

#### 【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、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクлуй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)、又は酸ホスホターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

20

30

#### 【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  
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。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、VSV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。

40

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。

#### 【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

50

は、Urlaub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D H F R活性に欠陥のあるC H O株化細胞である。酵母菌中の使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドY R p 7に存在するt r p 1遺伝子である[Stinchcombら, Nature, 282:39(1979);Kingsmanら, Gene, 7:141(1979);Tschemperら, Gene, 10:157(1980)]。t r p 1遺伝子は、例えば、A T C C番号44076あるいはP E P 4-1のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは、-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)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)]; 欧州特許第36,776号]、及びハイブリッドプロモーター、例えばt a cプロモーター[deBoer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ーもまた抗T A T抗体又はT A TポリペプチドをコードするD N Aと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

#### 【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、ビ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、ビルビン酸キナーゼ、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、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第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T A T抗体又はT A Tポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の英国特許第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T A T抗体又はT A TポリペプチドをコードするD N Aの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するD N Aのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のS V 40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗T A T抗体又はT A Tポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシング

10

20

30

40

50

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) 10); 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 20); 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ることができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、pH 等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用 30

#### 【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、従来よりのサザンブロット法、mRNA の転写を定量化するノーザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロット法(DNA 分析)、又はインサイット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 40

#### 【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。

## 【 0 1 6 4 】

## 6. 抗 T A T 抗体及び T A T ポリペプチドの精製

抗 T A T 抗体及び T A T 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-X 1 0 0)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 T A T 抗体及び T A T 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 T A T 抗体及び T A T 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 H P L C；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば D E A E によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲル濾過；I g G 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 T A T 抗体及び T A T ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗 T A T 抗体又は T A T ポリペプチドの性質に依存する。

10

## 【 0 1 6 5 】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第 1 段階として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter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(p H 3 . 5)、E D T A、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(P M S F)の存在下で、3 0 分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。P M S F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。

20

30

## 【 0 1 6 6 】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテイン A の適合性は抗体に存在する免疫グロブリン F c 領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark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(Gussら、EMBO J. 5: 15671575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C<sub>H</sub> 3 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 H P L C、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、S D S - P A G E、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。

40

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 p H での溶離バッファーを用いて、低 p H 疎水性相互作用クロマトグラフィーを

50

施してもよく、好ましくは低い塩濃度（例えば、約 0 - 0.25 M 塩）で実施される。

#### 【0167】

##### J. 製薬的製剤

本発明に基づく抗 T A T 抗体及び / 又は T A T ポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体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、T r i s、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾールなど）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A 等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Z n-タンパク質錯体）；及び / 又はトゥイーン (TWEEN)（登録商標）、プルロニクス (PLURONICS)（登録商標）、又はポリエチレングリコール (P E G) 等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは 5 - 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。

10

20

30

#### 【0168】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一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、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

40

#### 【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。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリアクチド（米国特許第 3,773,919 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ユ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。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通し

50

た濾過により容易に達成される。

#### 【0170】

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

癌におけるTAT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、TAT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TAT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。

10

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。

TATポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、TAT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TAT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、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。

20

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

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

30

#### 【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、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パクリタキセル)、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

40

50



抗 T A T 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、パクリ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 0 6 0 0 5 1 7 号を参照のこと)。抗 T A T 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 T A T 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(P D R)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

#### 【 0 1 7 3 】

特定の一実施態様では、細胞障害剤に結合した抗 T A T 抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する免疫コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、T A T タンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施態様では、細胞障害剤は、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 D N A エンドヌクレアーゼを含む。

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

#### 【 0 1 7 4 】

他の治療計画を抗 T A T 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 T A T 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。

#### 【 0 1 7 5 】

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 T A T 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(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキシタキセル)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(19 92)にも記載されている。

#### 【 0 1 7 6 】

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 6 1 6 8 1 2 号を参照)；又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗 T A T 抗体、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

10

20

30

40

50

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。上述した治療損生に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び/又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗TAT抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

#### 【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る。投薬計画は、約4mg/kgの初期負荷量、続いて1週間に約2mg/kgの維持用量の抗TAT抗体を投与することからなっておりよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1µg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

10

20

#### 【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「抗体を治療的有效量で投与する」という表現に含まれる。例えば、遺伝子治療を用いた細胞内抗体の生成に関する、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ピ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ピ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。

30

40

#### 【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、DOPE、及びDC-cholesterol)での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson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、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ

50

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

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

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

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

#### 【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。

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。

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

10

20

30

40

50

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

#### 【 0 1 8 5 】

##### L . 製造品及びキット

本発明の他の実施態様では、抗 T A T 発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも 1 つの活性剤は本発明の抗 T A T 抗体、オリゴペプチド又は有機分子である。ラベル又は能書は、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(B W F I)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第 2 の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

10

20

#### 【 0 1 8 6 】

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

30

#### 【 0 1 8 7 】

##### M . T A T ポリペプチド及び T A T -ポリペプチドコード化核酸の用途

T A T ポリペプチドをコードする核酸配列(又はそれらの補体)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 R N A 及び D N A プローブの生成において種々の用途を有している。また、T A T コード化核酸は、ここに記載される組換え技術による T A T ポリペプチドの調製に有用であり、これら T A T ポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗 T A T 抗体の調製において用途を見出し得る。

40

#### 【 0 1 8 8 】

完全長天然配列 T A T 遺伝子又はその一部は、完全長 T A T c D N A の単離又はここに開示した天然 T A T 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の c D N A (例えば、T A T の天然発生変異体又は他の種からの T A T をコードするもの)の単離のために、c D N A ライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 20 ~ 約 50 塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列 T A T のプロモーター、エンハンサ

50

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、T A T 遺伝子のコード化領域を周知の D N A 配列を用いて単離して約 40 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、<sup>32</sup>P 又は <sup>35</sup>S 等の放射性ヌクレオチド、又はアピディン/ピオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明の T A T 遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒト c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意の E S T 配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

10

#### 【0189】

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

20

#### 【0190】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A T タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それら T A T タンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、国際公開 91/06629 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。

30

#### 【0191】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開 90/10048 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属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 O<sub>4</sub> -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 90/13641 参照) を含む。

40

#### 【0192】

50

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

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

10

#### 【0193】

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

20

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

30

#### 【0194】

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

#### 【0195】

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

40

50

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。

【0196】

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」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、T A TをコードするcDNAは、T A TをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、T A TをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009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DNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0197】

あるいは、T A Tの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたT A Tをコードする変更ゲノムDNAと、T A Tをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、T A Tをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するT A T「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、T A TをコードするcDNAは、確立された技術に従い、T A TをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。T A Tをコードするゲノム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キングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, 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、期間を置いて「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、T A Tポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0198】

また、T A Tポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する

低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている (Zamecnik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に修飾してもよい。

#### 【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、リボソーム、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-リボソーム媒介トランスフェクションである (Dzau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。リボソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及び Wagner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。

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ンプ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。

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

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされている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T A T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T A Tポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきT A Tポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。

10

#### 【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T A Tポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィ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G A L 4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はD N A結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がG A L 4のD N A結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。G A L 1-1 a c Zリポーター遺伝子のG A L 4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したG A L 4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 $\beta$ -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。

20

30

#### 【0204】

ここで同定されたT A Tポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラスーボを第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。

40

#### 【0205】

アンタゴニストを検定するために、T A Tポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、T A Tポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がT A Tポリペプチドのアンタゴ

50

ニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、T A Tポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合T A Tポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。T A Tポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したT A Tポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びF A C Sソーティングにより同定できる。Coliganら, *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クロニングが用いられ、そこではポリアデニル化R N AがT A Tポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このR N Aから生成されたc D N Aライブラリがプールに分配され、C O S細胞又は他のT A Tポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したT A Tポリペプチドへ曝露する。T A Tポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、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。

10

#### 【0206】

レセプター同定の代替的方法として、標識したT A Tポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をP A G Eで分離し、X線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ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c D N Aライブラリをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

20

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識T A Tポリペプチドとともにインキュベートする。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T A Tポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってT A Tポリペプチドの作用を競合的に阻害するT A Tポリペプチドの変異形態であってもよい。

30

#### 【0207】

他の潜在的なT A Tポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスR N A又はD N A作成物であり、例えば、アンチセンスR N A又はD N A分子は、標的m R N Aにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりm R N Aの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスD N A又はR N A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D N A又はR N Aへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟T A T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R N Aオリゴヌクレオチドの設計に使用される。D N A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T A Tポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスR N Aオリゴヌクレオチドはインビボでm R N Aにハイブリッド形成してm R N A分子のT A T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R N A又はD N Aをインビボ

40

50

で発現させて、T A T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。

#### 【0208】

潜在的アンタゴニストは、T A T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T A Tポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的開裂により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、国際公開 97/33551 (1997年9月18日発行)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T A Tポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にT A Tポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたT A Tポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗T A T抗体を生成するために用いることが可能である。

#### 【0210】

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

T A Tポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に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】

10

20

30

40

50

## (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・コレクション、マナッサス、バージニアである。

## 【0213】

実施例1: G E P I S による T A T 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 (E S T) D N A データベース (L I F E S E Q (登録商標), Incyte Pharmaceutical, パロアルト, カリフォルニア) を検索し、G E P I S によって興味ある E S T 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 (G E P I S) 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ーマティックス手法であり、新規の癌治療標的に関する興味ある遺伝子の特徴付ける。G E P I S は、大量の E S T 配列及びライブラリ情報を上手く利用し、遺伝子発現プロファイルを確認する。G E P I S は、E S T データベースでのその発現数との比例相関に基づいて、遺伝子の発現プロファイルを確認することができ、それは、L I F E S E Q (登録商標) E S T リレーショナル・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、G E P I S を設定することができるが、G E P I S 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、G E P I S 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 E S T 配列を L I F E S E Q (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 E S T 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 E S T 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、G E P I S を用いた。この型のスクリーニングバイオインフォーマティックスを用いて、種々の T A T ポリペプチド (及びそれらのコード化核酸分子) が、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ことを確認した。G E P I S での割合は、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 G E P I S 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】

分子 発現のアップレギュレーション: 比較の対象:

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	40
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	50

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	10
DNA53971-1359 (TAT171)	胃腫瘍	正常胃組織	
DNA53971-1359 (TAT171)	神経内分泌腫瘍	正常神経内分泌組織	
DNA53971-1359 (TAT171)	神経系腫瘍	正常神経系組織	
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	20
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	正常神経系組織	

## 【 0 2 1 5 】

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

遺伝子発現情報を含む専用データベース (GeneExpress (登録商標), Gene Logic Inc., ゲーサーズバーグ, メリーランド) を分析して、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、GeneExpress (登録商標) データベースの分析を、Gene Logic Inc., ゲーサーズバーグ, メリーランドを介して入手可能な GeneExpress (登録商標) データベースで使用するためのソフトウェア、又はジェネンテック社で作製されて開発された GeneExpress (登録商標) データベースで使用するための専用ソフトウェアのいずれかを利用しておこなった。この分析でのポジティブヒットの割合は、例えば、組織特異性、腫瘍特異性及び正常な本質的組織及び / 又は正常な増殖組織における発現レベルを含む幾つかの基準に基づいている。下記は、GeneExpress (登録商標) データベースの分析から決定された組織発現プロファイルによって、他の腫瘍及び / 又は正常組織と比較して、特定の腫瘍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。

## 【 0 2 1 6 】

分子	発現のアップレギュレーション :	比較の対象 :
		<u>正常組織</u> <u>腫瘍組織</u>
DNA71290-1630 (TAT169)	乳房腫瘍 胃腫瘍 肺腫瘍	乳房 胃 肺

	肝臓腫瘍	肝臓	
DNA76393-1664 (TAT170)	乳房腫瘍 大腸腫瘍 肺腫瘍 肝臓腫瘍 胃腫瘍 腎臓腫瘍 脾臓腫瘍 前立腺腫瘍 子宮腫瘍 直腸腫瘍 卵巣腫瘍 脳腫瘍	乳房 大腸 肺 肝臓 胃 腎臓 脾臓 前立腺 子宮 直腸 卵巣 脳	10
【 0 2 1 7 】			
分子	発現のアップレギュレーション :	比較の対象 :	
		正常組織	腫瘍組織
DNA53971-1359 (TAT171)	乳房腫瘍 大腸腫瘍 肝臓腫瘍 胃腫瘍 腎臓腫瘍 脾臓腫瘍 皮膚腫瘍 神経内分泌腫瘍 神経系腫瘍 前立腺腫瘍 胸腺腫瘍	乳房 大腸 肝臓 胃 腎臓 脾臓 皮膚 神経内分泌 神経系 前立腺 胸腺	20
DNA56439-1376 (TAT172)	乳房腫瘍 大腸腫瘍 肝臓腫瘍 腎臓腫瘍 脾臓腫瘍 皮膚腫瘍 下垂体腫瘍 神経系腫瘍 前立腺腫瘍 子宮腫瘍 卵巣腫瘍	乳房 大腸 肝臓 腎臓 脾臓 皮膚 下垂体 神経系 前立腺 子宮 卵巣	30          40
DNA64852-1589 (TAT173)	乳房腫瘍 骨腫瘍	乳房 骨 頸部 結腸直腸 食道 心臓 腎臓 肝臓 肺 子宮 卵巣	50

子宮	脾臓
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	

10

## 【0218】

実施例3：ハイブリダイゼーションプローブとしてのTATの利用

以下の方法は、TAT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TATをコード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相等的なDNA（TAT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DNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄を、次の高ストリンジェンシー条件下において実施する。放射標識TAT誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5xSSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2x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℃で20時間実施する。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDS水溶液中において42℃で実施する。

20

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TATをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAを同定することができる。

## 【0219】

実地例4：大腸菌におけるTAT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TATの非グリコシル化型の調製を例証する。

30

選択したPCRプライマーを利用して、TATをコードするDNA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pBR322（大腸菌由来；Bolivarら，Gene，2:95（1997）を参照のこと）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、PCR増幅配列をベクターヘ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、trpプロモーター、ポリhisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリhis配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、TATコード領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコードする配列を含む。

40

## 【0220】

次いで、Sambrook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LB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DNA配列決定によって、プラスミドDNAを単離し、確認することができる。

選択したクローンを、抗生物質で補填されたLBプラ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

50

。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TAT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。

#### 【0221】

以下の手法を用いて、ポリ-Hisタグ形態でTATを大腸菌で発現させてもよい。選択したPCRプライマーを用いて、TATをコードするDNA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、並びに効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、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、PCR増幅を施したポリ-Hisタグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用する。形質転換体を、最初に50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で、30 で振盪しながら3-5のOD、600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CRAP培地(3.57gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7mMのMgSO<sub>4</sub>の混合で調製)とし、そして30 で振盪によって約20-30時間成長させる。SDS-PAGE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。

10

20

#### 【0222】

0.5から1Lの発酵(6-10gペレット)の大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁する。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを、各々の最終濃度が0.1M及び0.02M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30分間、ベックマン超遠心分離機により40,000rpm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(6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルター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5mLのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷する。このカラムを、50mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄する。タンパク質を、250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離する。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、280nmにおけるその吸収によって見積もった。

30

#### 【0223】

試料を20mMトリス、pH8.6、0.3M NaCl、2.5M尿素、5mMシステイン、20mMグリシン及び1mM EDTA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50~100マイクログラム/ml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12-36時間ゆっくりと攪拌する。リフォールディング反応は、TFAを最終濃度が0.4%(約3のpH)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0.22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2-10%となるように添加する。再生したタンパク質を、10~80%のアセトニトリルのグラジエントによる溶離をとまなう0.1% TFAの移動バッファーを使用して、Poros R1/H逆相カラムによるクロマトグラフに付ける。A<sub>280</sub>吸収を持つ分画のアリコートをSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同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

40

50



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。

#### 【0224】

所望の再生したTAT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G25 Superfine (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0.14 M 塩化ナトリウム及び4 % マンニトールを含む20 mM のHepes、pH 6.8に調製した。

ここで開示されたあるTAT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。 10

#### 【0225】

##### 実施例5：哺乳動物細胞におけるTATの発現

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10 µgのpRK5-TAT DNAを、約1 µgのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 µlの1 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl<sub>2</sub>に溶解する。この混合物に、滴状の500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mM NaCl、1.5 mM NaPO<sub>4</sub>を添加し、25 で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 で約4時間に渡って定着させた。培地を吸引し、2 ml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。 30

#### 【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200 µCi/ml<sup>35</sup>S-システイン及び200 µCi/ml<sup>35</sup>S-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、スピンドーターで濃縮し、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、Somparyac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、700 µg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、5 µg/mlウシインシュリン、及び0.1 µg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、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 50

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。CaPO<sub>4</sub>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<sup>35</sup>S-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。サブクローン挿入物を、PCRを施してポリ-hisタグ等の選択されたエピト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-hisタグTAT挿入物を、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40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-hisタグTATを含む培地は、次いで濃縮し、Ni<sup>2+</sup>-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TATは、一過性発現法によってCHO及び/又はCOS細胞で、他の安定な発現方法によってCHO細胞で発現させてもよい。

CHO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、CH2及びCH2ドメイン及び/又はポリ-Hisタグ形態を含むIgG1定常領域配列へ融合しているIgG作成物(イムノアドヘシン)として発現させる。

#### 【0231】

PCR増幅に続いて、Ausubelら、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DNAをCHO発現ベクターにサブクローニングする。CHO発現ベクターを、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの簡便にシャトル化ができるように作成する。CHO細胞での発現に利用されるベクターは、Lucasら、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようなものであり、対象とするcDNA及びジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター/エンハンサーを用いる。DHFR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DNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を使用して、約1千万のCHO細胞に導入する。この細胞を、上記のLucas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 $3 \times 10^7$ の細胞をアンプルで凍結する。

#### 【0232】

このプラスミドDNA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10mLの媒質を含む遠心管へピペットし、1000rpmで5分間遠心分離する。その上清を吸引し、細胞を10mLの選択培地(0.2µm濾過PS20、5%の0.2µm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90mLの選択培地を含む100mLスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地で満たした250mLスピナーに移し、37℃でインキュベートする。2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを $3 \times 10^5$ 細胞/mL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CHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された

10

20

30

40

50

米国特許第 5, 122, 469 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  $1.2 \times 10^6$  細胞 / mL 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 33 に変え、30 mL の 500 g / L のグルコース及び 0.6 mL の 10 % 消泡剤（例えば 35 % ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）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。10 日後又は生存率が 70 % を下回るまで、細胞培養を遠心分離で回収して 0.22  $\mu$ 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。

#### 【0233】

10

ポリ-His タグ作成物に関しては、タンパク質を Ni-NTA カラム（Qiagen）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを馴化培地へ 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 Hepes, pH 7.4 バッファーで平衡化した 6 mL の Ni-NTA 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 G25 Superfine（ファルマシア）カラムで、10 mM Hepes、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。

#### 【0234】

20

イムノアドヘシン（Fc 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  $\mu$ L 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-His 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（Edman）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 TAT 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。 30

#### 【0235】

#### 実施例 6：酵母菌での TAT の発現

以下の方法は、酵母菌中での TAT ポリペプチドの組換え発現を示す。

第 1 に、ADH2 / GAPDH プロモーターからの TAT の細胞内産生又は分泌のために、酵母菌発現ベクターを作成する。TAT をコードする DNA 及びプロモーターを、選択したプラスミドの適切な制限酵素部位に挿入して TAT の細胞内発現を指示する。分泌のために、TAT をコードする DNA を、選択したプラスミドへ、ADH2 / GAPDH プロモーターをコードする DNA、天然 TAT シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌 因子又はインペルターゼ分泌シグナル / リーダー配列、並びに（必要ならば）TAT 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。 40

#### 【0236】

酵母菌株 AB110 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-PAGE による分離に続くクマシーブ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 TAT 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。TAT 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 50

することができる。

ここに開示したあるTAT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。

#### 【0237】

#### 実施例7： バキュロウイルス感染昆虫細胞でのTATの発現

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

TATをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグには、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)が含まれる。pVL1393(Navagen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む、種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、TAT又はTAT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PCR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。

10

#### 【0238】

組換えバキュロウイルスは、リポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(Pharmlngen)をSpodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)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。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'Reilleyら, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施する。

20

#### 【0239】

次に、発現したポリ-hisタグTATを、例えば $\text{Ni}^{2+}$ -キレートアフィニティー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、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載のように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH 7.9; 12.5mMの $\text{MgCl}_2$ ; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)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NaCl、10%グリセロール、pH 7.8)で50倍希釈して0.45µmフィルターで濾過する。 $\text{Ni}^{2+}$ -NTAアガロースカラム(Qiagen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 $A_{280}$ 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NaCl、10%グリセロール、pH 6.0)で洗浄した。 $A_{280}$ 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、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に共役させた $\text{Ni}^{2+}$ -NTAによるウェスタンブロットで分析する。溶離したHis<sub>10</sub>-タグTATを含む分画をプールして負荷バッファーで透析する。

30

40

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

ここに開示したあるTAT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】

50

**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 Goding 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 l b / c 等のマウスを、完全フロイントアジュバントで乳化した T A T 免疫原を 1 - 1 0 0 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 M P L - T D M アジュバント (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 1 0 から 1 2 日後に、選択したアジュバント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 T A T 抗体の検出のための E L I S A アッセイによる試験するためのに、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。

10

20

30

**【 0 2 4 1 】**

適当な抗体価が検出された後、抗体に対して「ポジティブ (陽性)」な動物へ T A T 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 ( 3 5 % ポリエチレングリコールを用いて )、A C T T から番号 C R L 1 5 9 7 で入手可能な P 3 X 6 3 A g U . 1 等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させる。そして、融合によって、H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン) 培地を含む 9 6 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、T A T に対する反応性についての E L I S A でスクリーニングされる。T A T に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ (陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注入し、抗 T A T モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラ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 T A T 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。

**【 0 2 4 2 】****実施例 9 : 特異的抗体を用いた T A T ポリペプチドの精製**

天然又は組換え T A T 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-T A T ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-T A T ポリペプチドは、対象とする T A T 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 T A T 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。

40

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 L K B 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、C n B r - 活性化セファロース (商品名) (ファルマシア L K B 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、樹脂をブロックし、誘導体樹脂を製造者の指示に従って洗浄する。

**【 0 2 4 3 】**

50

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のT A T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T A T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T A T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T A T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、T A T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）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ン酸イオン等のカオトロップ）でカラムを溶離し、T A Tポリペプチドを回収する。

10

#### 【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
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	203127	1998年8月18日

20

#### 【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(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許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。

30

#### 【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。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0248】

50



## 【図 4】

GAGGAACCTACCGGTACCGGCGCGCGCTGGTAGTGCSCGGTGTGGCTGCACCTACCAATCCCGTGGCGCGCG  
CTGGCCCTGGAGCGTGGGTGATCTCTCTGGCAGCGGGTCTTGGGCTGGCGAGCGGGTCCGCGCG  
GGGTTTGAAGATGGGGAAGTAGCTACAGGAAGCCGCCCGCGATGGCAGGTATATTTTGTGGAATGAAGAAGGA  
AGTATTAGAAATGAGCTGAAGACCATTCACAGATTAAATTTTGGGGACAGATTGTGATGCTTGATTCAACCT  
TGAGTATATGTAGACAGAAGTCTCAATTTGCAATTACATCAACTGGAAACGACAGTGAATCTTAATGTTCAC  
TAAATCCAGACTTCGATAGAAGAGCAAGGAGAGTCTGGTTAAATAAAGATGCTATATCAGAGACTTGAAGAAG  
GATCATCTCTGTTTCTGATAGGTGTAATTTAGTGGGCGCAGATCAGAGATTTCAGAGTTTACTTGG  
AGTGTCCAAACTGCAGACAGTAGCAAAATAGACAGAGCTTTCAGAGAAATGGCAATTGAAGTTACATCTCGATPA  
AAACCGCAATAAACCAGATGCACATGGGAGATTTTTAAAAATAAATAGACATATGAAGTACTCAAGAGTGAAGA  
TCTACGGAAAAAGTATGACAAATATGGAGAAAGGAGCTTGAGGATAATCAAGGTGGCCAGTATGAAGCTGGAA  
CTATTATCTGTTGATTTTGATTTTAAGATGATGATGCTTGAATTCATACATTTGGAAGAAAGAGAAATTTGATSC  
TGCCTTAATCTGGAGAGATGGGTTGTAATTTTAACTCCAGGCTGTTACATCGCGATTAATGTATGTC  
CACATGGAGAGACTTGTCTAAAGAGTGGATGGGTACTTCTGAATTCGAGCTGTTAACCTGTGGTGAATGATGAT  
GCTTTCCGGAATGAAGAGAGTCAACAGCTATCCCACTGCTCTTCAATTTTGGGTCTGGAATGGCCCGAGTGAATA  
TCATGGAGACAGATCAAGAGAGAGATTTAGTGAGTTTTCAGATTCAGCATGTAGAGTACAGTCAACAGACTTTG  
GACGAGAAATTTGTCACTCCATACAACTGCTTTGCTGCTGGTATGGCTGGCTGACACTTTTGTGTCAAA  
AGAGGAGATTGTTGCTCTCCAGGACAGACTCAGGCTTAGTGCATGTTGTCTCAACTCATGAGAGCTAA  
AGAAATATATTGGAGTATATACATAATCTTCCAGATTTCGAACACTTTCCGCAAAACACACTAGAGGATCGTTT  
GGCTCATCTCGGTGGCTGTATTTTTCATTTTGGAAAAAATGAATAATCAATGATCCTGAGCTCAAAAACT  
AAAACTCTACTTAAAAATGATCATATCTCAGTTCGCAAGGTTTGACTGTTCTCTGACCCAGCATCTGTAGTAA  
TCTGTATGTTTTCCGCGCTCTTAGCGGTATTTAAAGCAAGAGACCAAGAAATGAAATTCATCATGAAAG  
GAAGATTCTATATGATATCTTGGCTTGGCAAGAAAGTGTGAATTCATGATTACCAAGCTTGAGACTCAAAA  
TTTTCTCCGCAATGACAAAGAACCTAGGCTGTTGTGATTTCTTTGCCCGCTGGTGTCCACCATGTGCGAGCTTACT  
ACCAGAGTTACGAGAGAGCTCAATCTCTTTTAGTGCAGCTTAAGTTTGGTACACTAGATTGTACAGTTTCATGA  
GGGACTCTGATCAATCTATCAATTCAGGCTTATCCAAACAGTGTATTCACACAGTCCACATCTGATGATTA  
TGAAGGACATCTCCTCTGGAGAAATCTGAGTTCTGAGAGATTTATGACACTTCAGTGGTCCCTGTAC  
ACCACACACTTCACAGACTAGTTTACAGCAAGAAACACCAAGAGAGTCTGAGTGGTGAATTTCTATTCCCGGTG  
GTGCTCATCTTGCCAGTCTTAATGCCAGAAAGGAAAGAAATGGCCCGGACATTAACTGGAAGTATGATCAACGCTGGG  
CAGTATAGATTGCCACAGTATCATCTTTTGTGGCCAGAGAAAGGTTCAAGAGTACCCCTGAGATAGATTTT  
TCCCCCAAAATCAAAATGAAGTCTTCAAGTACAGATTAAGTGTGGAATAGAGGTCTATTCCCTGAGAT  
CTGGGCTCTAGGATTTTACTCAAGATTCACAGACTCAACAGCTCAGACTTCAGTGAAGAAAGTTTACAGAG  
GAAATCATTGGGTGATTGATTTCTATGCTCCTTGGGTGGACCTGCCAGAAATTTGCTCCAGATTTGAGCT  
CTTGGCTAGGATGATTAAGAGAAAGTGAAGTCTGGAAGATAGACTGTCAAGGCTTATGCTCAGACATGCCAGAA  
AGCTGGAGCAGGCGCTATCCAGCTGTAGTGTTTATTTCTACGAAGAGACCAAGAGAAATTTCAAGAGAGCA  
GATPAATACCAAGAGCGCAAGAGTCCCTGCTTATTAAGTGAATAATGGAACTCTCCGAATCAGGGCA  
GGGAAATAGGATGAATTTGAATAGTGTGAAGTGAAGAAAGATTTAAAGAAATTTGACAGATGATGACATCAG  
AAGACACTATTAGAAATGTATCATTTATGATGGGAATGATGACACTATCTAGACTTGACGTTGTACTGCCA  
GAATATTCTACAGCACTGGTGTAAAGAGAGGCTCTSCAACTTTTCTGTAAGGCGCGGTTTACAAATATTTTA  
GACTTTGCGAGCTATATATATGTTTACACATGAGAAACAGAAATAGGTCATCATGATTTCTGTGATTTGCT  
TTTAAAGACTTTAAAGAAATCAAAAGCTTTTATGCTCAGAGCTCAAGAAAGTGGTGGATTCAGTCCATG  
GACCATAGTTGCTGTGCCCTCGACGGACTTAAATGTTTCAGTGGCTGGCTGAACATGAGCTGCTGTGCT  
ATCTACATAAATGCTCAGTGTGATAAAGTCACTTTCCCTCACGTTTTTGGCTGACCTGAAGAGAGTAACT  
TAGTTTTGGTGCACTTGTTCTCCATAAAGTGCATCCCTACACATCATTTATATTTGTTTAAAGAACCCCAT  
GATGTGGCAGCTAAACAGCCCTGTATGCTTAT  
AAGTTTGAAGAAAGCTTTTATATTTTTCACAGCGAGAAACAGTGCAGCAGTATATGTGCTACAGATGATCAC  
AAATTTGAGCAAGCTAAGTGCAGAAATTTCTAGTTTGTCTATCATCCAGGAACACTGAGGAGAAAAAATTA  
TAGCAATTAAGTGGGCTTGTAGATATCTTAATATCTTAATATGTTATCAAGTATTAGAGATTCTATATTTAAAGTATA  
TGTGTCTATGATTTTCTGAATTTGCTTCAAGAAATTTCCACATGATAGTTGATTTTGAAGCATCIAHAT  
ATCAATATTTGGCTGTGATTTGTTTGAAGTGTATCTTATTTACATGGGTTTCTGTTCAAGTATTGTTG  
TTTTTCACTCCTGCTCAGTCTATTTATATCAATAGGAAAAATTACTTTACAGGTTGTTTTACTGTAGCTTAT  
AATGATATCTAGTTATTCAGATTAAGTACTGTACTGTGAGAGGGCTGCCCTTTTCAGATTAATATGATCAATAA  
ACTGAGGTTATTTTATAGAAATCAAGTATATAAATCAGGAAAGGATCTTCTAGTTTCTGTGTTGTTTGA  
CTCAAGATTCACAAATTTCTCAGTACAGTGTAGTGTATTAGTTATATTCAGGTTGTCAGAGTGTAAAAAT  
CCATCTAGTCAAGAGGATCTCAATGATTAAGGCTTGCACATTTTCAAAAAAAGAAAAA

## 【図 7】

MRPQGPAAAPQRLRGLLLLLLQLPAPSSASEIPKQKQAKQREVVLYLNGMCLQGPAGVPRGDRGSPGANVIF  
GTPGIGPRDGFKEKGECRESFEESWTFPNYKQCSWSLNYGLDGRIAECTFTKMRNSALRVLFSGSLRLCKR  
NACCQRWYTFNGAECSCGPLIEAIIYLDGSGPEMNSTINHRTSVEGLCEGICAGLVDAIVWGTCSDYPRGDO  
ASTGWSVSRHIIIELEPK

シグナル配列。

アミノ酸 1-30

N-グリコシル化部位。

アミノ酸 186-189

N-ミリスチル化部位。

アミノ酸 67-72, 117-122, 163-168, 199-204, 203-208

## 【図 8】

MEFPSAALGKALCALLLATLGAAGQPLGECISARAPAKYSITFTGKWSQTAFFKQYPLFRPPAQWSLLGA  
AHSDSYMRKNQYVSNGLRDFAEERGEAWALKKIEAAGALQSVHEVFSAPVPSGTGQTSAELEVQRHSLVS  
FVVRIVSPDWFGVDLDCDGRMEQDALDLYPDAGTDSGTFSSPNFATIPQDTVTEITSSSPSHPANSE  
YYPRLKALPPIARVTLRLRQSPRAFIPPAVLFSRDMIEVDSASVETPLDCEVSLWSWGLCGGHCGRIGTKS  
RTRYRVOPANNGPSCEPELEEAECVPDNCV

シグナル配列。

アミノ酸 1-26

グリコサミノグリカン付着部位。

アミノ酸 131-134

cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位。

アミノ酸 144-147

N-ミリスチル化部位。

アミノ酸 26-31, 74-79, 132-137, 134-139, 190-195, 287-292, 290-295

## 【図 5】

GGCAACAGGCTCAGCAGGCTTGCCCCAGAGCCATGGCAAGAATGGACTGTAAATTTGCACTCCTGGTGATCACC  
TTACTCTCTGGACAGACCACAGCCACACATCCAGATTAAAGCGCAGGAAGCACAGCAACCTCGAGTAGAGAGCA  
AAGGATGGAGATCTGAAGACTCAAATGGAAGCTCTGGACAGAGTCAATGCTTGAAGGAATTCAGGCGCTG  
CAGACAGTCTGTCTCCGAGGACTAAAGTTCAACAAGAAATGCTACCTTCTCAGAAAGTTTGAAGCATTTCCAT  
GAGGCGCAATGAAGACTGCAATTTCCAAAGGAGGAATCCTGGTTATCCCGAGGAACCTCGACGAATCAAGCGCTC  
CAAGACTATGTTAAAGAGAGCTGCCAGGTGTCAATGACTTTGGCTGGGCACTCAATGACATGCTCAGGAGAGGC  
AAGTTTGTGACTCAACGGAAATCGCTATCTCCTCACTGGGACCGTGACAGCTTAACGGTGGCAGAGCGA  
GAARACTGTGTCTGTCTCTCCCAATCAGCTCAGGGCAAGTGGAGTGAATGAGGCTGTGCGAGCAGCAAGAGTAC  
ATATGCGAGTTACCATCCCTAAATAGAGTCTTCTCCATGTGTCTCCAGCAAGATTCACTCATACCTATATAGG  
TTCATGATCTCTAAGATCAAGTAAATATCAATAATTTTACTTATTAAGAAATTTGCAACACAGATCAATGCTCAT  
AGCAATATGATGACATCAGCCAAATTTGCTTACACATTTCTTTGGGATTTTGCCCTTCTCGGGGTATAGGGGATC  
AGAAATATTGATCCATGTGCAAGCAGATAAATGGCTTCTGTAAACAGACTAAAACTTTCTCTCTAGTCTTTC  
TCACTGTACAAACCCAGTTTGTTCAAAAAATCAGACTAGCAATGCAACTCATCACTCTAGAAAAGCAGAGCTT  
AGGCTACCTGAAAAGATTTCCTCTGGAAGTTTAGCGTATGTTGACTACAAATAATTCCTACATCAGAGACTCT  
AGGCTCATATATATCCAAAACTTTTCAAGCTGTGCTCATTTCTGTCCCATGTCGCAATATACCTTGCAGCC  
CATTACCCTTATTTGAATGTGCTCCATCTCCTGGTGGGACTGTATCTTGTCTGCCATATCAGAACACAAACCCCC  
TGAAGAGGTTCTGATTTGATTTTTTTTTTCTCATGSCCTACCTTTTGTGAAGTTTCCAGCCGCAATTTGA  
AATGAATGACAGGTGTATTTTGAATTTTCAATTTCCACCATTGCAATTACAACTCTAACTTAAATGGGTA  
ACCTTAAGGCAATCAAGAGAGCAGATTGATGATAACCGGAATAGAAAAAGAACCTACATTTATTTGCTT  
TAGCATCTTACTCTCACTTTTATGAGATTGAGAGGGGACTACATTCCTTTTTACATTTTCTGTATATTTAT  
TTTTTTAGGCATCATATATGTTTAACTTATTTAGGCAACCAATCTTGAAGCTGAAAACTGAATTTAAG  
AATGCTATCTTGGAAAAATGCACTACGCTGTGCAATTTTTTATCTGCTAGTGTATTTCTGCTTTTAACTAG  
ATTGTACAAATTAATCTTCAATGTTAATATCAAAATACAAAGTTTAGACTGTGGAGGAAATGGGCTTTTAGAG  
CAACACATTTTAAATATATTTGTCTTCAAAATAATAGTGTTTAAAGACTGAATGTTTGTGAACAAATATCC  
CACTTTGCAAACTTTAACTACACATGTTGGATTAAGTTTAGTGTCTTCAATGCTCAATATAAGCCTGAA  
TCTGATCAATAAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

## 【図 6】

MKKVLLITAILAVAVFPVPSQDEKEKRSIDSDSLASGCFVFPYFPYFRFLPPIRPFRRFWRNRPPIPIES  
APTFTLPSEK

シグナル配列。

アミノ酸 1-17

## 【図 9】

MGVNNDYDIDRLKRIILCFILVYMAILVOTDQDFSYLLGVSKTASSREIRQAFKKALKLHKDPKNPNPNHAG  
DFLKNRAVEYVLKEDLRKKYDKYGEKLEDNGGGQYESWNYRYDFGIYDDDPRIITLERREFDAVNSGELWF  
VNFYSPGCSCHCDLAPTWRDFAKEVDGLLRIGAVNCGDDMLCRMKGVNSVPLTFPRSGMAPKVPYHGDREKSEL  
VSPAMOHVRSVTELMWGNFVNSIQTAFAAGIGWLITFSCGGGCLSTQRLRLSGMFLMSLDAKEIYLEVHYN  
LPDFELLSANTLEDRLAHRHWLFFHFGKNENSNDPELKKLTKLLKNDHIQVGRFDCSSAPDICSNIYVFPQSLA  
VFKGQGTKEYEIHGKKILYDILFAKESVNSVVTTLGPNFPANDKEPWLVDFFAPWCPPCRALLPILRRASNL  
LYQKLFGLDCTVHEGLCMWNIQAYPTTVVFNQSNIEYEGHHSAEQILEFIEDLMNPSVSLTPTFNELVET  
QRKHNEVWWDVPSFWCHPQVLMPEYKRMARTLTGLINVGSDIQQYHSCAQERNVQRYPIRFFPPKSNKAYQ  
YHSYNGWRNDAYSRLRWGLFLPQVSTDLTPQTFFSEKVLQKNHWNIDFYAPWCPGCFNFAPEFELLARMIKGV  
KAGKVDCAQYACTQKAGIRAYPTVKFYVERAKRNFQEEQINTRDAKATAALISEKLETLRNOGRKNDKEL

シグナル配列。

アミノ酸 1-48

N-グリコシル化部位。

アミノ酸 484-487

cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位。

アミノ酸 445-448

N-ミリスチル化部位。

アミノ酸 2-7, 41-46, 103-108, 110-115, 157-162, 182-187, 243-248, 458-463, 566-571

アミド化部位。

アミノ酸 389-392, 739-742

小胞体標的配列。

アミノ酸 744-748

チトクロムcファミリー ヘム結合部位シグネチャー。

アミノ酸 158-163

チオレドキシシ。

アミノ酸 128-234, 406-509, 511-592, 623-703

DnaJドメイン。

アミノ酸 35-100



【図 10】

MAQQACPRAMAKNGLVICILVITLLDQTTSTSRLLKARKHSRRVRDKDGLKTQIEKLMTEVNALKEEQALQT  
VCLRGTKVHKCYLASEGLKHFHEANEDCISKGGILVIPRNSDEINALQYIGRRSLPGVNDFWLGINDMVTEGKF  
VDVNGIAISFLNWDRAQFNGGKRENCVLFSSAQGWSDACRSSKRYICEFTIPK

シグナルペプチド。  
アミノ酸 1-31

N-ミリスチル化部位。  
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

【配列表】

2006104212000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	Y
	A 6 1 P 35/00	

(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)

(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, バーリングゲーム, 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 ポラキス, ポール  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリングゲーム, コーテツ アベニュー 1 4 4  
 9  
 (72)発明者 ウィリアムス, ビー. 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 BA41 CA01 DA02 DA05 GA11 HA01 HA15  
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA26 AA27 AA34 BB01 BB11 BB36 BB42  
 CC02 DD33 DD35 DD63 DD86 DD88 FF20  
 4H045 AA11 BA10 BA71 BA72 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74