(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6132357号
(P6132357)
(45)発行日　平成29年5月24日(2017.5.24)　(24)登録日　平成29年4月28日(2017.4.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	

請求項の数 31　外国語出願　(全 255 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-157393(P2014-157393)
(22)出願日　平成26年8月1日(2014.8.1)
(62)分割の表示　特願2010-517116(P2010-517116)の分割
原出願日　平成20年7月15日(2008.7.15)
(65)公開番号　特開2014-207919(P2014-207919A)
(43)公開日　平成26年11月6日(2014.11.6)
審査請求日　平成26年8月11日(2014.8.11)
(31)優先権主張番号　60/950,088
(32)優先日　平成19年7月16日(2007.7.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　PTA-7712

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　イボンヌ　チェン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０１，　サン　マテオ，　８ティーエイチ　アベニュー　２２２　ナンバー３２０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト化ＣＤ７９ｂ抗体およびイムノコンジュゲートならびにそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって：
以下の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）ＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号２３）である配列Ａ１～Ａ１６を含むＨＶＲ－Ｌ１と、
（ｉｉ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号２４）である配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２と、
（ｉｉｉ）ＦＱＧＴＨＦＰＦＴ（配列番号２５）である配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３と、
（ｉｖ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号３１）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１と、
（ｖ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号３２）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２と、
（ｖｉ）ＡＲＮＬＹＬ（配列番号３３）である配列Ｆ１～Ｆ６を含むＨＶＲ－Ｈ３と
を含み、該抗体は、
（ｉ）配列番号１０および配列番号１４の可変ドメインを含むモノクローナル抗体；
（ｉｉ）アクセッション番号ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７７１２を持つハイブリドーマから作製されたモノクローナル抗体のＦａｂフラグメント；または
（ｉｉｉ）アクセッション番号ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－７７１２を持つハイブリドーマから作製されたキメラ抗体の可変ドメイン

と同じエピトープに結合する、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
【請求項２】
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が２．０ｎＭである、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が２．０ｎＭ＋／－０．５３である、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
前記抗体がヒト化抗ＣＤ７９ｂ　２Ｆ２抗体であり、該ヒト化抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされたとき、腫瘍細胞増殖を阻害する、請求項１に記載の抗体。
【請求項５】
図１３に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよびＨＶＲ３－ＨＣの配列（配列番号３１～３３）を含む重鎖可変ドメインと、図１３に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよびＨＶＲ３－ＬＣの配列（配列番号２３～２５）を含む軽鎖可変ドメインとを含む、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
【請求項６】
配列番号１６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号１２のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項５に記載の抗体。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体をコードする、ポリヌクレオチド。
【請求項８】
前記抗体が１つ以上の遊離システインアミノ酸を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項９】
前記１つ以上の遊離システインアミノ酸が、Ｋａｂａｔナンバリング・コンベンションに従う軽鎖の１５、４３、１１０、１４４、１６８および２０５、ならびにＥＵナンバリング・コンベンションに従う重鎖の４１、８８、１１５、１１８、１２０、１７１、１７２、２８２、３７５、および４００から選択される位置の１つ以上の遊離システインアミノ酸を含む、請求項８に記載の抗体。
【請求項１０】
ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を作製する方法であって、該方法は、（ａ）請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で真核生物細胞およびＣＨＯ細胞を含む群から選択される宿主細胞を培養する工程と、（ｂ）該抗体を単離する工程とを包含する、方法。
【請求項１１】
細胞毒性剤に共有結合された、請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。
【請求項１２】
前記イムノコンジュゲートが、式Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）ｐを有し、ここで、
（ａ）Ａｂが請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体であり；
（ｂ）Ｌがリンカーであり；
（ｃ）Ｄが薬物部分であり、そして
（ｄ）ｐが１～８である、
請求項１１に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１３】
Ｌが６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）

シクロヘキサン－１カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、ＳＰＤＢ、ＢＭＰＥＯ、またはＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢである、請求項１２に記載のイムノコンジュゲート。

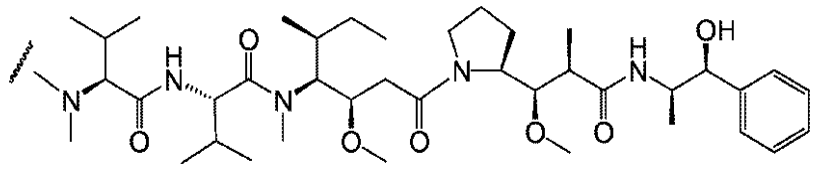
【請求項１４】

Ｄがアウリスタチンまたはドラスタチンである、請求項１２に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項１５】

Ｄが、以下の構造：

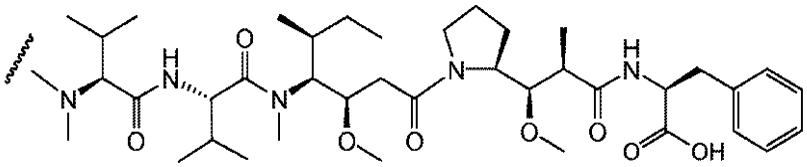
【化４】



を有するＭＭＡＥ、

以下の構造：

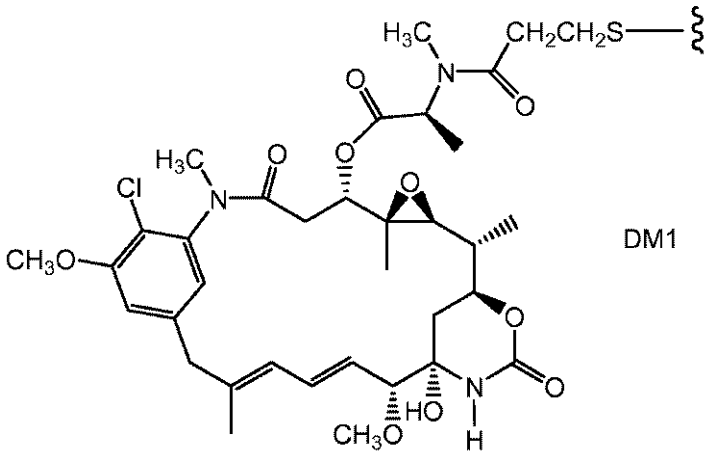
【化５】



を有するＭＭＡＦ、

以下の構造：

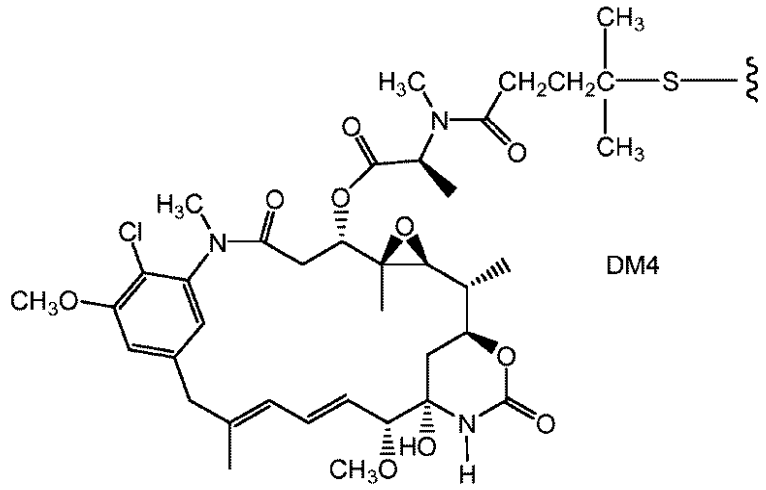
【化６】



を有するＤＭ１、または、

以下の構造：

【化７】

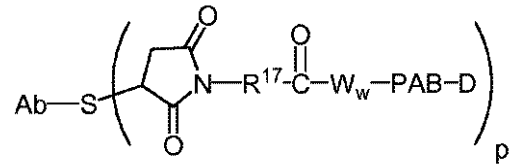


を有するＤＭ４であり、
ここで、波線がリンカーＬへの結合部位を示す、請求項１２に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項１６】

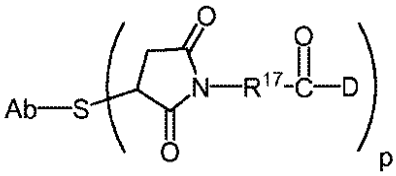
請求項１２に記載のイムノコンジュゲートであって、ここで、
（ｉ）前記イムノコンジュゲートが、以下の式：

【化１】



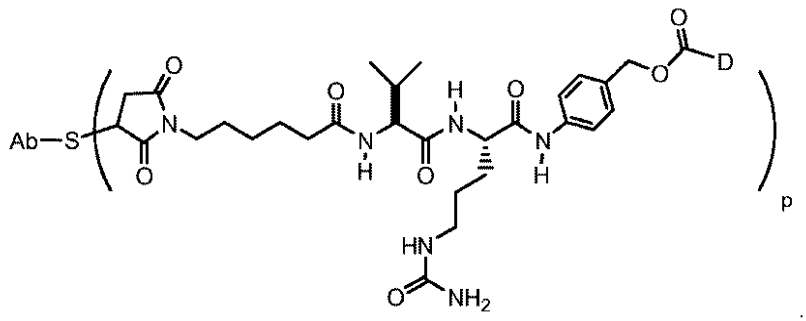
を有し、ここで、ＰＡＢが、パラ－アミノベンジルカルバモイルであり、かつＲ^{17}が（CH_2）$_r$、C_3－C_8カルボシクリル、Ｏ－（CH_2）$_r$、アリーレン、（CH_2）$_r$－アリーレン、－アリーレン－（CH_2）$_r$－、（CH_2）$_r$－（C_3－C_8カルボシクリル）、（C_3－C_8カルボシクリル）－（CH_2）$_r$、C_3－C_8ヘテロシクリル、（CH_2）$_r$－（C_3－C_8ヘテロシクリル）、－（C_3－C_8ヘテロシクリル）－（CH_2）$_r$－、－（CH_2）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2）$_r$－、－（CH_2CH_2O）$_r$－、－（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－、－（CH_2）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2CH_2O）$_r$－、－（CH_2）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－、－（CH_2CH_2O）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2CH_2O）$_r$－、－（CH_2CH_2O）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－、および－（CH_2CH_2O）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（CH_2）$_r$－から選択される二価のラジカルであり；Ｒ^{b}がＨ、C_1－C_6アルキル、フェニル、またはベンジルであり；かつｒが独立して１～１０の範囲の整数であり；Ｗがアミノ酸ユニットであり；$_w$が０～１２の範囲の整数であるか；
（ｉｉ）前記イムノコンジュゲートが以下の式：

【化２】

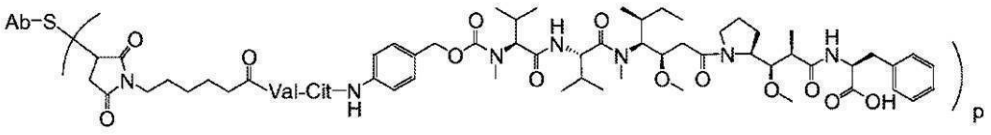


.

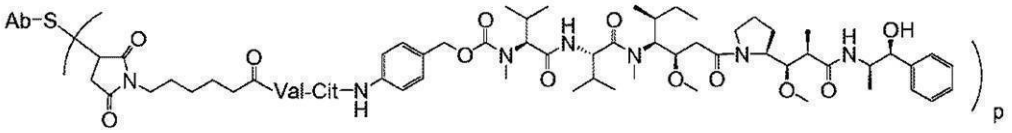
を有し、ここで、Ｒ^{17}が（ＣＨ$_2$）$_5$または（ＣＨ$_2$）$_2$であるか；または
（ｉｉｉ）前記イムノコンジュゲートが以下の式：
【化３】



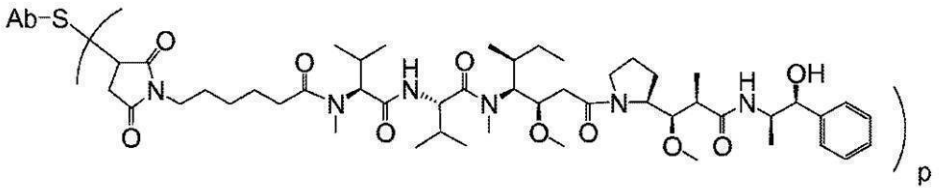
を有する、
イムノコンジュゲート。
【請求項１７】
前記イムノコンジュゲートが、以下の構造：
【化８】



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

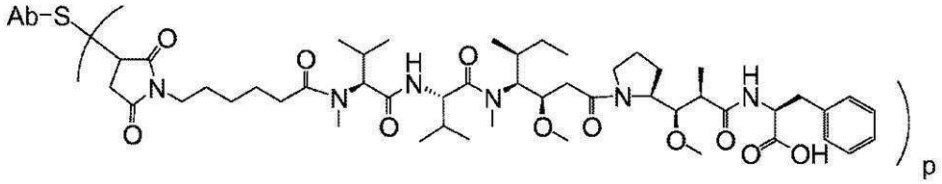


Ab-MC-vc-PAB-MMAE

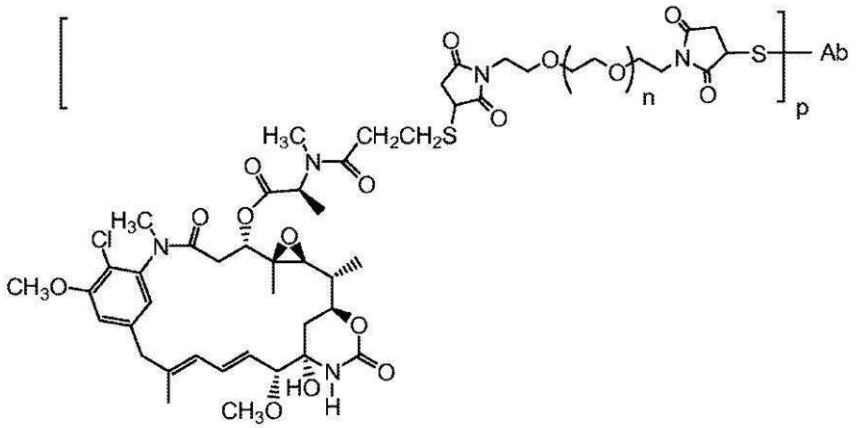


Ab-MC-MMAE

【化９】



Ab-MC-MMAF
または



Ab-BMPEO-DM1

から選択され、ここで、Ｖａｌがバリンであり、かつ、Ｃｉｔがシトルリンである、請求項１２に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項１８】

請求項１６に記載のイムノコンジュゲートであって、（ｉ）においてW_wがバリン－シトルリンである、イムノコンジュゲート。

【請求項１９】

請求項１６に記載のイムノコンジュゲートであって、（ｉ）においてR^{17}が$(CH_2)_5$または$(CH_2)_2$である、イムノコンジュゲート。

【請求項２０】

請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、薬学的組成物。

【請求項２１】

請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートを含む、ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖を阻害するための組成物。

【請求項２２】

請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートの有効量を含む、ガンを有する被験体を処置するための組成物。

【請求項２３】

請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートの有効量を含む、被験体の増殖性障害を処置するための組成物。

【請求項２４】
請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートの有効量を含む、細胞の増殖を阻害するための組成物であって、該細胞の増殖がＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも一部は依存している、組成物。
【請求項２５】
請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートを含む、Ｂ細胞増殖を阻害するための組成物。
【請求項２６】
請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体、または、請求項１１～１９のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートを含む、増殖性障害を処置するための組成物。
【請求項２７】
請求項２６に記載の組成物であって、前記増殖性障害が、ガンである、組成物。
【請求項２８】
前記Ｂ細胞増殖を阻害することが、ガンを処置するためのものである、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２９】
前記ガンが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、またはマントル細胞リンパ腫である、請求項２７または２８に記載の組成物。
【請求項３０】
細胞毒性剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項２０に記載の薬学的組成物または請求項２６に記載の組成物。
【請求項３１】
ＣＤ７９ｂを含有すると疑われるサンプル中のＣＤ７９ｂの存在を決定する方法であって、該方法は、該サンプルを請求項１～６および８～９のいずれか一項に記載の抗体に対して曝露する工程と、該サンプル中のＣＤ７９ｂへの該抗体の結合を決定する工程とを包含し、該サンプル中のＣＤ７９ｂへの該抗体の結合が該サンプル中の該タンパク質の存在の指標である、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願への相互参照）
本願は、米国特許法施行規則第１．５３条（ｂ）項の下、２００７年７月１６日に出願された米国仮特許出願第６０／９５０，０８８号の米国特許法第１１９条（ｅ）項の下の利益を主張し、この米国仮特許出願はその全体が、本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、哺乳動物における造血系腫瘍の処置のために有用な物質の組成物に、およびその処置のためにこれらの物質の組成物を用いる方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
悪性腫瘍（ガン）は、心疾患に続いて、米国における死亡の２番目に多い原因である（Ｂｏｒｉｎｇら、ＣＡ Ｃａｎｃｅｌ Ｊ．Ｃｌｉｎ．４３：７（１９９３））。ガンは、腫瘍塊を形成するように増殖する正常組織由来の異常なまたは新生物の細胞の数の増大

、これらの新生物性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、ならびに血液またはリンパ系を介して局所のリンパ節へ、および転位と呼ばれる過程を介して遠位の部位へ最終的に伝播する悪性細胞の発生によって特徴付けられる。ガンの状態では、正常な細胞が増殖しない条件下で細胞が増殖する。ガンは、種々の程度の侵襲性および悪性度によって特徴づけられる、広範な種々の形態でそれ自体の徴候を示す。

【０００４】

リンパ球、白血球、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞などの血液の細胞的な要素が生成される過程である造血の間に生成される細胞に関与するガンは造血系のガンと呼ばれる。血液およびリンパ組織で見出され得、免疫応答に重要であるリンパ球は、リンパ球の以下のような２つの主な分類：Ｂリンパ球（Ｂ細胞）およびＴリンパ球（Ｔ細胞）にカテゴリ分けされ、これらはそれぞれ、体液性免疫および細胞媒介性免疫を媒介する。

【０００５】

Ｂ細胞は骨髄内で成熟して、髄を出発し、それらの細胞表面上に抗原－結合抗体を発現する。ナイーブなＢ細胞が、その膜結合抗体が特異的である抗原に最初に遭遇したとき、その細胞は、急激に分裂を開始し、その子孫は、記憶Ｂ細胞および「形質細胞」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。記憶Ｂ細胞は、より長期の寿命を有しており、もとの親細胞と同じ特異性を有する膜結合抗体を発現し続ける。形質細胞は、膜結合抗体を生成しないが、代わりに分泌可能な形態の抗体を産生する。分泌された抗体は、体液性免疫の主要なエフェクター分子である。

【０００６】

Ｂ細胞関連障害としては、限定するものではないが、悪性リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、ＮＨＬ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）および慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ、Ｂ細胞白血病（ＣＤ５＋Ｂリンパ球）が挙げられる。非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）はＢリンパ球から主に生じるガンの異質なグループであって、全ての新しく診断されるガンのうち約４％に相当する（Ｊｅｍａｌ，Ａ．ら、ＣＡ－Ｃａｎｃｅｒ Ｊ Ｃｌｉｎ．，５２：２３～４７（２００２））。高悪性度ＮＨＬ（ａｇｇｒｅｓｓｉｖｅ ＮＨＬ）のうち約３０～４０％は成人のＮＨＬであり（Ｈａｒｒｉｓ，Ｎ．Ｌ．ら、Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｊ．，１：５３～６６（２００１））、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、末梢Ｔ細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫を含む。第一線の併用化学療法では、高悪性度ＮＨＬの患者の半分未満しか治癒せず、ほとんどの患者は、最終的には疾患に屈して死に至る（Ｆｉｓｃｈｅｒ，Ｒ．Ｉ．，Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２７（補遺１２）：２～８（２０００））。

【０００７】

Ｔ細胞は、未熟なＴ細胞の増殖および分化の環境をもたらす胸腺内で成熟する。Ｔ細胞成熟の間、Ｔ細胞は、Ｔ細胞レセプターを生じる遺伝子再配列、ならびに成熟Ｔ細胞の細胞表面の表現型を決定することを補助する正および負の選択を受ける。成熟Ｔ細胞の特徴的な細胞表面マーカーは、ＣＤ３：Ｔ細胞レセプター複合体、および共レセプターＣＤ４またはＣＤ８のうちの１つである。

【０００８】

癌の治療のための有効な細胞標的を発見しようと企図して、研究者らは１つ以上の正常な非癌性細胞と比較した場合ガン細胞の１つ以上の特定のタイプ（単数または複数）の表面で特異的に発現される膜貫通ポリペプチドか、そうでなければ膜会合ポリペプチドを特定しようとしてきた。多くの場合、このような膜会合ポリペプチドは、非癌性細胞の表面上に比べて癌細胞の表面上でさらに豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの特定は、抗体ベースの治療を介した破壊について癌細胞を特異的に標的する能力を生じさせている。これに関して、抗体ベースの治療は特定の癌の処置に極めて効果的であることが証明されていることに注意のこと。例えば、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）およびＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）（両方ともＧｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａより）は、それぞれ、乳癌および非ホジキンリンパ腫を処置するために首尾よく用いられている抗体である。さら

に詳細には、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）はヒト上皮成長因子レセプター２（ＨＥＲ２）プロトオンコジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組み換えＤＮＡ由来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％で観察されている。ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）は、正常および悪性のＢリンパ球の表面上で見出されるＣＤ２０抗原に対する、遺伝子操作されたキメラのマウス／ヒトのモノクローナル抗体である。これらの両方の抗体ともＣＨＯ細胞で組み換え産生される。

【０００９】

癌治療のための有効な細胞標的を発見するための他の試みにおいて、研究者らは、（１）１つ以上の特定のタイプ（単数または複数）の非癌性正常細胞（単数または複数）によるのと比較して、１つ以上の特定のタイプ（単数または複数）の癌細胞（単数または複数）によって特異的に生産される非膜会合ポリペプチド、（２）１つ以上の正常な非癌細胞（単数または複数）のそれよりも有意に高い発現レベルにて癌細胞によって産生されるポリペプチド、または（３）ポリペプチドであって、その発現が、癌および非癌状態（例えば、正常な前立腺および前立腺腫瘍組織）の双方において単一の（または非常に限定された数の異なる）組織タイプ（単数または複数）のみに特に制限されるポリペプチドを同定しようと探究してきた。このようなポリペプチドは細胞内に位置したままでもよいし、または癌細胞によって分泌されてもよい。さらに、このようなポリペプチドは、癌細胞自体によって発現されるよりは、むしろ癌細胞に対して増強効果または増殖促進効果を有しているポリペプチドを産生および／または分泌する細胞によって発現される場合がある。このような分泌されたポリペプチドはしばしば、正常な細胞よりも癌細胞に成長の有意性をもたらすタンパク質であり、これには、例えば、脈管形成因子、細胞接着因子、増殖因子等のようなものを包含する。このような非－膜会合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用の有効な治療剤として役立つことが予測されよう。さらに、このようなポリペプチドの発現パターンの同定は、哺乳動物における特定の癌の診断に有用であろう。

【００１０】

哺乳動物の癌治療における上記で確認された進歩にもかかわらず、各々、哺乳動物において腫瘍の存在を検出できるさらなる治療剤に対する、および新形成細胞増殖を効果的に阻害することに対する必要性は大きい。従って、本発明の目的は；ポリペプチドであって細胞膜会合したポリペプチド、分泌されるポリペプチド、または細胞内のポリペプチドであって、その発現が、癌および非癌性の双方の状態において単一の（または非常に限定された数の異なる）組織タイプ（単数または複数）のみ、造血系組織に特異的に限定される、ポリペプチドを同定し、それらのポリペプチドおよびそれらをコードする核酸を用いて、哺乳動物における造血系の癌の治療的処置および／または検出に有用な物質の組成物を生産することである。

【００１１】

ＣＤ７９はＣＤ７９ａ（Ｉｇα、ｍｂ－１）およびＣＤ７９ｂ（Ｉｇβ、Ｂ２９）を含んでいる共有結合性のヘテロ二量体から構成されるＢ細胞レセプターのシグナル伝達成分である。ＣＤ７９ａおよびＣＤ７９ｂは各々が、細胞外免疫グロブリン（Ｉｇ）ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメイン、免疫レセプターチロシン－ベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）ドメインを含む。ＣＤ７９は、Ｂ細胞で、および非ホジキンリンパ腫細胞（ＮＨＬｓ）で発現される（Ｃａｂｅｚｕｄｏら、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａ，８４：４１３～４１８（１９９９）；Ｄ’Ａｒｅｎａら、Ａｍ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，６４：２７５～２８１（２０００）；Ｏｌｅｊｎｉｃｚａｋら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｎｖｅｓｔ．，３５：９３～１１４（２００６））。ＣＤ７９ａおよびＣＤ７９ｂおよびｓＩｇは全てが、ＣＤ７９の表面発現に必要である（Ｍａｔｓｕｕｃｈｉら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３（３）：２７０～７））。ＮＨＬｓ上のＣＤ７９ｂの平均の表面発現は、正常なＢ細胞上の発現と同様であって、ただし範囲はさらに大きい（Ｍａｔｓｕｕｃｈｉら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３（３）：２７０～７（２００１））。

【００１２】
ＣＤ７９ｂの発現を考慮すれば、患者に投与されたとき、特に長期的な処置では、生じる抗原性が最小限であるかまたは全くないＣＤ７９ｂ抗原に対する治療抗体を産生することが有益である。本発明は、この要件および他の要件を満たす。本発明は、現行の治療組成物の限界を克服する抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、さらに下の詳細な説明から明らかである追加の利点をもたらす。
【００１３】
細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、すなわち、癌の処置において腫瘍細胞を殺傷するかまたは阻害する薬物の局所送達のための抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）、すなわち、イムノコンジュゲートの使用（Ｌａｍｂｅｒｔ，Ｊ．（２００５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ５：５４３～５４９；Ｗｕら（２００５）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２３（９）：１１３７～１１４６；Ｐａｙｎｅ，Ｇ．（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ３：２０７～２１２；ＳｙｒｉｇｏｓおよびＥｐｅｎｅｔｏｓ（１９９９）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９：６０５～６１４；Ｎｉｃｕｌｅｓｃｕ－ＤｕｖａｚおよびＳｐｒｉｎｇｅｒ（１９９７）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌ．Ｒｅｖ．２６：１５１～１７２；特許文献１）によって、腫瘍への標的化された薬物部分の送達およびその中での細胞内蓄積が可能になり、ここで、これらの非結合型薬剤の全身投与は、除去することが求められる腫瘍細胞のみならず、正常細胞にとっても容認できないレベルの毒性をもたらし得る（Ｂａｌｄｗｉｎら（１９８６）Ｌａｎｃｅｔ ｐｐ．（Ｍａｒ．１５，１９８６）：６０３～０５；Ｔｈｏｒｐｅ，（１９８５）「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ，」 ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａ．Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編集），ｐｐ．４７５～５０６）。治療係数を改善する労力、すなわち、ＡＤＣの効果が最大であって、かつ毒性が最小であることは、ポリクローナル抗体（Ｒｏｗｌａｎｄら（１９８６）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２１：１８３～８７）およびモノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）ならびに薬物連結および薬物放出の特性（Ｌａｍｂｅｒｔ，Ｊ．（２００５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ５：５４３～５４９）に焦点をあわせてきた。抗体－薬物コンジュゲートで用いられる薬物部分としては、細菌タンパク質毒素、例えば、ジフテリア毒素、植物タンパク質毒素、例えば、リシン、低分子毒素、例えば、アウリスタチン類、ゲルダナマイシン（ｇｅｌｄａｎａｍｙｃｉｎ）（Ｍａｎｄｌｅｒら（２０００）Ｊ．ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．９２（１９）：１５７３～１５８１；Ｍａｎｄｌｅｒら（２０００）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １０：１０２５～１０２８；Ｍａｎｄｌｅｒら（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３：７８６～７９１）、メイタンシノイド類（特許文献２；Ｌｉｕら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：８６１８～８６２３）、カリケアマイシン（Ｌｏｄｅら（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：２９２８；Ｈｉｎｍａｎら（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：３３３６～３３４２）、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンデシン（Ｒｏｗｌａｎｄら（１９８６）前出）が挙げられる。この薬物部分は、チューブリン結合、ＤＮＡ結合またはトポイソメラーゼ阻害を含む細胞毒性および細胞増殖抑制の機序を発揮し得る。いくつかの細胞毒性薬物は、大きな抗体またはタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートさせた場合に、不活性であるかまたは活性がより低い傾向がある。
【００１４】
アウリスタチンペプチド、アウリスタチンＥ（ＡＥ）およびモノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）、ドラスタチンの合成アナログ（特許文献３）は以下のような薬物部分にコンジュゲートされている：（ｉ）（癌腫上のＬｅｗｉｓ Ｙに特異的な）キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６；（ｉｉ）血液学的悪性疾患でのＣＤ３０に対して特異的なｃＡＣ

１０（Ｋｌｕｓｓｍａｎ，ら（２００４），Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １５（４）：７６５～７７３；Ｄｏｒｏｎｉｎａら（２００３）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２１（７）：７７８～７８４；Ｆｒａｎｃｉｓｃｏら（２００３）Ｂｌｏｏｄ １０２（４）：１４５８～１４６５；特許文献４；（ｉｉｉ）ＣＤ２０発現癌および免疫障害の治療のための抗ＣＤ２０抗体、例えば、リツキサン（ｒｉｔｕｘａｎ）（特許文献５）；（ｉｖ）結直腸癌の治療のための抗－ＥｐｈＢ２Ｒ抗体２Ｈ９（Ｍａｏら（２００４）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６４（３）：７８１～７８８）；（ｖ）Ｅ－セレクチン抗体（Ｂｈａｓｋａｒら（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６３：６３８７～６３９４）；（ｖｉ）トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、特許文献６）、および（ｖｉ）抗ＣＤ３０抗体（特許文献７）。アウリスタチンＥの改変体は、特許文献８および特許文献９に開示されている。モノクローナル抗体にコンジュゲートされたモノメチルアウリスタチンＥはＳｅｎｔｅｒら，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，第４５巻，抄訳番号６２３（２００４年３月２８日提出）に開示されている。アウリスタチンアナログＭＭＡＥおよびＭＭＡＦは種々の抗体にコンジュゲートされている（特許文献１０）。

【００１５】

薬物部分を抗体に対して、共有結合を通して結合、すなわち、連結する従来の手段では、一般に、この薬物部分が抗体上の多くの部位に結合された異質な分子の混合物がもたらされる。例えば、細胞毒性薬物は、代表的に、しばしば抗体の多数のリジン残基を通して抗体にコンジュゲートされて、異質な抗体－薬物コンジュゲート混合物を生じる。反応条件に依存して、この異質な混合物は、代表的に、０～約８個またはそれより多くの結合した薬物部分を有する抗体の分布を含む。さらに、特定の整数比の薬物部分対抗体を有するコンジュゲートの各サブグループ内で、薬物部分が抗体上の種々の部位に結合しているのは、潜在的に異質な混合物である。分析方法および調製方法は、コンジュゲート反応から生じる異質な混合物中の抗体－薬物コンジュゲート種分子を分離して特徴付けるには不適切であり得る。抗体とは、しばしば多くの反応性官能基を有する、大きく、複雑でかつ構造的に多様な生体分子である。リンカー試薬および薬物－リンカー中間生成物とのそれらの反応性は、ｐＨ、濃度、塩濃度および共溶媒などの要因に依存する。さらに、多工程のコンジュゲーションプロセスは、反応条件を制御し、反応物および中間生成物を特徴付けることが困難であることに起因して、再現性でない場合がある。

【００１６】

システインチオールは、ｐＨ７付近でプロトン化されて求核性が低い大部分のアミンとは異なり、中性のｐＨで反応性である。遊離チオール（ＲＳＨ、スルフヒドリル）基は比較的反応性であるので、システイン残基を有するタンパク質はしばしば、ジスルフィド結合したオリゴマーとしてそれらの酸化形態で存在するかまたは内部で架橋したジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般に、遊離チオールを有さない（Ｇａｒｍａｎ、１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，５５頁）。抗体システインチオール基は、一般に、求電子性のコンジュゲート試薬に対して、抗体のアミン基またはヒドロキシル基よりも反応性、すなわち、より求核性である。システイン残基は、リガンドに対する共有結合を形成するかまたは新規な分子内ジスルフィド結合を形成するために、遺伝子工学技術によってタンパク質に導入されている（Ｂｅｔｔｅｒら（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１３：９６４４～９６５０；Ｂｅｒｎｈａｒｄら（１９９４）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：１２６～１３２；Ｇｒｅｅｎｗｏｏｄら（１９９４）Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １：２４７～２５５；Ｔｕら（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９６：４８６２～４８６７；Ｋａｎｎｏら（２０００）Ｊ．ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，７６：２０７～２１４；Ｃｈｍｕｒａら（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８（１５）：８４８０～８４８４；特許文献１１）。しかし、システインアミ

ノ酸に対するタンパク質の種々のアミノ酸残基の変異によるシステインチオール基の設計は、特に不対（遊離Ｃｙｓ）残基または反応もしくは酸化のために比較的アクセス可能である基の場合、潜在的に問題がある。タンパク質の濃縮溶液において、Ｅ．ｃｏｌｉの周辺質（ペリプラズム）、培養上清または部分的にもしくは完全に精製されたタンパク質中のいずれにおいても、タンパク質の表面上の不対のＣｙｓ残基は、対になって酸化して分子間ジスルフィドを形成し得、それゆえ、タンパク質ダイマーまたはタンパク質マルチマーを形成し得る。ジスルフィドダイマー形成によって、新規なＣｙｓは、薬物、リガンドまたは他の標識に対するコンジュゲートについて不活性になる。さらに、タンパク質が新しく操作されたＣｙｓと既存のＣｙｓ残基との間に分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成する場合、両方のＣｙｓチオール基とも、活性部位の関与および相互作用に利用できない。さらに、このタンパク質は、誤った折畳みまたは三次構造の喪失によって、不活性にされ得るかまたは非特異的にされる場合がある（Ｚｈａｎｇら（２００２）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３１１：１～９）。

【００１７】

システイン操作された抗体は、ＦＡＢ抗体フラグメント（チオＦａｂ）として設計されて、全長のＩｇＧモノクローナル（チオＭａｂ）抗体として発現されている（Ｊｕｎｕｔｕｌａ，Ｊ．Ｒ．ら（２００８）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ３３２：４１～５２；特許文献１２、その内容が出典明記によって本明細書に援用される）。チオＦａｂおよびチオＭａｂ抗体は、チオール反応性リンカー試薬および薬物－リンカー試薬を用いて、リンカーを通じて、新規に導入されたシステインチオールでコンジュゲートされており、抗体薬物コンジュゲート（チオＡＤＣ）が調製されている。

【００１８】

特許出願および刊行物を含む本明細書の全ての引用文献は、その全体が出典明記によって援用される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１９】

【特許文献１】米国特許第４９７５２７８号明細書
【特許文献２】欧州特許第１３９１２１３号明細書
【特許文献３】国際公開第０２／０８８１７２号パンフレット
【特許文献４】米国特許出願公開第２００４／００１８１９４号明細書
【特許文献５】国際公開第０４／０３２８２８号パンフレット
【特許文献６】米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号明細書
【特許文献７】国際公開第０３／０４３５８３号パンフレット
【特許文献８】米国特許第５７６７２３７号明細書
【特許文献９】米国特許第６１２４４３１号明細書
【特許文献１０】米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号明細書
【特許文献１１】米国特許第６２４８５６４号明細書
【特許文献１２】米国特許出願公開第２００７／００９２９４０号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００２０】

発明の要旨

本発明は、抗ＣＤ７９ｂ抗体またはその機能的フラグメント、および造血系腫瘍の処置におけるそれらの使用方法を提供する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目１）

抗ＣＤ７９ｂ抗体であって：

（ａ）以下：

（ｉ）ＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１６を含

んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、
（ｉｉ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、
（ｉｉｉ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、
（ｉｖ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、
（ｖ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、
（ｖｉ）ＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３と、
からなる群より選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列；および、
（ｂ）配列番号５９、６０、６１、６２、６３または６４に示される配列のうち少なくとも１つの残基の改変を含んでいる、少なくとも１つの改変体ＨＶＲ、
を含む、抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２）
改変体ＨＶＲ－Ｌ３中のＣ１がＦである、項目１に記載の抗体。
（項目３）
改変体ＨＶＲ－Ｌ３中のＣ８がＦである、項目１に記載の抗体。
（項目４）
前記抗体がヒト化されている、項目１に記載の抗体。
（項目５）
前記フレームワーク配列のうち少なくとも一部がヒトコンセンサスフレームワーク配列である、項目１に記載の抗体。
（項目６）
前記改変が置換、挿入または欠失である、項目１に記載の抗体。
（項目７）
ＨＶＲ－Ｌ３改変体が以下の位置：Ｃ１（Ｆ）およびＣ８（Ｆ）のうちの任意の位置で１つの置換を含む、項目１に記載の抗体。
（項目８）
配列番号５９の配列を有しているＨＶＲ－Ｌ１を含んでいる、項目１に記載の抗体。
（項目９）
配列番号６０の配列を有しているＨＶＲ－Ｌ２を含んでいる、項目１に記載の抗体。
（項目１０）
配列番号６２の配列を有しているＨＶＲ－Ｈ１を含んでいる、項目１に記載の抗体。
（項目１１）
配列番号６３の配列を有しているＨＶＲ－Ｈ２を含んでいる、項目１に記載の抗体。
（項目１２）
配列番号６４の配列を有しているＨＶＲ－Ｈ３を含んでいる、項目１に記載の抗体。
（項目１３）
改変体ＨＶＲ－Ｌ３中のＣ１がＦである、項目１に記載の抗体。
（項目１４）
改変体ＨＶＲ－Ｌ３中のＣ８がＦである、項目１に記載の抗体。
（項目１５）
ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価親和性が、図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいるマウス抗体の一価親和性と実質的に同じである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目１６）
ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価親和性が、図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいるマウス抗体また

はキメラ抗体の一価親和性よりも少なくとも１倍、２倍または３倍大きい、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目１７）
ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価親和性が、図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいるマウス抗体またはキメラ抗体の一価親和性よりも少なくとも１、２または３分の１低い、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目１８）
前記マウス抗体が、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生される、項目１３、１４または１５に記載のヒト化抗体。
（項目１９）
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が、マウス抗体のその二価型での親和性と実質的に同じであって、かつ図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいる、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２０）
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が、マウス抗体またはキメラ抗体のその二価型での親和性よりもその二価型で少なくとも１、２または３倍大きく、かつ図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいる、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２１）
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が、マウス抗体またはキメラ抗体のその二価型での親和性よりもその二価型で少なくとも１、２または３分の１小さく、かつ図７（配列番号１０）および図８Ａ～図８Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変配列を含んでいる、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２２）
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が、２．０ｎＭである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２３）
ヒトＣＤ７９ｂに対する前記抗体のその二価型での親和性が、２．０ｎＭ＋／－０．５３である、項目２２に記載のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
（項目２４）
前記結合親和性がＫｄ値として表わされる、項目１５～２３のいずれかに記載の抗体。
（項目２５）
前記結合親和性がＢｉａｃｏｒｅまたはラジオイムノアッセイによって測定される、項目１３～２３のいずれかに記載の抗体。
（項目２６）
ヒトκサブグループ１コンセンサスフレームワーク配列を含んでいる項目１～３に記載の抗体。
（項目２７）
重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンンサスフレームワーク配列を含んでいる項目１～３に記載の抗体。
（項目２８）
前記フレームワーク配列が７１、７３および／または７８の位置で置換を含む、項目２７に記載の抗体。
（項目２９）
前記置換がＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔおよび／またはＬ７８Ａである、項目２８に記載の抗体。
（項目３０）

細胞毒性剤にコンジュゲートされたとき、腫瘍細胞増殖を阻害する、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ２Ｆ２抗体。
（項目３１）
前記ヒト化抗体およびキメラ抗体の両方とも一価または二価である、項目１～３０に記載の抗体。
（項目３２）
前記ヒト化抗体およびキメラ抗体の両方ともＦｃ領域に結合された単一のＦａｂ領域を含む、項目１～３１に記載の抗体。
（項目３３）
図１３（配列番号３１～３３）に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含む抗体。
（項目３４）
前記可変ドメインが図１３（配列番号２７～３０）に示されるＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣ配列を含む、項目３３に記載の抗体。
（項目３５）
前記抗体が（配列番号３４および／または３５）に示されるＣＨ１および／またはＦｃ配列を含む、項目３３または３４に記載の抗体。
（項目３６）
図１３（配列番号２３～２５）に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む抗体。
（項目３７）
前記可変ドメインが図１３（配列番号１９～２２）に示されるＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣ配列を含む、項目３６に記載の抗体。
（項目３８）
前記抗体が図１３（配列番号２６）に示されるＣＬ１配列を含む、項目３６または３７に記載の抗体。
（項目３９）
図１３（配列番号１２）に示される配列を含んでいるポリペプチド。
（項目４０）
図１３（配列番号１６）に示される配列を含んでいるポリペプチド。
（項目４１）
以下のプロセス：
（ａ）項目３３～３５のいずれかに記載の重鎖可変ドメインと項目３６～３８のいずれかに記載の軽鎖可変ドメインとを含む抗体を発現する細胞を培養する工程；および
（ｂ）該培養された細胞から該抗体を単離する工程、
によって作製される抗体。
（項目４２）
項目３３～３５のいずれかに記載の重鎖可変ドメインと、項目３６～３８のいずれかに記載の軽鎖可変ドメインとを含む、抗体。
（項目４３）
前記抗体が一価であって、かつＦｃ領域を含む、項目４２に記載の抗体。
（項目４４）
前記抗体が、配列番号１２から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している軽鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗体。
（項目４５）
前記抗体が、配列番号１６から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している重鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗体。
（項目４６）
前記抗体が配列番号６９、７０、７１および７２から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗

体。
（項目４７）
前記抗体が配列番号６５、６６、６７および６８から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗体。
（項目４８）
前記抗体が配列番号６９、７０、７１および７２から選択されるアミノ酸に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗体。
（項目４９）
前記抗体が配列番号６５、６６、６７および６８から選択されるアミノ酸に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む、項目１に記載の抗体。
（項目５０）
前記抗体が配列番号１６から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している重鎖可変ドメインを含む、項目４４に記載の抗体。
（項目５１）
前記抗体が配列番号１２から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している軽鎖可変ドメインを含む、項目４５に記載の抗体。
（項目５２）
配列番号１６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している重鎖可変ドメインを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体。
（項目５３）
配列番号１２のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している軽鎖可変ドメインを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体。
（項目５４）
配列番号１６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している重鎖可変ドメインと、配列番号１２のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有している軽鎖可変ドメインとを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体。
（項目５５）
項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
（項目５６）
項目５５に記載のポリヌクレオチドを含んでいるベクター。
（項目５７）
項目５６に記載のベクターを含んでいる宿主細胞。
（項目５８）
抗ＣＤ７９ｂ抗体を作製する方法であって、該方法は、（ａ）該抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で真核生物細胞およびＣＨＯ細胞を含んでいる群から選択される宿主細胞を培養する工程と、（ｂ）該抗体を単離する工程とを包含する、方法。
（項目５９）
配列番号２のアミノ酸２９～３９または配列番号７８のアミノ酸１～１１由来のＣＤ７９ｂの領域内のエピトープに結合する、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目６０）
前記ＣＤ７９ｂが細胞の表面上で発現される、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目６１）
前記細胞がＢ細胞である、項目６０に記載の抗体。
（項目６２）
前記Ｂ細胞がＢ細胞増殖性障害に関連する、項目６０に記載の抗体。

（項目６３）
前記Ｂ細胞増殖性障害がガンである、項目６２に記載の抗体。
（項目６４）
前記Ｂ細胞増殖性障害が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される、項目６３に記載の抗体。
（項目６５）
前記抗体がモノクローナル抗体である、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目６６）
前記抗体がＦａｂ、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖまたは$(Fab')_2$フラグメントから選択される抗体フラグメントである、項目６５に記載の抗体。
（項目６７）
前記抗体がヒト化される、項目６５に記載の抗体。
（項目６８）
前記抗体が、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託された抗体から選択される抗体、および配列番号１６の重鎖可変ドメインと配列番号１２の軽鎖可変ドメインとを含んでいる抗体と同じエピトープに結合する、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目６９）
細胞毒性剤に共有結合した、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体を含んでいるイムノコンジュゲート。
（項目７０）
前記細胞毒性剤が、毒素、化学療法剤、薬物部分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、項目６９に記載のイムノコンジュゲート。
（項目７１）
式Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）ｐを有している、イムノコンジュゲートであって：
（ａ）Ａｂが項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体であって；
（ｂ）Ｌがリンカーであって；
（ｃ）Ｄが薬物部分である、項目７０に記載のイムノコンジュゲート。
（項目７２）
Ｌが６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、およびＮ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）から選択される、項目７１に記載のイムノコンジュゲート。
（項目７３）
Ｄがアウリスタチンおよびドロスタチンから選択される、項目７１に記載のイムノコンジュゲート。
（項目７４）
項目７１に記載のイムノコンジュゲート、および薬学的に受容可能なキャリアを含んでいる、薬学的組成物。
（項目７５）
ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、該細胞と項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体とを接触させる工程を包含し、それによって該細胞の増殖の阻害が生じる、方法。

（項目７６）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目７５に記載の方法。
（項目７７）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目７５に記載の方法。
（項目７８）
項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体の有効量を被験体に対して投与する工程を包含する、ガンを有する被験体を処置する方法。
（項目７９）
前記ガンが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される、項目７８に記載の方法。
（項目８０）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目７８に記載の方法。
（項目８１）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目７８に記載の方法。
（項目８２）
項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体の有効量を被験体に投与する工程を包含する、被験体の増殖性障害を処置する方法。
（項目８３）
前記増殖性障害が癌である、項目８２に記載の方法。
（項目８４）
前記癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される、項目８３に記載の方法。
（項目８５）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目８２に記載の方法。
（項目８６）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目８２に記載の方法。
（項目８７）
細胞の増殖を阻害する方法であって、該細胞の増殖がＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも一部は依存しており、該方法は、該細胞と項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体の有効量を接触させる工程を包含し、それによって該細胞の増殖を阻害する、方法。
（項目８８）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目８７に記載の方法。
（項目８９）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目８７に記載の方法。
（項目９０）
哺乳動物において腫瘍を治療的に処置する方法であって、該腫瘍の増殖がＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも一部は依存しており、該方法は、該細胞と項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体の有効量とを接触させる工程を包含する、方法。
（項目９１）
前記腫瘍が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急

性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫に関連する、項目９０に記載の方法。
（項目９２）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目９０に記載の方法。
（項目９３）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目９０に記載の方法。
（項目９４）
ＣＤ７９ｂへのイムノコンジュゲートの結合を可能にする条件下で項目７０のイムノコンジュゲートに対して細胞を曝露する工程を包含するＢ細胞増殖を阻害する方法。
（項目９５）
前記Ｂ細胞増殖が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される、項目９４に記載の方法。
（項目９６）
前記Ｂ細胞が異種移植片である、項目９４に記載の方法。
（項目９７）
前記曝露がインビトロで起こる、項目９４に記載の方法。
（項目９８）
前記曝露がインビボで起こる、項目９４に記載の方法。
（項目９９）
ＣＤ７９ｂを含有すると疑われるサンプル中のＣＤ７９ｂの存在を決定する方法であって、該方法は、該サンプルを項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体に対して曝露する工程と、該サンプル中のＣＤ７９ｂへの該抗体の結合を決定する工程とを包含し、該サンプル中のＣＤ７９ｂへの該抗体の結合が該サンプル中の該タンパク質の存在の指標である、方法。
（項目１００）
前記生物学的サンプルが、Ｂ細胞増殖性障害を有すると疑われる患者由来である、項目９９に記載の方法。
（項目１０１）
前記Ｂ細胞増殖が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される、項目１００に記載の方法。
（項目１０２）
ＣＤ７９ｂを発現する細胞に、項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体を結合する方法であって、該細胞と項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体とを接触させる工程を包含する、方法。
（項目１０３）
前記抗体が細胞毒性剤にコンジュゲートされる、項目１０２に記載の方法。
（項目１０４）
前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされる、項目１０２に記載の方法。
（項目１０５）
項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体をコードする核酸。
（項目１０６）
項目１０５に記載の核酸を含んでいる宿主細胞。
（項目１０７）
項目１～４３のいずれかに記載の抗体を含んでいる組成物。

（項目１０８）
前記組成物がキャリアを含む、項目１０７に記載の組成物。
（項目１０９）
項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体であって、該抗体は、１つ以上の遊離のシステインアミノ酸を含んでいるシステイン操作された抗体であり、該システイン操作された抗体は、親抗体の１つ以上のアミノ酸残基を遊離のシステインアミノ酸で置き換える工程を包含するプロセスによって調製される、抗体。
（項目１１０）
前記１つ以上の遊離システインアミノ酸が０．６～１．０の範囲のチオ反応性値を有する、項目１０９に記載の抗体。
（項目１１１）
前記シスシテイン操作された抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬と反応性である、項目１０９に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１２）
前記プロセスがさらに、前記システイン操作された抗体とチオール反応性試薬とを反応させることによって該システイン操作された抗体のチオール反応性を決定する工程を包含し；該システイン操作された抗体は前記親抗体よりも該チオール反応性試薬と反応性である、項目１０９に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１３）
前記１つ以上の遊離のシステインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、項目１０９に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１４）
前記抗体が、細胞毒性剤に共有結合されたシステイン操作された抗体を含んでいるイムノコンジュゲートである、項目１０９に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１５）
前記細胞毒性剤が、毒素、化学療法剤、薬物部分、抗生物質、放射性同位体、および核酸分解酵素から選択される、項目１１４に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１６）
前記抗体が捕獲標識、検出標識または固体支持体に共有結合される、項目１０９に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１７）
前記抗体がビオチン捕獲標識に共有結合される、項目１１６に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１８）
前記抗体が蛍光色素検出標識に共有結合される、項目１１６に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１１９）
前記蛍光色素が、フルオレセイン型、ローダミン型、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサス・レッドおよびそれらのアナログから選択される、項目１１８に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１２０）
前記抗体が、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔ、および^{213}Ｂｉから選択される放射性核種検出標識に共有結合される、項目１１６に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１２１）
前記抗体が、キレート化リガンドによって検出標識に共有結合される、項目１１６に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１２２）
前記キレート化リガンドがＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡ

から選択される、項目１２１に記載のシステイン操作された抗体。
（項目１２３）
アルブミン結合ペプチドを含んでいる、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目１２４）
前記アルブミン結合ペプチドが配列番号８０～８４から選択される、項目１２３に記載の抗体。
（項目１２５）
前記抗体がさらに、Ｋａｂａｔナンバリング・コンベンションに従う軽鎖の１５、４３、１１０、１４４、１６８および２０５、ならびにＥＵナンバリング・コンベンションに従う重鎖の４１、８８、１１５、１１８、１２０、１７１、１７２、２８２、３７５、および４００から選択される１つ以上の位置で遊離のシステインアミノ酸を含む、項目１、７、４２、５４または１７７に記載の抗体。
（項目１２６）
システインが軽鎖の２０５の位置である、項目１２５に記載の抗体。
（項目１２７）
システインが前記重鎖の１１８の位置である、項目１２５に記載の抗体。
（項目１２８）
システインが前記重鎖の４００の位置である、項目１２５に記載の抗体。
（項目１２９）
前記抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体から選択される、項目１２５に記載の抗体。
（項目１３０）
抗体フラグメントである、項目１２５に記載の抗体。
（項目１３１）
前記抗体フラグメントがＦａｂフラグメントである、項目１３０に記載の抗体。
（項目１３２）
キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体から選択される、項目１２５に記載の抗体。
（項目１３３）
細菌中で産生される、項目１２５に記載の抗体。
（項目１３４）
ＣＨＯ細胞中で産生される、項目１２５に記載の抗体。
（項目１３５）
ＣＤ７９ｂタンパク質の存在を、該タンパク質を含有することが疑われるサンプル中で決定する方法であって、該方法は、該サンプルを項目１２０に記載の抗体に対して曝露する工程と、該サンプル中の該ＣＤ７９ｂタンパク質への該抗体の結合を決定する工程とを包含し、該タンパク質への該抗体の結合が該サンプル中の該タンパク質の存在の指標である、方法。
（項目１３６）
前記サンプルが前記ＣＤ７９ｂタンパク質を発現すると疑われる細胞を含む、項目１３５に記載の方法。
（項目１３７）
前記細胞がＢ細胞である、項目１３５に記載の方法。
（項目１３８）
前記抗体が、蛍光色素、放射性同位体、ビオチンまたは金属配位リガンドから選択される標識に共有結合される、項目１３５に記載の方法。
（項目１３９）
項目１２５に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含んでいる、薬学的処方物。
（項目１４０）

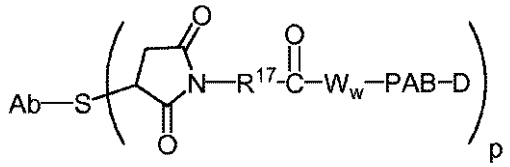
前記抗体が、アウリスタチンまたはメイタンシノイド薬物部分に共有結合され、これによって抗体薬物コンジュゲートが形成される、項目１２５に記載の抗体。
（項目１４１）
抗体（Ａｂ）、およびアウリスタチンまたはメイタンシノイド薬物部分（Ｄ）を含む項目１４０に記載の抗体－薬物コンジュゲートであって、前記システイン操作された抗体が、リンカー部分（Ｌ）によって１つ以上の遊離システインアミノ酸介してＤに結合されており；該化合物は、式Ｉ：
【化４７】

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

を有しており、式中ｐが１、２、３または４である、抗体－薬物コンジュゲート。
（項目１４２）
ｐが２である、項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４３）
Ｌが以下の式：
【化４８】

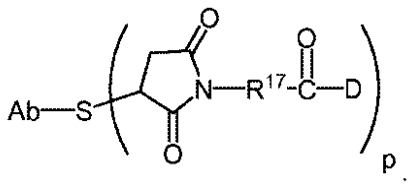
$$—A_a—W_w—Y_y—$$

を有しており、ここで：
Ａがシステイン操作された抗体（Ａｂ）のシステインチオールに共有結合されたストレッチャー単位であり；
ａが０または１であり；
各々のＷが独立してアミノ酸単位であり；
ｗが０～１２の範囲の整数であり；
Ｙが薬物部分に共有結合されたスペーサー単位であり；かつ
ｙが０、１または２である、
項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４４）
以下の式：
【化４９】

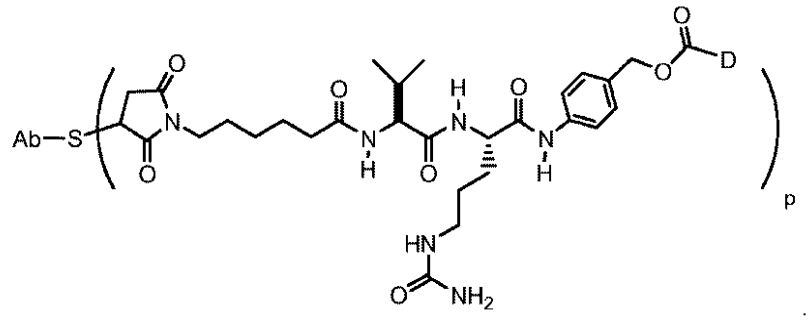


を有しており、ここで：
ＰＡＢがパラ－アミノベンジルカルバモイルであり、かつＲ^{17}が（ＣＨ$_2$）$_r$、Ｃ$_3$－Ｃ$_8$カルボシクリル、Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_r$、アリーレン、（ＣＨ$_2$）$_r$－アリーレン、－アリーレン－（ＣＨ$_2$）$_r$－、（ＣＨ$_2$）$_r$－（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$カルボシクリル）、（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$カルボシクリル）－（ＣＨ$_2$）$_r$、Ｃ$_3$－Ｃ$_8$ヘテロシクリル、（ＣＨ$_2$）$_r$－（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$ヘテロシクリル）、－（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$ヘテロシクリル）－（ＣＨ$_2$）$_r$－、－（ＣＨ$_2$）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（ＣＨ$_2$）$_r$－、－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－、－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－ＣＨ$_2$－、－（ＣＨ$_2$）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－、－（ＣＨ$_2$）$_r$Ｃ（Ｏ）ＮＲ^b（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$－ＣＨ$_2$－、－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_r$Ｃ（Ｏ）Ｎ

R^b（CH_2CH_2O）$_r$－、－（CH_2CH_2O）$_r$C（O）NR^b（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－、および－（CH_2CH_2O）$_r$C（O）NR^b（CH_2）$_r$－から選択される二価のラジカルであり；R^bがH、C_1－C_6アルキル、フェニル、またはベンジルであり；かつｒが独立して１～１０の範囲の整数である、
項目１４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４５）
W_wがバリン－シトルリンである、項目１４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４６）
R^{17}が（CH_2）$_5$または（CH_2）$_2$である項目１４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４７）
以下の式：
【化５０】

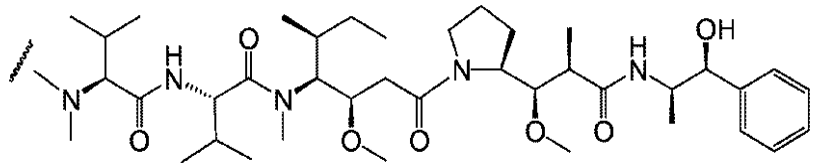


を有している、項目１４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４８）
R^{17}が（CH_2）$_5$または（CH_2）$_2$である、項目１４７に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１４９）
以下の式：
【化５１】

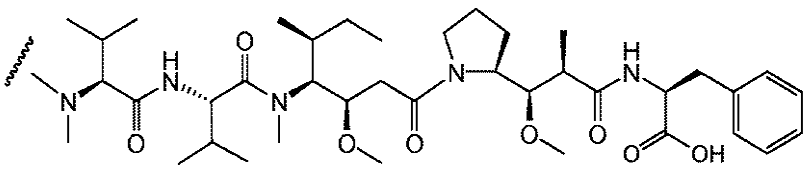


を有する、項目１４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５０）
ＬがＳＭＣＣ、ＳＰＰ、ＳＰＤＢまたはＢＭＰＥＯである、項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５１）
Ｄが以下の構造：

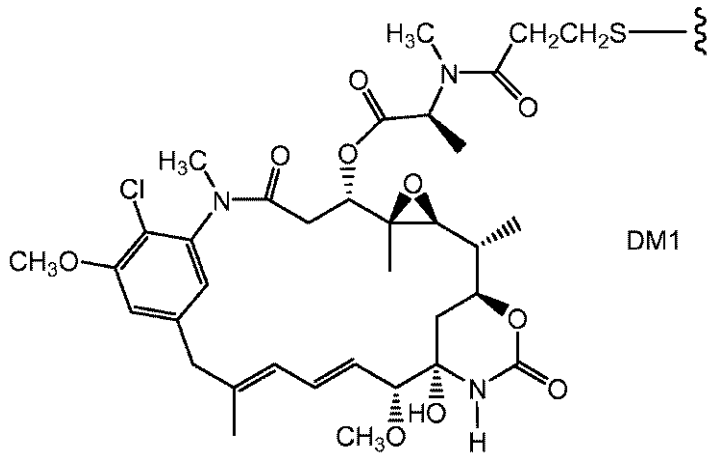
【化５２】



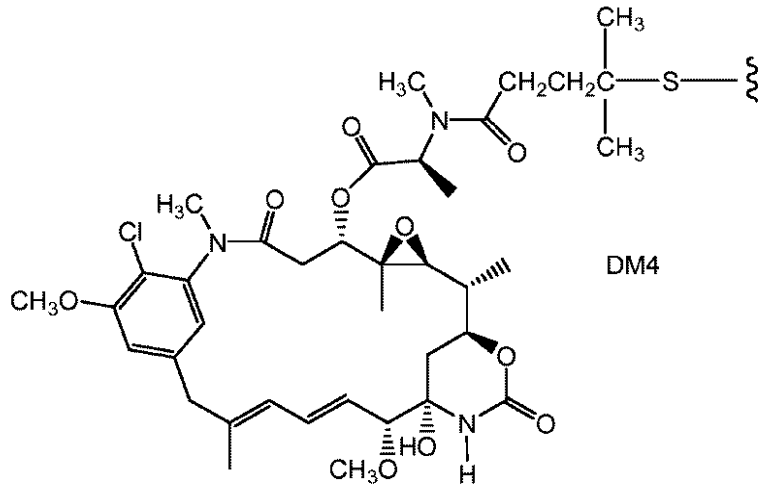
を有するＭＭＡＥであり、
式中の波線がリンカーＬへの結合部位を示す、項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５２）
Ｄが以下の構造：
【化５３】



を有するＭＭＡＦであり、
式中の波線がリンカーＬへの結合部位を示している、項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５３）
Ｄが以下の構造：
【化５４】

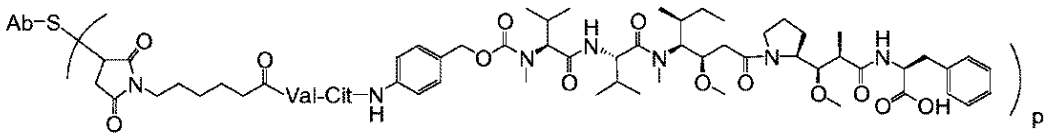


【化５５】

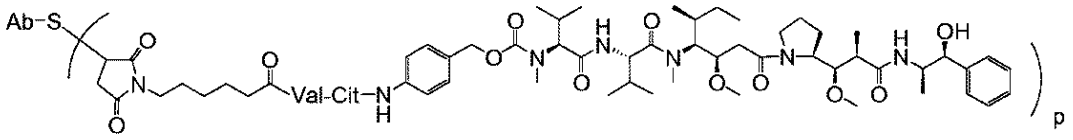


を有するＤＭ１またはＤＭ４であり、
式中の波線がリンカーＬへの結合部位を示している、項目１４１に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５４）
前記抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および抗体フラグメントから選択される、項目１４０に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５５）
前記抗体フラグメントがＦａｂフラグメントである、項目１４０に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５６）
以下の構造：

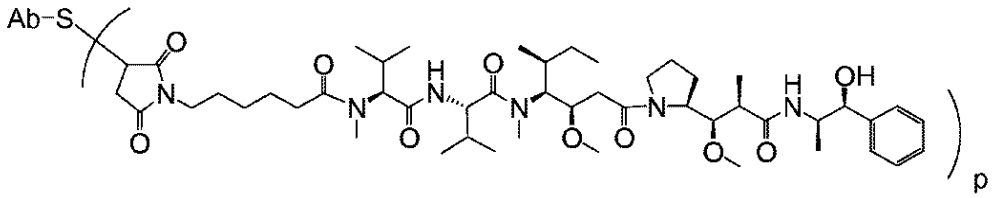
【化５６】



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

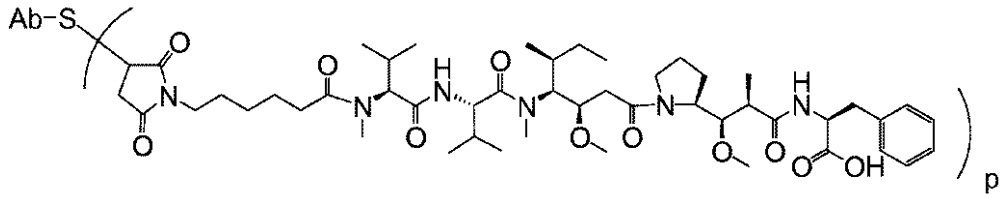


Ab-MC-vc-PAB-MMAE

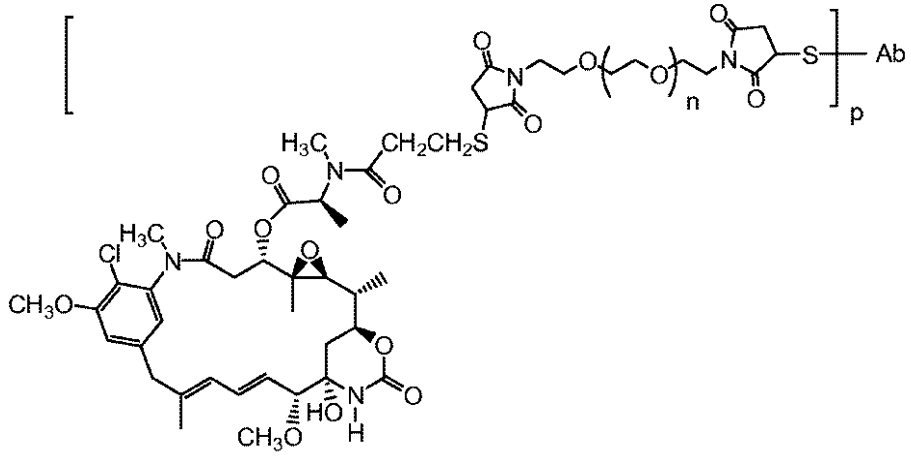


Ab-MC-MMAE

【化５７】



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

であって、
式中Ｖａｌがバリンであり；Ｃｉｔがシトルリンであり；ｐが１、２、３、または４であり；かつＡｂが項目１２５の抗体である構造、から選択される抗体－薬物コンジュゲート化合物。
（項目１５７）
前記アウリスタチンがＭＭＡＥまたはＭＭＡＦである、項目１４０に記載の抗体薬物コンジュゲート。
（項目１５８）
ＬがＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢまたはＭＣである、項目１４１に記載の抗体薬物コンジュゲート。
（項目１５９）
Ｂ細胞を検出するためのアッセイであって：
（ａ）項目１４０に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物に細胞を曝露する工程と；（ｂ）該細胞への該抗体－薬物コンジュゲート化合物の結合の程度を決定する工程と、
を包含する、アッセイ。
（項目１６０）
項目１４０に記載の抗体－薬物コンジュゲート化合物を用いて細胞培養培地中の哺乳動物癌性Ｂ細胞を処置する工程であって、これによって癌性Ｂ細胞の増殖が阻害される、細胞増殖を阻害する方法。
（項目１６１）
項目１４０に記載の抗体薬物コンジュゲート、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャ

リアまたは賦形剤を含んでいる、薬学的処方物。
（項目１６２）
項目１６１に記載の薬学的処方物を患者に投与する工程を包含する、癌を処置する方法。
（項目１６３）
前記癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫からなる群より選択される、項目１６２に記載の方法。
（項目１６４）
前記患者が、抗体－薬物コンジュゲート化合物と組み合わせて細胞毒性剤を投与される、項目１６２に記載の方法。
（項目１６５）
項目１６０に記載の薬学的処方物と；
容器と；
前記化合物が、ＣＤ７９ｂポリペプチドの過剰発現によって特徴づけられるガンを処置するために用いられ得ることを示している添付文書または表示と；
を備える、製品。
（項目１６６）
前記ガンが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫からなる群より選択される、項目１６５に記載の製品。
（項目１６７）
項目１２５に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体（Ａｂ）、およびアウリスタチンまたはメイタンシノイド薬物部分（Ｄ）を含んでいる抗体薬物コンジュゲート化合物を作製する方法であって、該抗体が、リンカー部分（Ｌ）によって１つ以上の操作されたシステインアミノ酸を介してＤに結合されており；該化合物は、式Ｉ：
【化５８】

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

を有しており、式中ｐが１、２、３または４であり；該方法は、以下の工程：
（ａ）該抗体の操作されたシステイン基とリンカー試薬とを反応させて抗体－リンカー中間生成物Ａｂ－Ｌを形成する工程と；
（ｂ）Ａｂ－Ｌと活性化薬物部分Ｄとを反応させ；これによって該抗体－薬物コンジュゲートが形成される工程：
（ｃ）薬物部分の求核基とリンカー試薬とを反応させて薬物－リンカー中間生成物Ｄ－Ｌを形成する工程と；
（ｄ）Ｄ－Ｌと該抗体の操作されたシステイン基とを反応させ；これによって該抗体－薬物コンジュゲートを形成する工程と、
を包含する、方法。
（項目１６８）
チャイニーズ・ハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞中で抗体を発現する工程をさらに包含する、項目１６７に記載の方法。
（項目１６９）
前記発現された抗体を還元剤で処理する工程をさらに包含する、項目１６７に記載の方法。

（項目１７０）
前記還元剤がＴＣＥＰおよびＤＴＴから選択される、項目１６９に記載の方法。
（項目１７１）
前記還元剤での処理後、前記発現された抗体を酸化剤で処理する工程をさらに包含する、項目１６９に記載の方法。
（項目１７２）
前記酸化剤が、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸および空気から選択される、項目１７１に記載の方法。
（項目１７３）
前記抗体が、配列番号９０または８５のいずれか１つから選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している重鎖配列を含む、項目１２５に記載の抗体。
（項目１７４）
前記抗体が、配列番号８９のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している軽鎖配列と配列番号８５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している重鎖配列とを含む、項目１２５に記載の抗体。
（項目１７５）
前記抗体が、配列番号８９または８８のいずれか１つから選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している軽鎖配列を含む、項目１２５に記載の抗体。
（項目１７６）
前記抗体が、配列番号８８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している軽鎖配列と配列番号９０のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している重鎖配列とを含む、項目１２５に記載の抗体。
（項目１７７）
配列番号１４から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している重鎖可変ドメインと配列番号１０から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有している軽鎖可変ドメインとを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体。
（項目１７８）
項目１、７、４２、５４または１７７のいずれかに記載の抗体を含んでいる組成物。
（項目１７９）
前記組成物がキャリアを含む、項目１７８に記載の組成物。
【００２１】
一局面では、本発明は、上記または下記に記載の任意のポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメントを含む）、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはその各々の抗原性エピトープに対する抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、アウリスタチン、メイタンシノイド、ドロスタチン誘導体またはカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解酵素などを含む毒素などの増殖阻害剤または細胞毒性剤に対して必要に応じてコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は必要に応じてＣＨＯ細胞または細菌細胞で産生されてもよく、好ましくはそれらが結合する細胞の死を誘導し得る。検出目的で、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固体支持体に結合されても、またはその他であってもよい。
【００２２】
一局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではこの一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしての抗体の親和性）またはＣＤ７９ｂに対する二価型の抗体の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントと

しての抗体の親和性）は実質的に、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、それぞれ、マウス抗体の一価の親和性もしくはその二価型における親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてまたはＩｇＧフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の一価の親和性もしくはその二価型における親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてまたはＩｇＧフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）と同じか、またはそれよりも低いか、またはそれよりも大きい。

【００２３】

別の局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価型におけるその抗体の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）が２．０ｎＭであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

【００２４】

一局面では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、以下を含む抗体が提供される：

（ａ）以下からなる群より選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つのＨＶＲ：

（ｉ）Ａ１～Ａ１６がＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１５を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、

（ｉｉ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、

（ｉｉｉ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、

（ｉｖ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、

（ｖ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、

（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１０がＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３。

【００２５】

一局面では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、その抗体は、改変体ＨＶＲ配列が配列番号５９、６０、６１、６２、６３または６４に示される配列のうち少なくとも１つの残基の改変を含んでいる、少なくとも１つの改変体ＨＶＲを含む、抗体が提供される。

【００２６】

一局面では、本発明は、図１３（配列番号３１～３３）に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣを含む重鎖可変ドメインを含んでいる抗体を提供する。

【００２７】

一局面では、本発明は、図１３（配列番号２３～２５）に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。

【００２８】

一局面では、本発明は、配列番号１６の重鎖可変ドメインを含んでいる抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。別の局面では、本発明は配列番号１２の軽鎖可変ドメインを含んでいる抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。

【００２９】

一局面では、本発明は、１つ以上の遊離のシステインアミノ酸、および配列番号９１～１２２から選択される配列を含んでいるシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。このシステイン操作された抗ＣＤ－７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合し得る。このシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、親の抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のアミノ酸残基をシステインによって置換する工程を包含するプロセスによって調製され

得る。
【００３０】
一局面では、本発明は、１つ以上の遊離のシステインアミノ酸を含んでいるシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含し、このシステイン操作された抗ＣＤ－７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合し、親の抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のアミノ酸残基をシステインによって置換する工程を包含するプロセスによって調製され、この親抗体は、以下から選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列を含む：
（ａ）Ａ１～Ａ１６がＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１５を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、
（ｂ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、
（ｃ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）またはＦＱＧＴＨＦＰＦＴ（配列番号７９）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、
（ｄ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、
（ｅ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、
（ｆ）Ｆ１～Ｆ１０がＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３。
【００３１】
システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体はモノクローナル抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体または抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の、その各々の抗原性エピトープに対する結合を競合的に阻害する抗体であってもよい。本発明の抗体は、例えば、アウリスタチンまたはメイタンシノイドを含む毒素などの増殖阻害性剤または細胞毒性剤に対して必要に応じてコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は必要に応じてＣＨＯ細胞または細菌細胞で産生されてもよく、好ましくはそれらが結合する細胞の成長もしくは増殖を阻害するか、またはその細胞の死を誘導し得る。診断目的で、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固体支持体に結合されても、またはその他であってもよい。
【００３２】
一局面では、本発明は、本発明の抗体を作製するための方法を提供する。例えば、本発明は、ＣＤ７９ｂ抗体（これは本明細書に定義されるとおり、全長およびそのフラグメントを含む）を作製する方法を提供し、この方法は、このような抗体（またはそのフラグメント）をコードする本発明の組み換えベクターを適切な宿主細胞中で発現させる工程と、この抗体を回収する工程とを包含する。
【００３３】
一局面では、本発明は、本発明の抗体または本発明の抗体－薬物コンジュゲート、および薬学的に受容可能な希釈液、キャリアまたは賦形剤を含んでいる薬学的処方物である。
【００３４】
一局面では、本発明は、容器；およびこの容器内に含まれる組成物を含む製品を提供し、この組成物は、本発明の１つ以上のＣＤ７９ｂ抗体を含む。
【００３５】
一局面では、本発明は、本発明の１つ以上のＣＤ７９ｂ抗体を含んでいる組成物を含んでいる第一の容器と；緩衝液を含んでいる第二の容器とを備えるキットを提供する。
【００３６】
一局面では、本発明は、ガン、腫瘍および／または細胞増殖障害などの疾患の治療処置および／または予防処置のための医薬の調製における本発明のＣＤ７９ｂ抗体の使用を提供する。
【００３７】
一局面では、本発明は、ガン、腫瘍および／または細胞増殖障害などの疾患の治療処置

および／または予防処置のための医薬の調製における本発明の製品の使用を提供する。
【００３８】
一局面では、本発明は、ガン、腫瘍および／または細胞増殖障害などの疾患の治療処置および／または予防処置のための医薬の調製における本発明のキットの使用を提供する。
【００３９】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖を阻害する方法を提供し、この方法は、このような細胞と本発明の抗体とを接触させ、これによってこのような細胞の増殖の阻害を生じる工程を包含する。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。
【００４０】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞を含む癌性の腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法を提供し、この方法は、本発明の抗体の治療上有効な量をこのような哺乳動物に対して投与して、これによってこの哺乳動物を有効に処置する工程を包含する。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。
【００４１】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂの発現増大に関連する細胞増殖性障害を処置または予防するための方法を提供し、この方法は、本発明の抗体の有効量をこのような処置の必要な被験体に対して投与して、これによってこのような細胞増殖性障害を有効に処置または予防する工程を包含する。一実施形態では、この増殖性障害はガンである。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。
【００４２】
一局面では、本発明は、細胞の増殖を阻害する方法を提供し、ここでこの細胞の増殖は、ＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも一部は依存し、この方法は、この細胞と本発明の抗体の有効量とを接触させ、これによってこのような細胞の増殖を阻害する工程を包含する。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。
【００４３】
一局面では、本発明は、哺乳動物の腫瘍を治療的に処置する方法を提供し、この腫瘍の増殖は、ＣＤ７９ｂの増殖強化効果に少なくとも一部は依存しており、この方法は、この細胞と本発明の抗体の有効量とを接触させ、これによってこの腫瘍を効果的に処置する工程を包含している。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は増殖阻害剤にコンジュゲートされる。
【００４４】
一局面では、本発明は、本明細書に記載のイムノコンジュゲート、受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含む薬学的処方物を患者に投与する工程を包含するガンを処置する方法を提供する。
【００４５】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対するイムノコンジュゲートの結合を可能にする条件下で、本発明の抗体を含むイムノコンジュゲートに対して細胞を曝露する工程を包含する、Ｂ細胞増殖を阻害する方法を提供する。
【００４６】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを含有することが疑われるサンプル中のＣＤ７９ｂの存在を決定する方法を提供し、この方法は、このサンプルを本発明の抗体に対して曝露する工程と、このサンプル中のＣＤ７９ｂに対するこの抗体の結合を決定する工程とを包含し、ここでこのサンプル中のＣＤ７９ｂに対するこの抗体の結合は、このサンプル中のこのタンパク質の存在の指標である。
【００４７】
一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現するＢ細胞などの細胞の増大に関連する細胞

増殖性障害を診断する方法が提供され、この方法は、生物学的サンプル中の試験細胞と上記の任意の抗体とを接触させる工程と；ＣＤ７９ｂに対する抗体の結合を検出することによってサンプル中の試験細胞に対して結合した抗体のレベルを決定する工程と；コントロールサンプル中の細胞に対して結合した抗体のレベルを比較する工程とを包含し、ここで、この結合した抗体のレベルは、試験サンプルおよびコントロールサンプル中のＣＤ７９ｂ発現細胞の数に対して正規化されており、かつこのコントロールサンプルに対して比較した試験サンプル中の結合した抗体のレベルが高ければ、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に関連する細胞増殖性障害の存在が示される。

【００４８】

一局面では、本発明は、血液または血清中の可溶性ＣＤ７９ｂを検出する方法を提供し、この方法は、Ｂ細胞増殖性障害を経験していると疑われる哺乳動物由来の血液または血清の試験サンプルと、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体とを接触させる工程と、正常な哺乳動物由来の血液または血清のコントロールサンプルに対するこの試験サンプル中の可溶性ＣＤ７９ｂ中の増大を検出する工程とを包含する。

【００４９】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に対して本発明の抗体を結合する方法を提供し、この方法は、この細胞と本発明の抗体とを接触させる工程を包含する。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１】ＰＲＯ３６２４９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１）を示しており、ここで配列番号１は本明細書において「ＤＮＡ２２５７８６」（本明細書ではまた「ＣＤ７９ｂ」とも呼ばれる）と命名されるクローンである。このヌクレオチド配列は、太字で、下線で示される開始コドンおよび終止コドンを有するＣＤ７９ｂをコードする。

【図２】図１に示される配列番号１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

【図３】キメラ２Ｆ２（ｃｈ２Ｆ２）ＩｇＧ１（２Ｆ２はマウスモノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体である）の軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号３）を示す。このヌクレオチド配列は、図４に示されるｃｈ２Ｆ２の軽鎖をコードしており、これは太字でかつ下線で示される第一コドン（配列番号４の第一アミノ酸をコードする）を有する。

【図４】図３に示される配列番号３のコード配列由来のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。可変領域は、下線でない領域である。

【図５】キメラ２Ｆ２（ｃｈ２Ｆ２）ＩｇＧ１の重鎖のヌクレオチド配列（配列番号５）を示す（２Ｆ２はマウスモノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体である）。このヌクレオチド配列は、図６に示されるｃｈ２Ｆ２の重鎖をコードしており、これは太字でかつ下線で示される第一コドン（配列番号６の第一アミノ酸をコードする）を有する。

【図６】図５に示される配列番号５のコード配列由来のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。可変領域は、下線でない領域である。

【図７】以下の可変軽鎖の配列のアラインメントを示す：軽鎖ヒトκＩコンセンサス配列（「ｈｕＫＩ」；配列番号９として表示される）であって、ＶＬ－ＦＲ１、ＶＬ－ＦＲ２、ＶＬ－ＦＲ３、ＶＬ－ＦＲ４（それぞれ、配列番号６５～６８）、マウス２Ｆ２抗－ＣＤ７９ｂ抗体（「ｍｕ２Ｆ２」として表示され、かつ本明細書では「２Ｆ２」としても言及される；配列番号１０）、２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体（「ｈｕ２Ｆ２グラフト」として表示される；配列番号１１）および２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体改変体７（「ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７」として表示される；配列番号１２）（７１Ａ、７３Ｔおよび７８Ａを含む）。位置は、Ｋａｂａｔに従ってナンバリングして、マウス２Ｆ２から可変軽鎖κＩコンセンサスフレームワークに対して移植された超可変領域（ＨＶＲ）はボックスにしている。

【図８Ａ】以下の可変重鎖の配列のアラインメントを示す：重鎖ヒトサブグループＩＩＩ

コンセンサス配列（「ｈｕＫＩＩＩ」；配列番号１３として表示される）であって、ＶＨ－ＦＲ１、ＶＨ－ＦＲ２、ＶＨ－ＦＲ３、およびＶＨ－ＦＲ４（それぞれ、配列番号６９～７２）、マウス２Ｆ２抗－ＣＤ７９ｂ抗体（「ｍｕ２Ｆ２」として表示され、かつ本明細書では「２Ｆ２」；配列番号１４としても言及される）、２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体（「ｈｕ２Ｆ２グラフト」として表示される；配列番号１５）（７１Ａ、７３Ｔおよび７８Ａを含む）、および２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体改変体７（「ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７」として表示される；配列番号１６）（７１Ａ、７３Ｔおよび７８Ａを含む）。位置は、Ｋａｂａｔに従ってナンバリングして、ｍｕ２Ｆ２から可変重鎖サブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークに対して移植された超可変領域（ＨＶＲ）はボックスにしている。

【図８Ｂ】以下の可変重鎖の配列のアラインメントを示す：重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサス配列（「ｈｕＫＩＩＩ」；配列番号１３として表示される）であって、ＶＨ－ＦＲ１、ＶＨ－ＦＲ２、ＶＨ－ＦＲ３、およびＶＨ－ＦＲ４（それぞれ、配列番号６９～７２）、マウス２Ｆ２抗－ＣＤ７９ｂ抗体（「ｍｕ２Ｆ２」として表示され、かつ本明細書では「２Ｆ２」；配列番号１４としても言及される）、２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体（「ｈｕ２Ｆ２．グラフト」として表示される；配列番号１５）（７１Ａ、７３Ｔおよび７８Ａを含む）、および２Ｆ２－移植型「ヒト化」抗体改変体７（「ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７」として表示される；配列番号１６）（７１Ａ、７３Ｔおよび７８Ａを含む）。位置は、Ｋａｂａｔに従ってナンバリングして、ｍｕ２Ｆ２から可変重鎖サブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークに対して移植された超可変領域（ＨＶＲ）はボックスにしている。

【図９】選択された２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体（配列番号１８）のＨＶＲ配列であって、その改変体が２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体の単一のＨＶＲ領域（ＨＶＲ－Ｌ３（配列番号６１）の一部を図９に配列番号１７として示す）において複数のアミノ酸変化を有する配列を示す。示したアミノ酸変化の外側の可変軽鎖および可変重鎖の配列は、２Ｆ２グラフトと同一であって、示されていない。２Ｆ－２移植型「ヒト化」抗体のＨＶＲ－Ｌ１（配列番号５９）、ＨＶＲ－Ｌ２（配列番号６０）、ＨＶＲ－Ｈ１（配列番号６２）、ＨＶＲ－Ｈ２（配列番号６３）、またはＨＶＲ－Ｈ３（配列番号６４）に変化は観察されなかった。

【図１０】選択された抗ＣＤ７９ｂ抗体のＢｉａｃｏｒｅ分析を示しており、この抗体としては、ｃｈ２Ｆ２抗体（「ｃｈ２Ｆ２」として表示）、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体（「ｈｕ２Ｆ２グラフト」とも表示され、本明細書においては「２Ｆ２グラフト」とも呼ばれる）、および抗原と指定される２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）（８９Ｆ、９６Ｆ；配列番号１８）が挙げられ、これには、ヒトＣＤ７９ｂ（ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$）の細胞外ドメイン、Ｆｃ（ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$－Ｆｃ）に融合されたヒトＣＤ７９ｂの細胞外ドメインおよび２Ｆ２のエピトープを含んでいる１６個のアミノ酸ペプチド（１６マーのペプチド；配列番号７８；配列番号７８のアミノ酸１～１１のエピトープ）が挙げられる。図中で「ＮＢ」とされた結合は検出されていない。

【図１１Ａ】図１１Ａ～図１１Ｂ（可変重鎖（ＶＨ）コンセンサスフレームワーク）および図１２（可変軽鎖（ＶＬ）コンセンサスフレームワーク）は、以下に従う配列識別子で本発明を実行するための使用のための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームを示す：（図１１Ａ～Ｂ）ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号３６）、ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号３７～３９）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４０）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４１～４３）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４４）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４５～４７）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４８）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４９～５０）、ヒトＶＨアクセプター２フレ

ームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号５１）およびヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号５２～５４）、ならびに（図１２）ヒトＶＬκサブグループＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５５）、ヒトＶＬκサブグループＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５６）、ヒトκサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５７）およびヒトκサブグループＩＶコンセンサスフレームワーク（配列番号５８）。

【図１１Ｂ】図１１Ａ～図１１Ｂ（可変重鎖（ＶＨ）コンセンサスフレームワーク）および図１２（可変軽鎖（ＶＬ）コンセンサスフレームワーク）は、以下に従う配列識別子で本発明を実行するための使用のための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームを示す：（図１１Ａ～Ｂ）ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号３６）、ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号３７～３９）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４０）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４１～４３）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４４）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４５～４７）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４８）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４９～５０）、ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号５１）およびヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号５２～５４）、ならびに（図１２）ヒトＶＬκサブグループＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５５）、ヒトＶＬκサブグループＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５６）、ヒトκサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５７）およびヒトκサブグループＩＶコンセンサスフレームワーク（配列番号５８）。

【図１２】図１１Ａ～図１１Ｂ（可変重鎖（ＶＨ）コンセンサスフレームワーク）および図１２（可変軽鎖（ＶＬ）コンセンサスフレームワーク）は、以下に従う配列識別子で本発明を実行するための使用のための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームを示す：（図１１Ａ～Ｂ）ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号３６）、ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号３７～３９）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４０）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４１～４３）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４４）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４５～４７）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号４８）、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４９～５０）、ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナスＫａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号５１）およびヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号５２～５４）、ならびに（図１２）ヒトＶＬκサブグループＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５５）、ヒトＶＬκサブグループＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５６）、ヒトκサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５７）およびヒトκサブグループＩＶコンセンサスフレームワーク（配列番号５８）。

【図１３】図１３Ａ（軽鎖）は、本発明の抗体（２Ｆ２．Ｄ７）のアミノ酸配列を示す。図１３Ａ（軽鎖）は、本発明の抗体（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）の１実施形態のフレームワーク（ＦＲ）、超可変領域（ＨＶＲ）、第一の定常ドメイン（ＣＬまたはＣＨ１）およびＦｃ領域（Ｆｃ）のアミノ酸配列を示す（配列番号１９～２６（図１３Ａ）および配列番号２７～３５（図１３Ｂ））。２Ｆ２．Ｄ７の軽鎖および重鎖の全長アミノ酸配列（可変および定常領域）を示す（それぞれ、配列番号８９（図１３Ａ）および配列番号９０（図１３

Ｂ）であって、定常ドメインは下線を付している。可変ドメインのアミノ酸配列を示す（配列番号１２（軽鎖については図１３Ａ）および配列番号１６（重鎖については図１３Ｂ））。図１３Ｂ（重鎖）は、本発明の抗体（２Ｆ２．Ｄ７）のアミノ酸配列を示す。図１３Ｂ（重鎖）は、本発明の抗体（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）の１実施形態のフレームワーク（ＦＲ）、超可変領域（ＨＶＲ）、第一の定常ドメイン（ＣＬまたはＣＨ１）およびＦｃ領域（Ｆｃ）のアミノ酸配列を示す（配列番号１９～２６（図１３Ａ）および配列番号２７～３５（図１３Ｂ））。２Ｆ２．Ｄ７の軽鎖および重鎖の全長アミノ酸配列（可変および定常領域）を示す（それぞれ、配列番号８９（図１３Ａ）および配列番号９０（図１３Ｂ）であって、定常ドメインは下線を付している。可変ドメインのアミノ酸配列を示す（配列番号１２（軽鎖については図１３Ａ）および配列番号１６（重鎖については図１３Ｂ））。

【図１４】ヒト（配列番号２）、カニクイザル（ｃｙｎｏ）（配列番号７）およびマウス（配列番号８）由来のＣＤ７９ｂのアミノ酸配列のアラインメントを示す。ヒトＣＤ７９ｂおよびｃｙｎｏ－ＣＤ７９ｂは８５％のアミノ酸同一性を有する。シグナル配列、試験ペプチド（実施例１に記載される２Ｆ２抗体については１１アミノ酸のエピトープ；配列番号７８のアミノ酸１～１１（ＡＲＳＥＤＲＹＲＮＰＫ））、膜貫通（ＴＭ）ドメインおよび免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）ドメインが示される。ボックスにした領域は、ＣＤ７９ｂのスプライシング改変体に存在しないＣＤ７９ｂの領域である（実施例１に記載される）。

【図１５】薬物部分が以下：軽鎖（ＬＣ－ＡＤＣ）；重鎖（ＨＣ－ＡＤＣ）；およびＦｃ領域（Ｆｃ－ＡＤＣ）における操作されたシステイン基に結合されているシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の描写を示す。

【図１６】以下の工程：（ｉ）システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体（チオＭａｂ）中のシステインジスルフィド付加物および鎖間ならびに鎖内のジスルフィドを、還元剤ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）を用いて還元する工程と；（ｉｉ）ｄｈＡＡ（デヒドロアスコルビン酸）を用いて、部分的に酸化して、すなわち再酸化して鎖間および鎖内ジスルフィドを再形成する工程と；（ｉｉｉ）システイン抗ＣＤ７９ｂ薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を形成するための薬物－リンカー中間生成物での再酸化抗体のコンジュゲーションを示す。

【図１７】ヒト化システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体（チオ－ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ）の（Ａ）軽鎖配列（配列番号８６）および（Ｂ）重鎖配列（配列番号８５）を示しており、ここで重鎖のＥＵ位置１１８のアラニン（配列上の位置アラニン１１８；Ｋａｂａｔ位置１１４）はシステインに変更されていた。薬物部分は、重鎖において操作されたシステイン基に結合されてもよい。各々の図では、この操作されたアミノ酸は、二重下線を付された太文字で示される。一本の下線は定常領域を示す。可変領域は、下線なしである。Ｆｃ領域はイタリック体で印している。「チオ」とは、システイン操作された抗体を指すが、「ｈｕ」とはヒト化抗体を指す。

【図１８】システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体（Ｔｈｉｏ－ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＬＣ－Ｖ２０５Ｃ）の（Ａ）軽鎖配列（配列番号８８）および（Ｂ）重鎖配列（配列番号８７）を示しており、ここで軽鎖のＫａｂａｔ位置２０５のバリン（配列上の位置はバリン２１０）は、システインに変更されていた。重鎖のＥＵ位置６におけるアミノ酸Ｄ（図中では影付き）は代わりにＥであってもよい。薬物部分は、重鎖の操作されたシステイン基に結合されてもよい。各々の図では、変更されたアミノ酸は、二重下線の太文字で示される。一本の下線は定常領域を示す。可変領域は、下線なし領域である。Ｆｃ領域はイタリック体で印している。「チオ」とは、システイン操作された抗体を指す。

【図１９】ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ異種移植片モデルにおけるインビボの腫瘍増殖の阻害のグラフであって、これは、ヒトＢ細胞腫瘍を有するＳＣＩＤマウスに対する、抗ＣＤ７９ｂ抗体（（ａ）ｃｈ２Ｆ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、薬物ロードは約３であった（表７）、および（ｂ）ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、薬物ロードは約２．３であった（表７））の投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。コントロールは、ＨＥＲＣＥＰ

ＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（抗ＨＥＲ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）を含んだ。「ｈｕ」とはヒト化抗体を指し、「ｃｈ」とはキメラ抗体を指す。
【図２０】Ｇｒａｎｔａ－５１９（ヒトマントル細胞リンパ腫）異種移植片モデルにおけるインビボの腫瘍増殖の阻害のグラフであって、これは、ヒトＢ細胞腫瘍を有するＳＣＩＤマウスに対する、抗ＣＤ７９ｂ抗体（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、薬物ロードは約２．８であった（表８））の投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。コントロールは、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（抗ＨＥＲ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）を含んだ。図２０Ｂは、Ｇｒａｎｔａ－５１９異種移植片研究（図２０Ａおよび表８）由来のマウスにおける体重変化パーセントのプロットであって、これは、この研究の最初の７日の間の有意な体重変化がなかったことを示している。「ｈｕ」は、ヒト化抗体を指す。
【発明を実施するための形態】
【００５１】
本発明は、哺乳動物における造血系腫瘍の処置に有用な組成物を特定するための方法、組成物、キットおよび製品、ならびにこのような処置のためにこれらの組成物を用いる方法を提供する。
【００５２】
これらの方法、組成物、キットおよび製品の詳細は、本明細書に提供される。
【００５３】
Ｉ．一般的技術
本発明の実行は、他に示さない限り、当該分野の技術の範囲内である、分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来の技術を使用する。このような技術は、文献中に、例えば、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、第2版（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９）；「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ，編，１９８４）；「Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ」（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，編，１９８７）；「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ」（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら、編集，１９８７、および定期更新版）；「ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ」、（Ｍｕｌｌｉｓら、編集，１９９４）；「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」（Ｐｅｒｂａｌ Ｂｅｒｎａｒｄ Ｖ．，１９８８）；「Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」（Ｂａｒｂａｓら、２００１）中に詳細に説明される。
【００５４】
ＩＩ．定義
本明細書を解釈する目的で、以下の定義を適用し、かつ適切であれば、単数で用いられる用語はまた、複数を包含し、その逆も真である。示される任意の定義が出典明記によって本明細書に援用される任意の文書と矛盾する場合には、下に示される定義が優先する。
【００５５】
本明細書において「Ｂ細胞表面マーカー」または「Ｂ細胞表面抗原」とはＢ細胞表面抗原に結合するアンタゴニストで標的され得るＢ細胞の表面上で発現される抗原であって、これには限定するものではないが、自然に存在するＢ細胞抗原に対するリガンドの結合を拮抗し得るＢ細胞表面抗原または可溶性Ｂ細胞表面抗原に対する抗体が挙げられる。例示的なＢ細胞表面カーカーとしては、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５およびＣＤ８６という白血球表面マーカー（説明については、Ｔｈｅ Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｆａｃｔｓ Ｂｏｏｋ、第2版．１９９７、編集．Ｂａｒｃｌａｙ ｅｔ ａｌ．Ａｃａｄｅｍｉ

ｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｈａｒｃｏｕｒｔ Ｂｒａｃｅ ＆ Ｃｏ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと）が挙げられる。他のＢ細胞表面マーカーとしては、ＲＰ１０５、ＦｃＲＨ２、Ｂ細胞ＣＲ２、ＣＣＲ６、Ｐ２Ｘ５、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＣＸＣＲ５、ＦＣＥＲ２、ＢＲ３、ＢＡＦＦ、ＢＬｙＳ、Ｂｔｉｇ、ＮＡＧ１４、ＳＬＧＣ１６２７０、ＦｃＲＨ１、ＩＲＴＡ２、ＡＴＷＤ５７８、ＦｃＲＨ３、ＩＲＴＡ１、ＦｃＲＨ６、ＢＣＭＡ、および２３９２８７が挙げられる。特定の目的のＢ細胞表面マーカーは、哺乳動物の他の非Ｂ細胞組織に比較してＢ細胞上で優先的に発現され、前駆体Ｂ細胞および成熟Ｂ細胞の両方の上で発現され得る。

【００５６】

本明細書において用いる場合、「ＣＤ７９ｂ」という用語は、他に示さない限り、霊長類（例えば、ヒト、カニクイザル（ｃｙｎｏ））およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意の天然のＣＤ７９ｂをいう。ヒトＣＤ７９ｂはまた、「ＰＲＯ３６２４９」（配列番号２）と呼ばれ、本明細書において「ＤＮＡ２２５７８６」とも呼ばれるヌクレオチド配列（配列番号１）によってコードされる。「ＣＤ７９ｂ」という用語は、「全長」のプロセシングされていないＣＤ７９ｂならびに細胞中のプロセシングから生じる任意の形態のＣＤ７９ｂを包含する。この用語はまた、ＣＤ７９ｂの自然に存在する改変体、例えば、スプライシング改変体、対立遺伝子改変体およびアイソフォームを包含する。本明細書に記載されるＣＤ７９ｂポリペプチドは、種々の供給源から、例えば、ヒト組織型からもしくは別の供給源から単離されてもよいし、または組み換え方法もしくは合成方法によって調製されてもよい。「天然の配列ＣＤ７９ｂポリペプチド」は、自然に生じる対応するＣＤ７９ｂポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このような天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチドは、自然から単離されてもよいし、組み換えもしくは合成の手段によって産生されてもよい。「天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド」という用語は詳細には、特定のＣＤ７９ｂポリペプチドの自然に存在する短縮型もしくは分泌型（例えば、細胞外ドメイン配列）、このポリペプチドの自然に存在する改変対型（例えば、選択的スプライシング型）および自然に存在する対立遺伝子改変体を包含する。本発明の特定の実施例では、本明細書に開示される天然の配列ＣＤ７９ｂポリペプチドとは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟または全長の天然の配列ポリペプチドである。開始コドンおよび終止コドン（示す場合）は、図面中に太字でかつ下線を付して示している。添付の図面中に「Ｎ」として示される核酸残基は、任意の核酸残基である。添付の図面中に開示されるＣＤ７９ｂポリペプチドは、この図面中でアミノ酸位置１として本明細書で指定されるメチオニン残基で開始することが示されるが、この図面中のアミノ酸位置１から上流または下流に位置する他のメチオニン残基がＣＤ７９ｂポリペプチドの出発アミノ酸残基として使用されてもよいと考えられ、かつ可能である。

【００５７】

本明細書に用いられる「２Ｆ２」という用語は、マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体（本明細書では、「ｍｕ２Ｆ２」または「マウス２Ｆ２」とも呼ばれる）またはキメラ抗体（本明細書では「ｃｈ２Ｆ２」とも呼ばれる）を指す。

【００５８】

「ｍｕ２Ｆ２」または「マウス２Ｆ２」とは本明細書では、マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体を指すのに特に用いられ、このマウス抗体は、配列番号１０の軽鎖可変ドメイン（図７）および配列番号１４の重鎖可変ドメイン（図８Ａ～Ｂ）を含む。ｍｕ２Ｆ２は、２００６年７月１１日にＡＴＣＣにＰＴＡ－７７１２として寄託されたハイブリドーマから生成され得る。

【００５９】

「ｃｈ２Ｆ２」または「キメラ２Ｆ２抗体」とは本明細書において、特にキメラ抗体（２００６年８月３日提出、米国特許出願番号第１１／４６２，３３６号に以前に記載）を指して用いられ、このキメラ抗体は、配列番号４（図４）の軽鎖を含み、ここでこの軽鎖は、配列番号１０（図７）の可変ドメインおよびヒトＩｇＧ１の軽鎖定常ドメインを含む

。このキメラ抗体はさらに、配列番号６（図６）の重鎖を含み、ここでこの軽鎖は配列番号１４の可変ドメイン（図８Ａ～図８Ｂ）およびヒトＩｇＧ１の重鎖定常ドメインを含む。

【００６０】

「２Ｆ２－グラフト」または「２Ｆ２移植型‘ヒト化’抗体」または「ｈｕ２Ｆ２グラフト」とはこれを本明細書で用いて、マウス２Ｆ２抗体（ｍｕ２Ｆ２）由来の超可変領域をアクセプターヒトコンセンサスＶＬκＩ（ｈｕＫＩ）およびヒトサブグループＩＩＩコンセンサスＶＨ（ｈｕＩＩＩ）中に、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３ＴおよびＬ７８Ａで移植することによって作製されるグラフトを特に指している（Ｃａｒｔｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２））（実施例１Ａおよび図７（配列番号１１）および８（配列番号１５）を参照のこと）。

【００６１】

本明細書に用いられるアミノ酸残基／位置の「改変」とは、出発アミノ酸配列に比較したときの一次アミノ酸配列の変化を指しており、この変化は、このようなアミノ酸残基／位置に関与する配列変更から生じる。例えば、代表的な改変としては、別のアミノ酸での残基（またはその位置での）置換（例えば、保存的または非保存的置換）、この残基／位置に隣接する１つ以上の挿入（一般には５または３つより少ない）アミノ酸の挿入、およびこのような残基／位置の欠失が挙げられる。「アミノ酸置換」またはその変形は、所定の（出発）アミノ酸配列における既存のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することを指す。一般には、そして好ましくは、この改変は、出発（または「野性型」）アミノ酸配列を含んでいるポリペプチドに比較して改変ポリペプチドの少なくとも１つの物理化学的活性における変化を生じる。例えば、抗体の場合には、変更される物理化学的活性は、標的分子に対する、結合親和性、結合能力および／または結合効果であり得る。

【００６２】

「抗体」という用語は、広義で用い、詳細には、例えば、単一の抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、全長またはインタクトなモノクローナル抗体）、ポリエピトープ性の特異性を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体組成物、ポリクローナル抗体、多価抗体、多特異的抗体（例えば、二重特異性抗体（それらが所望の生物学的活性を示す限り））、（少なくとも２つのインタクトな抗体から形成される）、単鎖抗ＣＤ７９ｂ抗体、および抗ＣＤ７９ｂ抗体のフラグメント（以下を参照のこと）が挙げられ、これは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖフラグメント、ダイアボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）が挙げられる（それらが、所望の生物学的または免疫学的活性を示す限り）。「免疫グロブリン」（Ｉｇ）という用語は、本明細書において抗体と交換可能に用いられる。抗体は、ヒト抗体であっても、ヒト化抗体であっても、および／または親和性成熟抗体であってもよい。

【００６３】

「抗ＣＤ７９ｂ抗体」または「ＣＤ７９ｂに結合する抗体」という用語は、十分な親和性でＣＤ７９ｂと結合し得る抗体であって、その結果その抗体がＣＤ７９ｂを標的するのに診断剤および／または治療剤として有用であるような抗体を指す。好ましくは、無関係の非ＣＤ７９ｂタンパク質に対する抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）によって測定した場合、ＣＤ７９ｂに対する抗体の結合のうち約１０％未満である。特定の実施形態では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、または≦０．１ｎＭという解離定数（Ｋｄ）を有する。特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、種々の種由来のＣＤ７９ｂの間で保存されているＣＤ７９ｂのエピトープに結合する。

【００６４】

「単離された抗体」とは、その天然の環境の成分から同定、ならびに分離、および／または回収されたものである。その天然環境の混入成分とは、抗体に関する治療用途を妨害する物質であり、それらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を挙げることができる。好ましい実施形態において、抗体は、（１）ロー

リー法による測定で抗体の９５重量％を超えるまで、そして最も好ましくは９９重量％を超えるまで、（２）スピニングカップ（ｓｐｉｎｎｉｎｇ　ｃｕｐ）シークエネーターの使用により、Ｎ末端または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（３）クマシーブルー、または好ましくは銀染色を用いた還元条件または非還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均一まで精製されるであろう。単離抗体としては、抗体の天然環境の少なくとも１つの成分が存在しないので組換え細胞内でインサイチュである抗体が挙げられる。しかし、通常は、単離抗体は少なくとも１つの精製工程により調製されるであろう。

【００６５】

塩基性４鎖抗体単位は、２本の同一軽（Ｌ）鎖および２本の同一重（Ｈ）鎖から構成されるヘテロテトラマー糖タンパク質である（ＩｇＭ抗体は、Ｊ鎖と呼ばれる追加のポリペプチドと共に５つの塩基性ヘテロテトラマー単位からなり、従って１０個の抗原結合部位を含むが、一方、分泌ＩｇＡ抗体は、Ｊ鎖と共に２～５つの塩基性４鎖単位を含む多価集合を形成するように重合化できる）。ＩｇＧ類の場合、４鎖単位は、一般に約１５０，０００ダルトンである。各々のＬ鎖は、１つのジスルフィド共有結合によりＨ鎖に結合され、一方、２本のＨ鎖は、Ｈ鎖のアイソタイプ次第で１つ以上のジスルフィド結合により互いに結合されている。Ｈ鎖およびＬ鎖の各々はまた、規則正しく間隔を空けた鎖内ジスルフィド架橋を有する。Ｈ鎖の各々は、Ｎ末端の可変性ドメイン（V_H）、続いてαおよびγ鎖の各々に関して３つの定常ドメイン（C_H）ならびにμおよびεアイソタイプに関して４つのC_Hドメインを有する。各Ｌ鎖は、Ｎ末端に可変性ドメイン（V_L）、続いてその他の末端に定常ドメイン（C_L）を有する。V_Lは、V_Hとアラインメントされ、C_Lは、重鎖（C_H1）の第一の定常ドメインとアラインメントされる。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変性ドメインと重鎖可変性ドメインとの間の接合面を形成すると考えられている。V_HおよびV_Lのペアリングは一緒に、単一の抗原結合部位を形成する。種々のクラスの抗体の構造および性質に関しては、例えば、Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第８版、Ｄａｎｉｅｌ　Ｐ．Ｓｔｉｔｅｓ、Ａｂｂａ　Ｉ．ＴｅｒｒおよびＴｒｉｓｔｒａｍ　Ｇ．Ｐａｒｓｌｏｗ（編集者）、Ａｐｐｌｅｔｏｎ　＆　Ｌａｎｇｅ、Ｎｏｒｗａｌｋ、ＣＴ、１９９４年、７１頁および６章を参照のこと。

【００６６】

任意の脊椎動物種由来のＬ鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパおよびラムダと呼ばれる２つの明確に異なるタイプの１つに帰属させることができる。重鎖（C_H）の定常ドメインのアミノ酸配列次第で、免疫グロブリンを、種々のクラスまたはイソタイプに帰属させることができる。５つのクラスの免疫グロブリン：それぞれα、δ、ε、γ、およびμと命名された重鎖を有するＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭが存在する。γおよびαクラスは、C_H配列および機能における比較的小さな相違に基づいてサブクラスにさらに分けられ、例えば、ヒトは、以下のサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２を発現する。

【００６７】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインをいう。重鎖の可変ドメインは、「ＶＨ」と言われる場合もある。軽鎖の可変ドメインは、「ＶＬ」と言われる場合もある。これらのドメインは一般に抗体の最も可変性の部分であって、抗原結合部位を含む。

【００６８】

「可変性」という用語は、可変性ドメインのある一定のセグメントが、抗体間で配列が広範囲にわたって異なるという事実を言う。Ｖドメインは抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。しかし、その可変性は、可変性ドメインの１１０アミノ酸の範囲にわたって等しく分布されていない。その代わり、Ｖ領域は、各々９～１２のアミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極度に可変性のより短い領域によって分けられている１５～３０のアミノ酸のフレームワーク領域（ＦＲｓ）と呼ばれる相対的に不変性のストレッチからなる。天然の重鎖および軽鎖の可変性ドメインは各々、４

つのＦＲｓを含んでおり、たいていは３つの超可変性領域によって接続されたβシート配置を採用しており、これがβシート構造に接続し、ある場合においてはそのβシート構造の一部を形成しているループを形成する。各鎖における超可変領域は、ＦＲｓにより近接して一緒に保持され、他の鎖の超可変性領域と共に、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、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈａｓｄａ、ＭＤ（１９９１）を参照のこと）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与していないが、抗体依存細胞の細胞毒性（ＡＤＣＣ）における抗体の関与など、種々のエフェクター機能を示す。

【００６９】

「インタクトな」抗体とは、抗原結合部位ならびにC_L、および少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2およびC_H3を含む抗体である。この定常ドメインは、天然の配列の定常ドメイン（例えば、ヒトの天然の配列定常ドメイン）またはそれらのアミノ酸配列変異体であってもよい。好ましくは、インタクトな抗体は、１つ以上のエフェクター機能を有する。

【００７０】

本明細書の目的のための「裸の抗体」とは、細胞毒性部分または放射性標識にコンジュゲートされていない抗体である。

【００７１】

「抗体フラグメント」とは、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変性領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、およびＦｖフラグメント；ダイアボディ；直鎖状抗体（ｌｉｎｅａｒ ａｎｔｉｂｏｄｙ）（米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２；Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７～１０６２頁［１９９５］を参照のこと）；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多特異的抗体が挙げられる。一実施形態では抗体フラグメントは、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、従って抗原に結合する能力を保持している。

【００７２】

抗体のパパイン消化によって、容易に結晶化する能力を反映する呼称である、「Ｆａｂ」フラグメント、および残りの「Ｆｃ」フラグメントと呼ばれる２つの同一の抗原結合フラグメントが生成される。Ｆａｂフラグメントは、Ｈ鎖の可変性領域ドメイン（V_H）と一緒の全Ｌ鎖、および１本の重鎖の第一の定常ドメイン（C_H1）からなる。Ｆａｂフラグメントの各々は、抗原結合に関して一価である。すなわち、それは、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、二価の抗原結合活性を有する２つのジスルフィド結合Ｆａｂフラグメントにおおよそ対応し、かつ依然として抗原と交差結合できる単一の大型$F(ab')_2$フラグメントが生成する。Ｆａｂ’フラグメントは、抗体ヒンジ領域から１つ以上のシステインを含むC_H1ドメインのカルボキシ末端にさらに２，３の残基を有することによってＦａｂフラグメントとは異なる。本明細書においてＦａｂ’－ＳＨとは、定常ドメインのシステイン残基（単数または複数）が遊離チオール基を保有しているＦａｂ’に関する呼称である。元来、$F(ab')_2$抗体フラグメントは、それらの間にヒンジシステインを有するＦａｂ’フラグメントの対として生成された。抗体フラグメントの他の化学的結合もまた知られている。

【００７３】

Ｆｃフラグメントは、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のＨ鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ領域の配列により判定され、その領域はまた、ある一定のタイプの細胞上に見られるＦｃレセプター（ＦｃＲ）により認識される部分でもある。

【００７４】

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含有する最小の抗体フラグメントで

ある。このフラグメントは、密な非共有結合にある１本の重鎖および１本の軽鎖の可変領域ドメインの二量体からなる。単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）種では、１つの重鎖および１つの軽鎖可変ドメインが、可塑性のペプチドリンカーによって共有結合されて、その結果、軽鎖および重鎖が二本鎖のＦｖ種におけるものと類似の「二量体」構造で会合し得る。これらの２つのドメインの折り畳みによって、抗原結合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つの超可変性ループ（Ｈ鎖およびＬ鎖由来の各々３つのループ）が出現する。しかし、単一の可変性ドメイン（または抗原に特異的な３つだけのＣＤＲを含むＦｖの半分）であっても、抗原を認識し、かつ結合する能力を有しているが、ただし結合部位全体よりは低い親和性である。

【００７５】

「ｓＦｖ］または「ｓｃＦｖ」としても略記される「単鎖Ｆｖ」とは、単一ポリペプチド鎖に結合されたV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。好ましくは、ｓＦｖポリペプチドは、抗原結合のためにｓＦｖが所望の構造を形成できるV_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含む。ｓＦｖの総説文献に関しては、ＰｌｕｃｋｔｈｕｎのＴｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、１１３巻、ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ編集、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２６９～３１５頁（１９９４）；Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ １９９５年、（下記）を参照のこと。

【００７６】

「ダイアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントであって、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）中の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む抗体フラグメントをいう。低分子抗体フラグメントは、Ｖドメインの鎖内の対合ではなくて鎖間の対合が達成され、二価のフラグメント、すなわち２つの抗原結合部位を有するフラグメントが生じるように、V_HドメインとV_Lドメインとの間に短いリンカー（約５～１０の残基）によりｓＦＶフラグメント（前述の段落を参照のこと）を構築することによって調製される。ダイアボディは、二価であっても二重特異性であってもよい。二重特異性ダイアボディは、２つの抗体のV_HドメインとV_Lドメインとが異なるポリペプチド鎖上に存在する２つの「交差」ｓＦｖフラグメントのヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、欧州特許第４０４，０９７号；国際公開第９３／１１１６１号；およびＨｕｄｓｏｎら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９～１３４（２００３）；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：６４４４～６４４８頁（１９９３）において、さらに詳細に記載されている。トリアボディ（ｔｒｉａｂｏｄｙ）およびテトラボディ（ｔｅｔｒａｂｏｄｙ）もＨｕｄｓｏｎら，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９～１３４（２００３）に記載されている。

【００７７】

明細書に用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。すなわち、この集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して方向づけされており、高度に特異的である。さらに、種々の決定基群（エピトープ群）に関する種々の抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に関する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体による汚染なしに合成できるという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、何らかの特定の方法による抗体の産生が必要なものとして解釈すべきではない。例えば、本発明に有用なモノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５頁（１９７５）により最初に記載されたハイブリドーマ方法論によって調製してもよし、または細菌細胞、真核動物細胞または植物細胞における組換えＤＮＡ法を用いて作製できる（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照のこと）。「モノクローナル抗体」は、例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２：６２４～６２８（１９９１）およびＭａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２：５８１～５９７頁（１９９１）に記載された技法を用いてファージ抗体ライブラリーからも単離でき

る。

【００７８】

本明細書のモノクローナル抗体としては、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列と同一か、またはそれに相同性である「キメラ」抗体が挙げられ、一方、所望の生物活性を示す限り、鎖（単数または複数）の残りは、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントにおいて、対応する配列と同一か、またはそれに相同性である（米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：６８５１～６８５５（１９８４）を参照のこと）。本明細書における目的のキメラ抗体としては、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）に由来する可変性ドメイン抗原結合配列、およびヒトの定常領域配列を含んでいる「霊長類化」抗体が挙げられる。

【００７９】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」型とは、非ヒト抗体から誘導された最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は大部分が、レシピエントの超可変性領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性（アフィニティー）、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類など、非ヒト種（ドナー抗体）の超可変性領域からの残基により置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。幾つかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、対応する非ヒト残基により置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに改善するために成される。一般に、ヒト化抗体は、全てまたは実質的に全ての超可変性ループが、非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、全てまたは実質的に全ての複数のＦＲが、ヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、代表的には２つの可変性ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた必要に応じて、免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）の少なくとも１つの部分、代表的にはヒト免疫グロブリンの部分を含む。さらなる詳細に関して、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２～５２５頁（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３～３２９頁（１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３～５９６頁（１９９２）を参照のこと。また以下の総説文献およびそこに引用される参考文献も参照のこと：ＶａｓｗａｎｉおよびＨａｍｉｌｔｏｎ，Ａｎｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ，Ａｓｔｈｍａ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１：１０５～１１５（１９９８）；Ｈａｒｒｉｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ，２３：１０３５～１０３８（１９９５）；ＨｕｒｌｅおよびＧｒｏｓｓ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，５：４２８～４３３（１９９４）。

【００８０】

「チオ」とは、抗体について言及するために本明細書において用いる場合、システイン操作した抗体を指すが、「ｈｕ」とは、本明細書において抗体について言及するために用いる場合、ヒト化抗体を指す。

【００８１】

「ヒト抗体」とは、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有する抗体、および／または本明細書で開示されたヒト抗体を製造するための任意の技術を用いて製造された抗体である。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでいるヒト化抗体を除く。ヒト抗体は、ファージーディスプレイライブラリーを含んで、当該分野で公知の種々の技術を用いることによって生産することが可能である。ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１（１９９１））。またヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能なのは、Ｃｏｌｅら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ．７７頁（１９８５）；Ｂｏｅｒｎｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７（１）：

８６～９５（１９９１）に記載の方法である。またｖａｎ　Ｄｉｊｋおよびｖａｎ　ｄｅ　Ｗｉｎｋｅｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，５：３６８～７４（２００１）も参照のこと。抗原性の刺激に応答してこのような抗体を産生するように改変されているが、その内因性の遺伝子座が無効にされているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウス（ｘｅｎｏｍｉｃｅ）に抗原を投与することによってヒト抗体を調製してもよい（例として、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術に関する米国特許第６，０７５，１８１号および同第６，１５０，５８４号を参照のこと）。また、例えば、ヒトのＢ細胞ハイブリドーマ技術によって生成したヒト抗体に関するＬｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０３：３５５７～３５６２（２００６）も参照のこと。

【００８２】

「超可変領域」、「ＨＶＲ」または「ＨＶ」という用語は、本明細書において用いる場合、配列中で超可変であるか、および／または構造的に規定されるループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は６つの超可変領域；ＶＨに３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、ＶＬに３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。多数の超可変領域の描写が用いられており、かつ本明細書に包含される。Ｋａｂａｔの相補性決定領域（ＣＤＲ）は配列の可変性に基づいており、最も一般的に使用されている（Ｋａｂａｔら，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版　Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１））。Ｃｈｏｔｈｉａは、代わりに構造的ループの位置に言及している（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７（１９８７））。Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ－Ｈ１ループの末端は、Ｋａｂａｔのナンバリングの慣例を用いてナンバリングした場合、ループの長さに応じてＨ３２とＨ３４との間で変化する（これは、Ｋａｂａｔのナンバリングスキームがｈ３５ＡとＨ３５Ｂに位置するという理由であり；３５Ａも３５Ｂも存在しない場合、ループの末端は３２であり；３５Ａのみが存在する場合、ループは３３で終わり；３５Ａも３５Ｂも両方存在する場合は、ループは３４で終わる）。ＡｂＭ超可変領域は、ＫａｂａｔのＣＤＲとＣｈｏｔｈｉａ構造的ループの間の妥協に相当し、Ｏｘｆｏｒｄ　ＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアにより用いられる。「Ｃｏｎｔａｃｔ」超可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これらの超可変領域の各々に由来する残基は下に注記する。

【００８３】

【数１】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
(Kabatのナンバリング)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothiaのナンバリング)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

超可変領域は、以下のような「伸長された超可変領域」を含んでもよい：ＶＬ中の２４～３６または２４～３４（Ｌ１）、４６～５６または５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）と、ＶＨ中の２６～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～６５、４７～６５または４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２、９４～１０２、または９５～１０２（Ｈ３）である。可

変ドメイン残基は、これら各々を規定するために、Ｋａｂａｔら、（上掲）に従ってナンバリングする。

【００８４】

「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、ここで定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【００８５】

「Ｋａｂａｔによる可変ドメイン残基ナンバリング」または「Ｋａｂａｔに記載のアミノ酸位ナンバリング」という用語およびその変形は、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｒｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）の抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに用いられるナンバリングシステムを指す。このナンバリングシステムを用いれば、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲ内の短縮または挿入に相当する２、３のアミノ酸または付加的なアミノ酸を含んでもよい。例えば、重鎖可変ドメインには、Ｈ２の残基５２の後に単一アミノ酸の挿入（Ｋａｂａｔによる残基５２ａ）、および重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入された残基（例えばＫａｂａｔによる残基８２ａ、８２ｂおよび８２ｃなど）を含んでもよい。残基のＫａｂａｔナンバリングは、「標準の」Ｋａｂａｔナンバリング配列によって抗体の配列の相同性領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

【００８６】

可変ドメインの残基を指す場合には一般にＫａｂａｔナンバリングシステムを用いる（およそ、軽鎖の残基１～１０７と重鎖の残基１～１１３）（例えば、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ．第５版．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１））。一般的に、免疫グロブリン重鎖定常領域内の残基を指す場合には、「ＥＵナンバリングシステム」または「ＥＵインデックス」を用いる（例えば、ＥＵインデックスはＫａｂａｔら（上掲）に報告されている）。「ＫａｂａｔにおけるＥＵインデックス」とは、ヒトＩｇＧ１ ＥＵ抗体の残基ナンバリングを指す。本明細書中で特に述べない限り、抗体の可変ドメイン内の残基の番号の言及は、Ｋａｂａｔナンバリングシステムによってナンバリングした残基を意味する。本明細書中で特に述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基の番号の言及は、ＥＵナンバリングシステムによってナンバリングした残基を意味する（例えば、米国特許仮出願第６０／６４０３２３号、ＥＵナンバリングについての図を参照のこと）。

【００８７】

「親和性成熟」抗体とは、その１つ以上のＨＶＲに１つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更（単数または複数）を有さない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる抗体である。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモルまたはさらにはピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において公知の手順により生産できる。Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９～７８３（１９９２年）では、ＶＨドメインとＶＬドメインのシャフリングによる親和成熟を記載している。ＨＶＲおよび／またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発は、Ｂａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ，ＵＳＡ ９１：３８０９～３８１３（１９９４）；Ｓｃｈｉｅｒら、Ｇｅｎｅ，１６９：１４７～１５５（１９９５）；Ｙｅｌｔｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５５：１９９４～２００４（１９９５）；Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５４（７）：３３１０～９（１９９５）；およびＨａｗｋｉｎｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２６：８８９～８９６（１９９２）に記載されている。

【００８８】

「ブロッキング」抗体または「アンタゴニスト」抗体とは、抗原が結合する生物学的活性を阻害または低減する抗体である。好ましいブロッキング抗体またはアンタゴニスト抗

体は、抗原の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。

【００８９】

本明細書において用いる場合、「アゴニスト抗体」とは、目的のポリペプチドの機能的活性のうち少なくとも１つを模倣する抗体である。

【００９０】

「種依存性抗体」、例えば、哺乳動物抗ヒトＩｇＥ抗体とは、第二の哺乳動物種由来のその抗原の相同体が有するよりも、最初の哺乳動物種由来の抗原について強力な結合親和性を有する抗体である。通常は、種依存性の抗体は、ヒト抗原に対して「特異的に結合する」（すなわち、約1×10^{-7}M以下、好ましくは約1×10^{-8}以下および最も好ましくは約1×10^{-9}M以下という結合親和性（Ｋｄ）値を有する）が、第二の非ヒト哺乳動物種由来の抗原の相同体については、ヒト抗原についてのその結合親和性よりも少なくとも約５０分の１、または少なくとも約５００分の１、または少なくとも約１０００分の１弱い結合親和性を有する。種依存性抗体は、上記のような抗体の任意の種々のタイプであってもよいが、好ましくはヒト化抗体またはヒト抗体である。

【００９１】

「結合親和性」とは一般的に、分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合的な相互作用の総合計的な強度を意味する。別段示さない限り、本明細書において「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば抗体と抗原）間の１：１相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は一般的に、解離定数（Ｋｄ）として表すことができる。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定してもよい。低親和性抗体は一般に抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は一般に抗原によりはやく結合し、より長く結合したままとなる傾向である。結合親和性の種々の測定方法が当該分野で公知であり、それらのいずれかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的実施形態を記載する。

【００９２】

「またはより良好（ｏｒ　ｂｅｔｔｅｒ）」とは、結合親和性を指して本明細書において用いる場合、分子とその結合パートナーとの間のさらに強力な結合をいう。「またはより良好な」とは本明細書において用いる場合、より小さい数のＫｄ値で示される、より強力な結合を指す。例えば、「０．６ｎＭまたはそれより良好な」抗原親和性を有する抗体では、抗原についての抗体の親和性は０．６ｎＭ未満、すなわち、０．５９ｎＭ、０．５８ｎＭ、０．５７ｎＭなど、または０．６ｎＭ未満の任意の値である。

【００９３】

一実施形態では、本発明による「Ｋｄ」または「Ｋｄ値」、「Ｋｄ」または「Ｋｄ値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の（^{125}Ｉ）－標識抗原にてＦａｂを均衡化し、次いで抗Ｆａｂ抗体でコーティングしたプレートに結合した抗原を捕獲することによって、抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような（Ｃｈｅｎ，ら、（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３：８６５－８８１）、目的の抗体のＦａｂバージョンとその抗原を用いて行われる放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート（Ｄｙｎｅｘ）を５μｇ／ｍｌの捕獲抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ　Ｌａｂｓ）を含む５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）にて一晩コーティングして、引き続いて２％（ｗ／ｖ）のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳにて室温（およそ２３℃）で２～５時間、ブロックする。非吸着プレート（Ｎｕｎｃ＃２６９６２０）に、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を段階希釈した目的のＦａｂと混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａら、（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５９３～４５９９の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ－１２の評価と一致する）。ついで目的のＦａｂを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間（例えば６５時間）かかる場合もある。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で（例えば1時間）インキュベートする。次いで、溶液を取り除き、プレートを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰ

ＢＳにて８回洗浄する。プレートが乾燥したとき、１５０μｌ／ウェルのシンチラント（ｓｃｉｎｔｉｌｌａｎｔ）（ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ－２０；Ｐａｃｋａｒｄ）を加え、そのプレートをＴｏｐｃｏｕｎｔγ計測器（Ｐａｃｋａｒｄ）にて１０分間カウントする。最大結合の２０％かまたはそれ以下濃度のＦａｂを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。別の実施形態によれば、～１０反応単位（ＲＵ）の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にて表面プラズモン共鳴アッセイを用いてＫｄまたはＫｄ値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５，ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、供給業者の説明書に従ってＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を１０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８で５μｇ／ｍｌ（約０．２μＭ）に希釈し、その後結合したタンパク質の反応単位（ＲＵ）がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳ中に注入する。会合および解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル（ｓｉｍｐｌｅ　ｏｎｅ－ｔｏ－ｏｎｅ　Ｌａｎｇｍｕｉｒ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｍｏｄｅｌ）（ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアバージョン３．２）を用いて、会合速度（K_{on}）および解離速度（K_{off}）を算出する。平衡解離定数（Ｋｄ）をK_{off}／K_{on}比として算出する。例えば、Ｃｈｅｎ，Ｙ．，ら、（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３：８６５～８８１を参照のこと。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回るならば、その結合速度は、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計（ｓｔｏｐ－ｆｌｏｗ　ｅｑｕｉｐｐｅｄ　ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ）（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）または撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ型）の蛍光放出強度（励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ）における増加または減少を測定する蛍光クエンチング技術を用いて測定され得る。

【００９４】

本発明による「結合速度」または「会合の速度」または「会合速度」または「k_{on}」はまた上記のように、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いた上記と同じ表面プラズモン共鳴技術にて測定され得る。

【００９５】

本明細書で用いられる、「実質的に類似」、または「実質的に同じ」という句は、２つの数値（一般には、一方は本発明の抗体に関連する数値、および他方は参照／比較抗体に関連する数値）の間の有意に高い程度の類似性であって、その結果、この値（例えばＫｄ値）によって測定される生物学的特徴において有意差が、生物学的および／または統計学的にわずかであるかまたは全くないと認められる類似性を意味する。前記２つの値間の差異は好ましくは、参照／比較値の抗体の値の関数として約５０％未満、好ましくは約４０％未満、好ましくは約３０％未満、好ましくは約２０％未満、好ましくは約１０％未満である。

【００９６】

本明細書で用いる場合、「実質的に減少」、または「実質的に異なる」という句は、当業者が２つの数値（一般に、本発明の抗体に関連する数値、および参照／比較分子に関連する他の数値）の間の差異に、この値（例えばＫｄ値、ＨＡＭＡ反応）によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほどの、この２つの数値の間の有意に高い程度の差異を意味する。この２つの値間の差異は、参照／比較抗体の値の関数とし

て、好ましくは約１０％より大きく、好ましくは約２０％より大きく、好ましくは約３０％より大きく、好ましくは約４０％より大きく、好ましくは約５０％より大きい。

【００９７】

「抗原」とは、抗体が選択的に結合し得る所定の抗原である。この標的抗原は、ポリペプチドであっても、炭水化物であっても、核酸であっても、脂質であっても、ハプテンであっても、または他の自然に存在するかもしくは合成の化合物であってもよい。好ましくは標的抗原はポリペプチドである。

【００９８】

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワークから、またはヒトコンセンサスフレームワークから由来するＶＬまたはＶＨフレームワークのアミノ酸配列を含んでいるフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる、～に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよいし、または既存のアミノ酸配列変化を含んでもよい。既存のアミノ酸変化が存在する場合、好ましくは５以下、および好ましくは４以下、または３以下の既存のアミノ酸変化が存在する。既存のアミノ酸変化がＶＨ中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置７１Ｈ、７３Ｈおよび７８Ｈの内の３つ、２つまたは１つでのみ起こり；例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔおよび／または７８Ａであってよい。一実施形態では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【００９９】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨの配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別される。一般には、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔら、によるサブグループである。一実施形態では、ＶＬについて、このサブグループはＫａｂａｔらによるサブグループκＩである。一実施形態では、ＶＨについて、このサブグループはＫａｂａｔらによるサブグループＩＩＩである。

【０１００】

「ＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク」は、Ｋａｂａｔらの可変重鎖サブグループＩＩＩのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含む。一実施形態では、ＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部または全部を含む：ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳ（配列番号６９）－Ｈ１－ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ（配列番号７０）－Ｈ２－ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ（配列番号７１）－Ｈ３－ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号７２）。

【０１０１】

「ＶＬサブグループＩコンセンサスフレームワーク」は、Ｋａｂａｔらの可変軽鎖κサブグループＩのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含む。一実施形態では、ＶＬサブグループＩコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部または全部を含む：
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ（配列番号６５）Ｌ１－ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号６６）－Ｌ２－ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号６７）－Ｌ３－ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号６８）。

【０１０２】

「未改変のヒトフレームワーク」とは、アクセプターヒトフレームワークと同じアミノ酸配列を有する、例えば、アクセプターヒトフレームワークにおけるヒトアミノ酸から非ヒトアミノ酸への置換（単数または複数）を欠いている、ヒトフレームワークである。

【０１０３】

本明細書における目的のための「変更された超可変領域」とは、その中に１つ以上（例えば、１～約１６個の）アミノ酸置換（単数または複数）を含んでいる超可変領域である。

【０１０４】

本明細書の目的のための「未改変の超可変領域」とは、それが由来する非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有している超可変領域、すなわち、その中に１つ以上のアミノ酸置換がない超可変領域である。

【０１０５】

目的の抗原、例えば、腫瘍関連ポリペプチド抗原標的に「結合する」抗体とは、抗体が抗原を発現している細胞または組織を標的するのにおいて治療剤として有用であり、そして他のタンパク質とは、有意な交差反応を起こさないような十分な親和性で抗原に結合する抗体である。このような実施形態では、「非標的」タンパク質への抗体の結合の程度は、蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）分析または放射免疫沈降（ＲＩＡ）により測定した場合に、抗体のその特定の標的タンパク質への結合の約１０％未満である。標的分子への抗体の結合に関しては、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定可能な相違がある結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般には結合活性を有しない同様の構造の分子であるコントロール分子の結合と比較して分子の結合を決定することにより測定してもよい。例えば、特異的結合は、標的と同様のコントロール分子、例えば、過剰の非標識標的との競合により決定できる。この場合、プローブへの標識標的の結合が、過剰な非標識標的により競合的に阻害された場合に、特異的結合が示される。本明細書において用いる場合、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」という用語は、例えば、少なくとも約10^{-4}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-5}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-6}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-7}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-8}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-9}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-10}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-11}Ｍ、あるいは少なくとも約10^{-12}Ｍまたはそれ以上の、標的に対するＫｄを有する分子により示され得る。ある実施形態では、「特異的結合」という用語は、分子が任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する場合の結合のことをいう。

【０１０６】

「ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する」抗体または「増殖阻害性」抗体とは、適切なＣＤ７９ｂポリペプチドを発現するかまたは過剰発現するガン細胞の測定可能な増殖阻害を生じる抗体である。ＣＤ７９ｂポリペプチドは、ガン細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであってもよいし、またはガン細胞によって産生され、分泌されるポリペプチドであってもよい。好ましい増殖阻害性抗ＣＤ７９ｂ抗体は、適切なコントロールに比較して、２０％より多く、好ましくは約２０％～約５０％、さらに好ましくは５０％より多くまで（例えば、約５０％～約１００％）ＣＤ７９ｂ発現腫瘍細胞の増殖を阻害し、このコントロールとは代表的には、試験されている抗体で処理されない腫瘍細胞である。一実施形態では、増殖阻害は、細胞培養中で約０．１～３０μｇ／ｍｌまたは約０．５ｎＭ～２００ｎＭの抗体濃度で測定され得、この増殖阻害は、抗体に対する腫瘍細胞の曝露の１～１０日後に決定される。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害は、下の実験の実施例に記載されるような種々の方法で測定され得る。抗体は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の体重あたり約１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの投与が、抗体の最初の投与から約５日～３カ月内に、好ましくは約５～３０日内に腫瘍サイズまたは腫瘍細胞増殖の減少を生じる場合にインビボで増殖阻害性である。

【０１０７】

「アポトーシスを誘導する」抗体とは、アネキシンＶの結合、ＤＮＡの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞の断片化、および／または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる

）の形成によって決定されるプログラムされた細胞死を誘導する抗体である。この細胞は通常は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを過剰発現する細胞である。好ましくはこの細胞は、腫瘍細胞、例えば、造血細胞、例えば、Ｂ細胞、Ｔ細胞、好塩基球、好酸球、好中球、単球、血小板または赤血球である。アポトーシスに関連する細胞事象を評価するには種々の方法が利用可能である。例えば、ホスファチジルセリン（ＰＳ）転位は、アネキシン結合によって測定され得る；ＤＮＡ断片化は、ＤＮＡラダー形成を通じて評価され得る；そしてＤＮＡ断片化にともなう核／クロマチン凝縮は、低二倍性細胞におけるなんらかの増大によって評価され得る。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、アネキシン結合アッセイにおいて未処理の細胞に対するアネキシン結合の誘導を約２～約５０倍、好ましくは約５～約５０倍、最も好ましくは約１０～５０倍生じる抗体である。

【０１０８】

「細胞死を誘導する」抗体とは、生存細胞を生育不能にさせる抗体である。この細胞は、一般に、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する細胞であり、特に、この細胞タイプは、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現するかまたは過剰発現する。この細胞は特定の細胞型の癌性または正常な細胞であってもよい。ＣＤ７９ｂポリペプチドは、ガン細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであってもよいし、またはガン細胞によって産生および分泌されるポリペプチドであってもよい。この細胞は、ガン細胞、例えば、Ｂ細胞またはＴ細胞であってもよい。インビトロでの細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ＡＤＣＣ）または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）によって誘導される細胞死を区別するために、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で決定されてもよい。従って、細胞死についてのアッセイは、熱不活化血清を用いて（すなわち、補体の非存在下で）かつ免疫エフェクター細胞の非存在下で行われてもよい。抗体が細胞死を誘導し得るか否かを決定するために、膜の完全性の損失（ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー（Ｍｏｏｒｅら、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１７：１～１１（１９９５）を参照のこと）または７ＡＡＤの取り込みによって評価されるような）が、非処理細胞と比較して評価され得る。好ましい細胞死誘導抗体は、ＢＴ４７４細胞におけるＰＩ取り込みアッセイにおいて、ＰＩ取り込みを誘導する抗体である。

【０１０９】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然配列Ｆｃ領域またはアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域）に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプに応じて変わる。抗体のエフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害性；Ｆｃレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、Ｂ細胞レセプター）の下方制御；およびＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１１０】

「Ｆｃ領域」という用語は、本明細書において、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために用いられ、これにはＦｃ領域の天然の配列および改変体Ｆｃ領域が挙げられる。免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の境界は変化するかも知れないが、ヒトＩｇＧ重鎖のＦｃ領域は、通常、Ｃｙｓ２２６の位置のアミノ酸残基、またはＰｒｏ２３０からそのカルボキシル末端まで伸展すると定義される。Ｆｃ領域のＣ末端リジン（ＥＵナンバリングシステムに従って残基４４７）は、例えば、抗体の産生もしくは精製の間に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え操作することによって除去され得る。従って、インタクトな抗体の組成物は、除去される全てのＫ４４７残基を有する抗体集団、除去されるＫ４４７残基がない抗体集団、およびＫ４４７残基の有無の抗体の混合物を有する抗体集団を含んでもよい。

【０１１１】

「機能的Ｆｃ領域」は、天然配列Ｆｃ領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的「エフェクター機能」としては、Ｃ１ｑ結合；ＣＤＣ；Ｆｃレセプター結合；ＡＤＣＣ；食作用；細胞表面レセプター（例えばＢ細胞レセプター；ＢＣＲ）の下方制御などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、通常、Ｆｃ領域が結合ドメイン（例えば、抗体

可変ドメイン）と組み合わさることを必要とし、例えば、本明細書の定義に開示されるような種々のアッセイを用いて評価され得る。

【０１１２】

「天然配列のＦｃ領域」は、天然に見出されるＦｃ領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトＦｃ領域としては、天然配列のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域（非Ａ－およびＡ－アロタイプ）；天然配列のヒトＩｇＧ２Ｆｃ領域；天然配列のヒトＩｇＧ３Ｆｃ領域；および天然配列のヒトＩｇＧ４Ｆｃ領域；ならびに、これらの自然に生じる改変体が挙げられる。

【０１１３】

「改変体Ｆｃ領域」は、少なくとも１つのアミノ酸修飾、好ましくは１つ以上のアミノ酸置換（単数または複数）により、天然配列のＦｃ領域とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくはこの改変体Ｆｃ領域は、天然配列のＦｃ領域もしくは親ポリペプチドのＦｃ領域と比較した場合、少なくとも１つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のＦｃ領域または親のポリペプチドのＦＣ領域におよそ１からおよそ１０のアミノ酸置換、好ましくはおよそ１からおよそ５のアミノ酸置換を有する。本明細書中の改変体Ｆｃ領域は、好ましくは、天然配列のＦｃ領域および／または親ポリペプチドのＦｃ領域と、少なくともおよそ８０％の相同性を有し、最も好ましくは、そのＦｃ領域と少なくともおよそ９０％の相同性を、より好ましくはそのＦｃ領域と少なくともおよそ９５％の相同性を有するであろう。

【０１１４】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ＡＤＣＣ」とは、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するＦｃレセプター（ＦｃＲｓ）と結合した分泌Ｉｇにより、これらの細胞傷害エフェクター細胞が抗原－保有標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒素により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞傷害性の形態を指す。この抗体は、細胞傷害性細胞を「装備して」おり、このような殺傷には絶対的に必要である。ＡＤＣＣを媒介する主要な細胞であるＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現するのに対し、単球はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞でのＦｃＲの発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ　ａｎｄ　Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，９：４５７～９２（１９９１）の４６４頁の表３に要約されている。目的の分子のＡＤＣＣ活性をアッセイするために、米国特許第５５００３６２号または同第５８２１３３７号に記載されているようなインビトロＡＤＣＣアッセイを行ってもよい。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞としては、末梢血液単核細胞（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）が挙げられる。代わりとして、もしくは付加的に、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、例えば、Ｃｌｙｎｅｓら（ＵＳＡ）９５：６５２～６５６（１９９８）において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【０１１５】

「Ｆｃレセプター」または「ＦｃＲ」とは、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。好ましいＦｃＲは天然配列のヒトＦｃＲである。さらに好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマレセプター）と結合するものであって、これにはＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩサブクラスのレセプターが挙げられ、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的スプライシング型のものも含まれる。ＦｃγＲＩＩレセプターとしては、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性型レセプター」）およびＦｃγＲＩＩＢ（「阻害型レセプター」）が挙げられ、これは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。活性型レセプターＦｃγＲＩＩＡ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ＦｃγＲＩＩＢ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（例としてＤａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３～２３４（１９９７）を参照のこと）。ＦｃＲｓは

、ＲａｖｅｔｃｈおよびＫｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌら、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５～３４（１９９４）；およびｄｅ Ｈａａｓら、Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０～４１（１９９５）に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のＦｃＲｓは本明細書において「ＦｃＲ」という言葉によって包含される。この用語はまた、新生児レセプターであるＦｃＲｎを包含し、これは母性ＩｇＧの胎児への移送を担っている（Ｇｕｙｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）およびＫｉｍら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））。

【０１１６】

インビボでのヒトＦｃＲｎへの結合およびヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウスまたはトランスフェクトされたヒト細胞株において、または改変体Ｆｃ領域を有するポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイしてもよい。国際公開第２０００／４２０７２（Ｐｒｅｓｔａ）には、ＦｃＲへの結合を向上または減弱させた抗体改変体が述べられている。例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１～６６０４（２００１）も参照のこと。

【０１１７】

「ヒトエフェクター細胞」は、１つ以上のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を発揮する白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を発揮する。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞毒性Ｔ細胞および好中球が挙げられ；ＰＢＭＣ細胞およびＮＫ細胞が好ましい。このエフェクター細胞は、天然の供給源、例えば血液から単離してもよい。

【０１１８】

「補体依存細胞毒性」または「ＣＤＣ」とは、補体存在下、標的細胞の細胞溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系の第一の成分（Ｃ１ｑ）の、同族抗原に結合している抗体（適切なサブクラスの）への結合により開始される。補体活性を評価するために、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載されたＣＤＣアッセイを行うことができる。Ｆｃ領域アミノ酸配列が変更され、かつＣ１ｑ結合能力が増大または減少したポリペプチド改変体（改変体Ｆｃ領域を有するポリペプチド）は、米特許第６，１９４，５５１号Ｂ１および国際公開第１９９９／５１６４２号に記載される。例えば、Ｉｄｕｓｏｇｉｅら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４１７８～４１８４（２０００）も参照のこと。

【０１１９】

「Ｆｃ領域含有抗体」という用語は、Ｆｃ領域を含む抗体をいう。Ｆｃ領域のＣ末端リジン（ＥＵナンバリングシステムに従って残基４４７）は、例えば、抗体の精製の間に、または抗体をコードする核酸の組み換え操作によって除去され得る。従って、本発明によるＦｃ領域を有する抗体を含んでいる組成物は、Ｋ４４７を有する抗体、除去される全Ｋ４４７を有する抗体、またはＫ４４７残基の有無の抗体の混合物を含んでもよい。

【０１２０】

ＣＤ７９ｂポリペプチドの「細胞外ドメイン」または「ＥＣＤ」とは、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを本質的に含まないＣＤ７９ｂポリペプチドの形態のことをいう。通常は、ＣＤ７９ｂポリペプチドのＥＣＤは、１％未満のこのような膜貫通ドメインおよび／または細胞質ドメインを有し、好ましくは０．５％未満のこのようなドメインを有する。本発明のＣＤ７９ｂポリペプチドについて同定される任意の膜貫通ドメインが、そのタイプの疎水性ドメインを同定するために当該分野で慣用的に使用されている基準に従って同定される。膜貫通ドメインの厳密な境界は変動し得るが、最もあり得るのは本明細書において最初に同定されたドメインのいずれかの末端において約５アミノ酸を超えないものである。従って、必要に応じて、ＣＤ７９ｂポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例または明細書において同定される膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界のいずれかの側

において約５個以下のアミノ酸を含んでよく、付随するシグナルペプチドを含むか含まないそのようなポリペプチドおよびそれらをコードする核酸は、本発明が意図している。

【０１２１】

本明細書に開示されたＣＤ７９ｂポリペプチドの「シグナルペプチド」のおよその位置は、本明細書および／または添付の図面に示している場合がある。しかしながら、シグナルペプチドのＣ末端の境界は、変動し得るが、最もあり得るのは本明細書において最初に同定されたシグナルペプチドのＣ末端の境界のいずれかの側において約５アミノ酸を超えないものであり、ここでそのシグナルペプチドのＣ末端の境界は、アミノ酸配列エレメントのそのような型を同定するために当該分野で慣用的に使用されている基準に従って同定され得る（例えば、Ｎｉｅｌｓｅｎら、Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．１０：１～６（１９９７）およびｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１４：４６８３～４６９０（１９８６））。さらに、いくつかの場合において、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、２つ以上の分泌種をもたらすということも理解される。これらの成熟ポリペプチド（シグナルペプチドは、本明細書において同定されたシグナルペプチドのＣ末端の境界のいずれかの側の約５アミノ酸以内において切断されている）およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明が意図している。

【０１２２】

「ＣＤ７９ｂポリペプチド改変体」とは、ＣＤ７９ｂポリペプチド、好ましくは、本明細書で開示される全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する本明細書中で定義される活性なＣＤ７９ｂポリペプチド、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを欠いているＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを含むかもしくは含まないＣＤ７９ｂポリペプチドの細胞外ドメイン、または本明細書中で開示される全長ＣＤ７９ｂポリペプチド配列の任意の他のフラグメント（全長ＣＤ７９ｂポリペプチドについての完全なコード配列の一部のみに相当する核酸によってコードされるものなど）のことを意味する。そのようなＣＤ７９ｂポリペプチド改変体としては、例えば、全長の天然のアミノ酸配列のＮ末端またはＣ末端において１以上のアミノ酸残基が付加または欠失されているＣＤ７９ｂポリペプチドが挙げられる。通常、ＣＤ７９ｂポリペプチド改変体は、本明細書中で開示する全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを欠いているＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを含むかもしくは含まないＣＤ７９ｂポリペプチドの細胞外ドメイン、または本明細書中で開示される全長ＣＤ７９ｂポリペプチド配列の任意の他の特別に定義される任意のフラグメントに対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有するか、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％もしくは９９％のアミノ酸配列同一性を有する。通常、ＣＤ７９ｂ改変体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長であるか、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アミノ酸長もしくはそれ以上である。必要に応じて、ＣＤ７９ｂ改変体ポリペプチドは、天然ＣＤ７９ｂポリペプチド配列と比較して、１個以下の保存的アミノ酸置換を有するか、あるいは天然ＣＤ７９ｂポリペプチド配列と比較して、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個以下の保存的アミノ酸置換を有するであろう。

【０１２３】

本明細書において同定されるペプチドまたはポリペプチドの配列、すなわちＣＤ７９ｂポリペプチド配列に関して「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」とは、最大パーセントの配列同一性を達成するように必要に応じて配列をアラインメントし、ギャップを導入

した後に、特定のペプチドまたはポリペプチドの配列、すなわちＣＤ７９ｂポリペプチド配列中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テージとして定義され、いかなる保存的置換も配列同一性の部分とはみなされない。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、当業者の範囲内の種々の方法、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア）を用いて達成してもよい。当業者は、比較すべき配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要ないずれか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してもよい。しかしながら、本明細書の目的のためには、％アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて作成され、ここでＡＬＩＧＮ－２プログラムに関する完全なソースコードを以下の表１に示す。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．により作成され、そして以下の表１に示すソースコードは、米国著作権局Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９においてユーザー文書と共に提出されており、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから公的に入手可能であるし、または、以下の表１に示す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上で使用するためにコンパイルしなければならない。全ての配列比較パラメータはＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定され、変更しない。

【０１２４】

アミノ酸配列比較のためにＡＬＩＧＮ－２を使用する状況では、所定のアミノ酸配列Ｂに対する所定のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（これは代替として、所定のアミノ酸配列Ｂに対する特定のアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む所定のアミノ酸配列Ａと表現できる）は、以下のように計算され：

１００×分数Ｘ／Ｙ

式中、Ｘは、ＡおよびＢのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により同一でマッチングとスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合は、Ｂに対するＡのアミノ酸配列同一性％は、Ａに対するＢのアミノ酸配列同一性％と等しくならないことが理解されるであろう。

【０１２５】

「ＣＤ７９ｂ改変体ポリヌクレオチド」または「ＣＤ７９ｂ改変体核酸配列」とは、ＣＤ７９ｂポリペプチド、好ましくは、本明細書に定義されており、かつ本明細書中で開示される全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列をコードする核酸配列と少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有する活性なＣＤ７９ｂポリペプチド、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを欠いている全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを含むかもしくは含まないＣＤ７９ｂポリペプチドの細胞外ドメイン、または、本明細書中で開示される全長ＣＤ７９ｂポリペプチド配列の任意の他のフラグメント（例えば、全長ＣＤ７９ｂポリペプチドについての完全なコード配列の一部分のみに相当する核酸によりコードされるもの）をコードする核酸分子を意味する。通常、ＣＤ７９ｂ改変体ポリヌクレオチドは、本明細書中で開示される全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを欠いている全長の天然の配列のＣＤ７９ｂポリペプチド配列、本明細書中で開示されるシグナルペプチドを含むかもしくは含まないＣＤ７９ｂポリペプチドの細胞外ドメイン、または、本明細書中で開示される全長ＣＤ７９ｂポリペプチド配列の任意の他のフラグメントをコードする核酸配列に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有するか、または、少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％

もしくは９９％の核酸配列同一性を有する。改変体は、天然ヌクレオチド配列を包含しない。

【０１２６】

通常、ＣＤ７９ｂ改変体ポリヌクレオチドは、少なくとも約５ヌクレオチド長であるか、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または１０００ヌクレオチド長であり、ここで、この文脈において、「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長±その参照した長さの１０％を意味する。

【０１２７】

本明細書において同定される、ＣＤ７９ｂコード核酸配列に関する「核酸配列同一性パーセント（％）」とは、最大パーセントの配列同一性を達成するように必要に応じて配列をアラインメントし、ギャップを導入した後に、目的のＣＤ７９ｂ核酸配列中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テージとして定義される。核酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当該分野の技術の範囲内の種々の方法、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて達成してもよい。しかしながら、本明細書の目的のためには、核酸配列同一性％の値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて生成し、ここでＡＬＩＧＮ－２プログラムに関する完全なソースコードを以下の表１に示す。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．により作成され、そして以下の表１に示すソースコードは、米国著作権局Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．，２０５５９においてユーザー文書と共に提出されており、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから公的に入手することができ、または、以下の表１に示す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上で使用するためにコンパイルしなければならない。全ての配列比較パラメータはＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定され、変更しない。

【０１２８】

核酸配列比較のためにＡＬＩＧＮ－２を使用する状況において、所定の核酸配列Ｄに対するまたはその配列との所定の核酸配列Ｃの核酸配列同一性％（これは代替として、所定の核酸配列Ｄに対するまたはその配列との特定の核酸配列同一性％を有するか、または含む、所定の核酸配列Ｃと表現できる）は、以下：

１００×分数Ｗ／Ｚ

のように算出され、式中、Ｗは、ＣおよびＤのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により同一でマッチングとスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Ｚは、Ｄにおけるヌクレオチドの総数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと等しくない場合は、Ｄに対するＣの核酸配列同一性％は、Ｃに対す

るＤの核酸配列同一性％と等しくならないことが理解されるであろう。他に特段の記載がない限り、本明細書で使用する全ての核酸配列同一性％の値は、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを用いて直前の段落において記載したとおりに得られる。

【０１２９】

他の実施形態では、ＣＤ７９ｂ改変体ポリペプチドとは、ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードしており、かつ本明細書中で開示される全長ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に、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条件下および洗浄条件下でハイブリダイズし得る核酸分子である。ＣＤ７９ｂ改変体ポリペプチドは、ＣＤ７９ｂ改変体ポリヌクレオチドによりコードされるものであってもよい。

【０１３０】

「全長コード領域」という用語は、ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードする核酸を言及する際に使用する場合、本発明の全長ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列のことをいう（これは、添付図面において開始コドンと終止コドン（それらを含む）との間に示される場合が多い）。「全長コード領域」という用語は、ＡＴＣＣ寄託核酸を言及する際に用いられる場合、ＡＴＣＣに寄託されているベクター内に挿入されているｃＤＮＡのうちＣＤ７９ｂポリペプチドをコードする部分のことをいう（これは、添付の図面において開始コドンと終止コドン（それらを含む）との間に示される場合が多い（開始コドンおよび終止コドンは図面中では太字にして、かつ下線を付している））。

【０１３１】

「単離された」とは、本明細書中で開示される種々のＣＤ７９ｂポリペプチドを説明するために用いる場合、その天然の環境の成分中から同定および分離および／または回収されたポリペプチドを意味する。その天然の環境の混入成分は、代表的にはポリペプチドの治療用途を妨害する物質であり、これらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態では、（１）スピニングカップ（ｓｐｉｎｎｉｎｇ　ｃｕｐ）配列決定装置を用いることによってＮ末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（２）クマシーブルー染色もしくは好ましくは銀染色を用いた非還元または還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均質性となるように、このポリペプチドは精製される。単離されたポリペプチドとしては組換え細胞内のインサイチュのポリペプチドが挙げられるが、その理由はＣＤ７９ｂポリペプチドの自然環境の成分の少なくとも１つの成分が存在しないためである。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。

【０１３２】

「単離された」ＣＤ７９ｂポリペプチドコード核酸または他のポリペプチドコード核酸とは、ポリペプチドコード核酸の天然の供給源において通常関連する少なくとも１つの混入核酸分子から同定され、分離される核酸分子である。単離されたポリペプチドコード核酸分子とは、自然界にそれが存在する形態または状態以外のものである。従って、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、天然の細胞内にそれが存在する場合、特定のポリペプチドコード核酸分子とは区別される。しかしながら、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、例えば、その核酸分子が天然の細胞のものとは異なる染色体位置にある場合、通常そのポリペプチドを発現する細胞に含まれるポリペプチドコード核酸分子を包含する。

【０１３３】

「制御配列」という用語は、特定の宿主生物中の作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なＤＮＡ配列のことをいう。例えば、原核生物に適した制御配列としては、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列およびリボソーム結合部位を包含する。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およびエンハンサーを利用することが公知である。

【０１３４】

核酸は、それが別の核酸配列との機能的関連性におかれる場合に「作動可能に連結」さ

れている。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するＤＮＡは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合にはそのポリペプチドに対するＤＮＡに作動可能に連結されており；プロモーターもしくはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合にはコード配列に作動可能に連結されており；または、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置付けられている場合にコード配列に作動可能に連結されている。一般的に「作動可能に連結された」とは、連結されるＤＮＡ配列が隣接しており、そして、分泌リーダーの場合は隣接し、かつリーディングフェーズにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位における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、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の慣行に従って用いる。

【０１３５】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」とは、当業者が容易に決定できるものであり、一般的にプローブ長、洗浄温度および塩濃度に依存した実験的計算値である。一般に、長いプローブほど適切なアニーリングのためにより高温を必要とするが、短いプローブほどより低温を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、相補鎖がその融点より低温の環境中に存在する場合、変性したＤＮＡが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、使用できる相対温度は高くなる。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とする傾向があり、より低い温度は、その傾向が小さい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関するさらなる詳細および説明については、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，（１９９５）を参照のこと。

【０１３６】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」とは、本明細書において定義する場合、以下によって特定してもよい：（１）低いイオン強度および高い洗浄温度、例えば、０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを５０℃において使用するか；（２）ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドなどの変性剤、例えば、５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミド＋０．１％のウシ血清アルブミン／０．１％Ｆｉｃｏｌｌ／０．１％ポリビニルピロリドン／５０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ６．５＋７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムを４２℃で使用するか；または（３）５０％のホルミアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ溶液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍＬ）、０．１％のＳＤＳおよび１０％デキストラン硫酸を４２℃で使用し、そして１０分の洗浄を４２℃で０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）続いて５５℃でＥＤＴＡ含有０．１×ＳＳＣからなる１０分の高ストリンジェンシー洗浄条件を使用する溶液中での一晩のハイブリダイゼーション。

【０１３７】

「中等度にストリンジェントな条件」とは、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ；Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，１９８９による説明と同一と考えてよく、そして、上記したものより低ストリンジェントな洗浄溶液およびハイブリダイゼーションの条件（例えば、温度、イオン強度および％ＳＤＳ）の使用を包含する。中等度にストリンジェントな条件の例は、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のリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ溶液、１０％デキストラン硫酸および２０ｍｇ／ｍＬ変性撹拌サケ精子ＤＮＡを含む溶液中３７℃での一晩のインキュベーションおよびその後の約３７～５０℃における１×ＳＳＣ中フィルターの洗浄である。プローブ長などのような因子を適合さ

せるために必要に応じて温度、イオン強度などを調節する方法は当業者の認識するとおりである。

【０１３８】

「エピトープタグ化された」という用語は、本明細書において用いる場合、「タグポリペプチド」に融合されたＣＤ７９ｂポリペプチドまたは抗ＣＤ７９ｂ抗体を含むキメラポリペプチドのことをいう。タグポリペプチドは、対応する抗体が作製できるエピトープを提供するために十分な残基を有するが、融合相手のポリペプチドの活性を妨害しないくらい短い。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しないほど高度に特有のものである。適切なタグポリペプチドは、一般に少なくとも６アミノ酸残基、そして通常は約８～５０アミノ酸残基（好ましくは約１０～２０アミノ酸残基）を有する。

【０１３９】

「活性な」または「活性」とは、本明細書の目的では、天然のまたは自然に存在するＣＤ７９ｂの生物学的および／または免疫学的な活性を保持するＣＤ７９ｂポリペプチドの形態のことをいい、ここで、「生物学的」活性とは、天然のまたは自然に存在するＣＤ７９ｂが保有する抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の天然または自然に存在するＣＤ７９ｂによって引き起こされる生物学的機能（抑制性または促進性のいずれか）のことをいい、そして「免疫学的」活性とは、天然のまたは自然に存在するＣＤ７９ｂが保有する抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力のことをいう。

【０１４０】

「アンタゴニスト」という用語は、最も広範な意味において使用され、そして天然のＣＤ７９ｂポリペプチドの生物学的活性を部分的もしくは完全にブロック、阻害または中和する任意の分子を包含する。同様の様式において、「アゴニスト」という用語は、最も広範な意味において使用され、そして天然のＣＤ７９ｂポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を包含する。適切なアゴニスト分子またはアンタゴニスト分子としては、特に天然のＣＤ７９ｂのポリペプチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子などのアゴニストもしくはアンタゴニストの抗体または抗体フラグメント、フラグメントあるいはアミノ酸配列改変体が挙げられる。ＣＤ７９ｂポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための方法は、ＣＤ７９ｂポリペプチドと候補アゴニスト分子または候補アンタゴニスト分子とを接触させる工程、およびＣＤ７９ｂポリペプチドに通常関連している１つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定する工程を包含し得る。

【０１４１】

「精製された」とは、ある分子が、その分子が含まれるサンプルの少なくとも９５重量％、または少なくとも９８重量％の濃度でそのサンプル中に存在することを意味する。

【０１４２】

「単離された」核酸分子とは、その核酸分子が通常関連している、例えば、天然の環境中での少なくとも１つの他の核酸分子から分離されている核酸分子である。単離された核酸分子は、その核酸分子を通常発現する細胞中に含まれる核酸分子をさらに包含するが、その核酸分子は、染色体外にまたは自然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【０１４３】

「ベクター」という用語は、本明細書において用いる場合、それが結合している別の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。１つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なＤＮＡセグメントが結合され得る環状の二重鎖ＤＮＡループを指す。別のタイプのベクターはファージベクターである。別の型のベクターはウイルスベクターであり、ここでは付加的なＤＮＡセグメントをウイルスゲノムへ結合させることができる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製してもよい（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベ

クターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示し得る。このようなベクターは本明細書では「組換え発現ベクター」（または単に「組換えベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えＤＮＡ技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く用いられているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に用いる場合が多い。

【０１４４】

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、ＤＮＡおよびＲＮＡが包含される。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらのアナログ、またはＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼにより、または合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質であってもよい。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびそれらのアナログを含んでもよい。存在する場合は、ヌクレオチド構造に対する修飾はポリマーのアセンブリの前に付与しても、または後に付与してもよい。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後にさらに例えば標識とのコンジュゲーションによりさらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾としては、例えば１つ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログによる「キャップ」置換、ヌクレオチド間修飾、例えば未荷電連結による（例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カーバメートなど）、および、荷電連結（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）によるもの、ペンダント部分を含有するもの、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ｐｌｙ－Ｌ－リジンなど）、インターカレーターを有するもの（例えばアクリジン、ソラレン等）、キレート剤を含有するもの（例えば金属、放射活性金属、ホウ素、酸化性金属など）、アルキル化剤を含有するもの、修飾された連結部を有するもの（例えばα芳香族核酸など）、ならびに、未修飾型のポリヌクレオチド（単数または複数）が挙げられる。さらにまた、糖に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホネート基、ホスフェート基により置き換えられているか、標準的な保護基により保護されているか、または、追加のヌクレオチドへの追加的連結部を作成するために活性化されていてもよく、あるいは、固体または半固体の支持体にコンジュゲートされていてもよい。５’および３’末端のＯＨはリン酸化されてもよいし、または、アミンもしくは炭素原子１～２０個の有機キャッピング基部分により置換されていてもよい。他のヒドロキシルはまた標準的保護基に誘導体化されていてよい。ポリヌクレオチドはまた当該分野で一般的に知られたリボースまたはデオキシリボース糖のアナログ形態、例えば２’－Ｏ－メチル－、２’－Ｏ－アリル、２’－フルオロ－または２’－アジド－リボース、炭素環糖アナログ、α－アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロースまたはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状アナログおよび非塩基性アナログ、例えばメチルリボシドなどを含んでもよい。１つ以上のホスホジエステル連結部が別の連結基により置き換えられていてよい。これらの代替的連結基としては、限定するものではないがホスフェートがＰ（Ｏ）Ｓ（チオエート）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（ジチオエート）、（Ｏ）NR_2（アミデート）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯまたはCH_2（「ホルムアセタール」）で置き換えられている実施形態を包含し、ここで各ＲまたはＲ’は独立して、Ｈまたは場合によりエーテル（－Ｏ－）結合を含有する置換または未置換のアルキル（１～２０Ｃ）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルキルである。ポリヌクレオチド中の全連結部が同一である必要はない。前記の説明はＲＮＡおよびＤＮＡを包含する本明細書に記載する全てのポリヌクレオチドにあてはまる。

【０１４５】

「オリゴヌクレオチド」とは本明細書において用いる場合、必須ではないが一般的に約２００ヌクレオチド長未満の短鎖の一般的には１本鎖の一般的には合成されたポリヌクレオチドを一般的に指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドに関して上記した説明は等しく、そして完全

にオリゴヌクレオチドに適用できる。

【０１４６】

「癌、ガン」および「癌性」という用語は、制御されない細胞増殖によって代表的には特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を指すかまたは記述する。ガンの例としては、限定するものではないが、造血系の癌、または血液関連の癌、例えば、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられるだけでなく、脾臓のガンおよびリンパ節のガン、さらに癌腫、芽細胞腫、および肉腫も挙げられる。癌のさらに具体的な例としては、Ｂ細胞関連のガンが挙げられ、これには、例えば、高悪性度、中悪性度および低悪性度のリンパ腫（例えば粘膜内リンパ組織Ｂ細胞リンパ腫および非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）などのＢ細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、周辺帯リンパ腫、拡散性大細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、およびホジキンリンパ腫およびＴ細胞リンパ腫を含む）、および白血病（二次性白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、例えばＢ細胞白血病（ＣＤ５＋Ｂリンパ球）、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）および骨髄異形成症候群を含む）、ならびにその他の血液学的および／またはＢ細胞もしくはＴ細胞関連の癌が挙げられる。さらには追加的な造血性細胞の癌も含まれ、このような細胞としては、好塩基球、好酸球、好中球および単球等の多形核白血球、樹状細胞、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞が挙げられる。また、以下から選択される癌性のＢ細胞増殖性障害も含まれる：リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫。Ｂ細胞癌の起源は以下のとおりである：周辺帯Ｂ細胞リンパ腫は周辺帯の記憶Ｂ細胞を起源とし、濾胞性リンパ腫および拡散性大Ｂ細胞リンパ腫は胚中心の軽帯（ｌｉｇｈｔ　ｚｏｎｅ）の中心細胞を起源とし、慢性リンパ性白血病および小リンパ球白血病はＢ１細胞（ＣＤ５＋）を起源とし、マントル細胞リンパ腫はマントル帯のナイーブなＢ細胞を起源とし、そしてバーキットリンパ腫は胚中心の暗帯（ｄａｒｋ　ｚｏｎｅ）の中心芽細胞を起源とする。本明細書で「造血性細胞組織」と呼ばれる造血性細胞を含む組織としては、胸腺および骨髄および末梢性リンパ組織、例えば脾臓、リンパ節、粘膜に関連するリンパ組織、例えば消化管関連のリンパ組織、扁桃腺、パイアー斑（バイエル板）および虫垂、ならびにその他粘膜に関連するリンパ組織、例えば気管支内側が挙げられる。このような癌のさらに特別な例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸管癌、膵癌、グリア芽腫、子宮頚部癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌または子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、白血病、および他のリンパ増殖性の障害、および種々のタイプの頭頸部癌が挙げられる。

【０１４７】

本明細書の「Ｂ細胞悪性腫瘍」としては、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）が挙げられ、これには軽度／濾胞性ＮＨＬ、小リンパ球（ＳＬ）ＮＨＬ、中程度／濾胞性ＮＨＬ、中程度の拡散性ＮＨＬ、重度の免疫芽細胞ＮＨＬ、重度のリンパ芽球ＮＨＬ、重度の非正円形細胞でない小細胞性ＮＨＬ、巨大病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、リンパ球優位型ホジキン病（ＬＰＨＤ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、再発性無痛性ＮＨＬおよびリツキシマブ難治性無痛性ＮＨＬを含む無痛性ＮＨＬ；急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病を含む白血病；マントル細胞リンパ腫；および他の血液学的悪性腫瘍が挙げられる。このような悪性腫瘍は、ＣＤ７９ｂのようなＢ細胞表面マーカーに対する抗体で処置され得る。このような疾患は本明細書では、ＣＤ７９ｂのようなＢ細胞表面マーカーに対する抗体の投与によって処置されるものと考え、これには、コンジュゲートされていない（「裸の」）抗体、または本明細書に開示される

細胞毒性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を包含する。このような疾患はまた、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体または抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲートを、同時にまたは連続して与えられる別の抗体または抗体薬物コンジュゲート、別の細胞毒性剤、放射線または他の処置と組み合わせて含んでいる併用療法によって処置されることが本明細書では考えられる。本発明の例示的な処置方法では、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、抗ＣＤ２０抗体、免疫グロブリン、またはそのＣＤ２０結合フラグメントと組み合わせて一緒にまたは連続して投与される。この抗ＣＤ２０抗体は、裸の抗体であってもよいし、または抗体薬物コンジュゲートであってもよい。併用療法の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、本発明の抗体であり、かつ抗ＣＤ２０抗体はＲｉｔｕｘａｎ（登録商標）（リツキシマブ）である。

【０１４８】

「非ホジキンリンパ腫」または「ＮＨＬ」という用語は、本明細書において用いる場合、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を意味する。一般に、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫にはこの細胞が不在であることにより区別できる。本明細書で用いる用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例としては、当該分野で公知の分類スキーム、例えばＣｏｌｏｒ Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ第３版；Ａ．Ｖｉｃｔｏｒ ＨｏｆｆｂｒａｎｄおよびＪｏｈｎ Ｅ．Ｐｅｔｔｉｔ（編）（Ｈａｒｃｏｕｒｔ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ ２０００）に記載の改訂版Ｅｕｒｏｐｅａｎ－Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｌｙｍｐｈｏｍａ（ＲＥＡＬ）スキームのように当該分野で公知の分類スキームに従って当業者（例えば、腫瘍学者または病理学者）によって認識されるあらゆるものを含む。特に図１１．５７、１１．５８および１１．５９を参照のこと。より具体的な例としては、限定するものではないが、再発性または抵抗性のＮＨＬ、前線低悪性度ＮＨＬ、第ＩＩＩ／ＩＶ期ＮＨＬ、化学療法に抵抗性のＮＨＬ、前駆体Ｂリンパ芽球性白血病および／またはリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病および／または前リンパ球性白血病および／または小リンパ球リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、免疫細胞腫および／またはリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ系質細胞性リンパ腫、周辺帯Ｂ細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯－ＭＡＬＴリンパ腫、結節周辺帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、プラズマ細胞腫および／または形質細胞骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、濾胞性中心リンパ腫（濾胞性）、中悪性度拡散性ＮＨＬ、広汎性大Ｂ細胞リンパ腫、高悪性度ＮＨＬ（高悪性度前線ＮＨＬおよび高悪性度再発性ＮＨＬを含む）、自己幹細胞移植後のまたは自己肝細胞移植に抵抗性のＮＨＬ再発、原発性縦隔大Ｂ細胞リンパ腫、原発性浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度非切断小細胞性ＮＨＬ、巨大病変ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、前駆体（周辺性）大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫および／またはセザリー症候群、皮膚（皮膚性）リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管動原体リンパ腫が挙げられる。

【０１４９】

「障害」とは、本発明の物質／分子または方法での処置から利益を受ける任意の状態である。これには、該当の障害に対して哺乳動物を罹患しやすくする病理学的状態を含む慢性および急性の障害または疾患が挙げられる。本明細書で処置されるべき障害の非限定的な例としては、癌性の状態、例えば、良性および悪性の腫瘍；白血病およびリンパ系の悪性腫瘍；神経系障害、膠細胞性障害、星状性障害、視床下部および他の腺性の障害、マクロファージ性障害、上皮性障害、間質性障害、および胚盤胞性障害；ならびに炎症性障害、免疫障害および他の血管系性関連障害が挙げられる。障害としてはさらに、癌性の状態、例えば、Ｂ細胞増殖性障害および／またはＢ細胞腫瘍、例えば、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。

【０１５０】
「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」という用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している障害を意味する。一実施形態では、細胞増殖性疾患は癌である。
【０１５１】
「腫瘍」とは、本明細書において用いる場合、悪性か良性かにかかわらず、全ての腫瘍性細胞成長および増殖、ならびに全ての前癌性および癌性の細胞および組織を意味する。
【０１５２】
「自己免疫性疾患」とは、本明細書において、個体の自己組織もしくは器官または同時分離したものから生じ、それらに対して生じる疾患または症状、あるいはその徴候または結果として生じるその状態である。これら多くの自己免疫性および炎症性障害において、多くの臨床用および研究用のマーカーが存在してもよく、これには限定するものではないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体蓄積、副腎皮質ステロイドまたは免疫抑制性治療の利益、および影響を受けた組織中のリンパ系細胞の凝集塊が挙げられる。Ｂ細胞が媒介する自己免疫性疾患に関していずれか１つの理論に限定されるものではないが、Ｂ細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状細胞およびＴ細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、および病巣への異所性新リンパ形成を含む、多くの機構的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病理学的な影響を示すと考えられる。各々のこれらの経路は、自己免疫性疾患の病状の程度の違いに関与し得る。
【０１５３】
「自己免疫性疾患」とは、臓器特異的疾患（すなわち、免疫応答が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸および肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などといった臓器系に対して特異的である）または、複数の臓器系に影響し得る全身性疾患（例えば全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、関節リウマチ、多発性筋炎など）であってもよい。好ましい前記疾患としては、自己免疫性リウマチ学的障害（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、ＳＬＥおよびループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎／皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、および乾癬関節炎など）、自己免疫性胃腸および肝臓障害（例えば、炎症性腸疾患（例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病）、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、および小児脂肪便病など）、血管炎（例えば、チャング－シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症および顕微鏡的多発血管炎を含むＡＮＣＡ陰性の血管炎およびＡＮＣＡ関連血管炎など）、自己免疫性神経学的障害（例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、および自己免疫性多発性神経炎など）、腎臓疾患（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、およびベルガー病など）、自己免疫性皮膚科障害（例えば、乾癬、じんま疹（ｕｒｔｉｃａｒｉａ）、じんま疹（ｈｉｖｅｓ）、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、および皮膚紅斑性狼瘡など）、血液系障害（例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、および自己免疫溶血性貧血など）、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患（例えば、内耳疾患および聴力障害など）、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植および自己免疫性内分泌系疾患（例えば、インスリン依存型糖尿病（ＩＤＤＭ）などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病および自己免疫性甲状腺疾患（例えばグレーブス病および甲状腺炎）など）が挙げられる。より好ましいこのような疾患としては、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、ＩＤＤＭ、悪性貧血、甲状腺炎および糸球体腎炎が挙げられる。
【０１５４】
場合によって上記のものを包含する、本明細書中で定義されるような他の自己免疫性疾患の具体的な例としては、限定されるものではないが、関節炎（急性および慢性の関節リウマチ、例として、若年発症関節リウマチ炎およびステージ、例えば、関節リウマチ関節滑膜炎、痛風または痛風性関節炎、急性の免疫学的な関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性

関節症、ＩＩ型コラーゲン誘導性の関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティル病、椎骨関節炎、骨関節炎、慢性関節炎プログレジエンテ（ｐｒｏｇｒｅｄｉｅｎｔｅ）、変形性関節炎、慢性多発性関節炎プリマリア、反応性関節炎、閉経期の関節炎、エストロゲン－枯渇関節炎、および強直性脊椎炎／リウマチ様脊椎炎）、自己免疫性リンパ系増殖性疾患、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えば、プラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬および爪乾癬、アトピー、例として、アトピー性疾患、例えば、花粉症およびジョブ症候群、皮膚炎、例として、接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、原発性刺激物接触皮膚炎、およびアトピー性皮膚炎、Ｘ連鎖過剰ＩｇＭ症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例えば、慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹、例として、慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症（全身強皮症を含む）、全身性硬化症などの硬化症、多発性硬化症（ＭＳ）、例えば、脊髄－視神経ＭＳ、原発性進行性ＭＳ（ＰＰＭＳ）、および再発性寛解型ＭＳ（ＲＲＭＳ）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、皮膚硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎（ＮＭＯ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）（例えば、クローン病、自己免疫媒介性胃腸疾患、胃腸炎症、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸炎潰瘍、顕微鏡的大腸炎、膠原性大腸炎、多発性大腸炎、壊死性全腸炎、および経壁性大腸炎、および自己免疫性炎症性腸疾患）、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例として、成人または急性の呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、髄膜炎、葡萄膜の全部または一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、移植片対宿主病、遺伝性血管性浮腫などの血管性浮腫、髄膜炎の脳神経損傷、妊娠ヘルペス、妊娠性類天疱瘡、陰嚢掻痒、自己免疫性早期卵巣機能不全、自己免疫状態による急性聴力損失、ＩｇＥ媒介性疾患、例えばアナフィラキシーおよびアレルギー性鼻炎およびアトピー性鼻炎、脳炎、例えば、ラスマッセンの脳炎および辺縁および／または脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例えば、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有するまたは有さない糸球体腎炎（ＧＮ）、例えば、慢性または急性の糸球体腎炎、例えば、原発性ＧＮ、免疫媒介性ＧＮ、膜性ＧＮ（膜性腎症）、特発性膜性ＧＮまたは特発性膜性腎症、膜または膜性増殖性ＧＮ（ＭＰＧＮ）（タイプＩおよびタイプＩＩを含む）、急速進行性ＧＮ（ＲＰＧＮ）、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、亀頭炎、例として形質細胞限局性亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、薄板状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、妊娠前角化症、膿皮症壊疽、アレルギー性状態および応答、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、まれなアレルギー性障害、例として肥満細胞症、アレルギー性応答、湿疹、例として、アレルギー性またはアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、異常発汗剤湿疹および小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息および自己免疫喘息、Ｔ細胞の浸潤を伴う状態および慢性炎症反応、妊娠中の胎児のＡＢＯ式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、ループス、例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、ジスコイドループス、および円板状エリテマトーデス、脱毛症ループス、ＳＬＥ、例えば皮膚ＳＬＥまたは亜急性の皮膚ＳＬＥ、新生児期ループス症候群（ＮＬＥ）および紅斑性狼瘡汎発、若年性開始型（Ｉ型）真正糖尿病、例として、小児ＩＤＤＭ、成人発症型真正糖尿病（ＩＩ型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性大腸炎、糖尿病性大動脈障害、サイトカインおよびＴリンパ球によって媒介される急性および遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎（例として、リウマチ性多発性筋痛および巨細胞（高安）動脈炎などの大脈管脈管炎、川崎病および結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎などの中脈管炎、免疫血管炎、ＣＮＳ血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、フィブリノイド壊死性血管炎および全身性壊死性血管炎などの壊死性

血管炎、ＡＮＣＡ陰性の血管炎、およびチャーグ－ストラウス症候群（ＣＳＳ）などのＡＮＣＡ関連の血管炎、ヴェゲナー肉芽腫、および顕微鏡的多発性血管炎）、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイアモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血または免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、悪性貧血（貧血症悪性熱）、アジソン病、純粋な赤血球貧血症または形成不全（ＰＲＣＡ）、第ＶＩＩＩ因子欠損症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症（類）、例えば、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、ＣＮＳ炎症性障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷または出血の二次症状、抗原－抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、天疱瘡または類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、瘢痕性（粘液膜）類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、新生物関連天疱瘡、落葉状天疱瘡、
類天疱瘡粘液－膜天疱瘡、および紅斑性天疱瘡、後天性表皮水疱症、眼炎症、好ましくはアレルギー性眼性炎症、例えば、アレルギー性結膜、直鎖状ＩｇＡ水疱性疾患、自己免疫誘導性結膜炎、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病または症候群、自己免疫性状態による熱性損傷、子癇前症、免疫複合体障害、例えば、免疫複合体腎炎、抗体が媒介する腎炎、神経炎症性障害、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばＩｇＭ多発性神経炎またはＩｇＭ媒介性神経障害、血小板減少（例えば心筋梗塞患者によって発症するもの）、例として、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、輸血後紫斑病（ＰＴＰ）、ヘパリン誘発性血小板減少および自己免疫性または免疫媒介性血小板減少、例えば、慢性および急性のＩＴＰを含む特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、強膜炎、例えば、特発性のセラト強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例として、甲状腺炎、例えば、自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）または亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼疾患（眼障害または甲状腺関連の眼障害）、自己免疫多腺性症候群などの多腺性症候群、例えば、タイプＩ（または、多腺性内分泌障害症候群）、腫瘍随伴症候群、例として、神経系新生物関連症候群、例えば、ランバート－イートン筋無力症症候群またはイートン－ランバート症候群、スティッフマンまたはスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例えば、アレルギー性脳脊髄炎または脳脊髄炎性アレルギーおよび実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌスまたは眼球クローヌス筋硬直症候群（ＯＭＳ）および感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫慢性活動性肝炎、間質性肺炎、例えば、リンパ系間隙間質性肺炎（ＬＩＰ）、閉塞性細気管支炎（非移植）対ＮＳＩＰ、ギラン－バレー症候群、ベルガー病（ＩｇＡ腎症）、特発性ＩｇＡ腎症、線状ＩｇＡ皮膚病、急性発熱性好中性皮膚病、角層下膿疱症、一過性棘融解皮膚病、肝硬変、例として原発性胆管萎縮症および肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアックもしくはコエリアック病、脂肪便症（グルテン腸疾患）、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、例として混合性クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症（ＡＬＳ；筋萎縮性側索硬化症（Ｌｏｕ　Ｇｅｈｒｉｇ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ））、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例えば、抵抗性または再発したもしくは再発性の多発性軟骨炎、肺胞状タンパク質症、コーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎などの角膜炎、ベル麻痺、スウィート病／症候群、自己免疫性酒さ、帯状ヘルペス関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症（これにはモノクローナルＢ細胞リンパ球増多症（例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症および未同定の有意なモノクローナルガーモパチィ（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ｇａｒｎｍｏｐａｔｈｙ　ｏｆ　ｕｎｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ）、ＭＧＵＳ）が含まれる）末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例え

ば、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺およびＣＮＳのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性または分節性または限局性分節性糸球体硬化症（ＦＳＧＳ）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例えば、自己免疫脱髄性病および慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、ＣＲＥＳＴ症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症および毛細管拡張症）、雌雄自己免疫性不妊性、例えば、抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えば、アレルギー性肺胞炎および繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例えば、リーシュマニア症、キパノソミアシス（ｋｙｐａｎｏｓｏｍｉａｓｉｓ）、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、間質性肺線維形成、繊維化縦隔炎、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎（ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉｃ　ｆａｃｉｉｔｉｓ）、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア（ｆｌａｒｉａｓｉｓ）、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性または慢性）またはＦｕｃｈの毛様体炎）、ヘーノホーシェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染、ＳＣＩＤ、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）、エコーウイルス感染、敗血症（全身性炎症反応症候群（ＳＩＲＳ））、内毒血症、膵炎、甲状腺炎、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン・バーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎（ｔｈｒｏｍｂｏａｎｇｉｔｉｓ　ｕｂｉｔｅｒａｎｓ）、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例えば、春季カタル、乾性角結膜炎および流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化腎症、良性家族性および虚血－再灌流障害、移植臓器再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道／肺性疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症障害、（大脳血管性不足）、例えば、動脈硬化脳症および動脈硬化症網膜症、アスペルミオジェネース（ａｓｐｅｒｍｉｏｇｅｎｅｓｅ）、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、らい性結節性紅斑、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性（ｓｅｎｓｏｎｅｕｒａｌ）聴力障害、血色素尿症発作（ｈａｅｍｏｇｌｏｂｉｎｕｒｉａ　ｐａｒｏｘｙｓｍａｔｉｃａ）、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、原発性特発性の粘液水腫、ネフローゼ、交感神経眼炎（交感性眼炎）、新生児眼炎、視神経炎、精巣炎肉芽腫症、膵炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、ケルヴァン（Ｑｕｅｒｖａｉｎ）甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状、白血球－粘着力欠損、サイトカインおよびＴリンパ球に媒介される急性および遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多臓器損傷症候群、抗原－抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膵島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群、例えば多腺性症候群Ｉ型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症（ＡＯＩＨ）、心筋症、例えば、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（ＥＢＡ）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨または蝶形骨副鼻腔炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症－筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギロームまたは好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清陰性脊椎関節炎疹、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラッ

トン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコットーアルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、例えば、慢性関節リウマチ、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管虚血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、および脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋または他の組織の再灌流損傷、リンパ腫気管気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性障害、眼性および眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシー、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、および子宮内膜症が挙げられる。このような疾患は、ＣＤ７９ｂなどのＢ細胞表面マーカーに結合する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されており、本明細書中で開示したような、コンジュゲートしていない（「裸の、ネイキッド」）抗体または細胞毒性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。このような疾患はまた、別の抗体もしくは抗体薬物コンジュゲート、別の細胞毒性剤、放射線または他の同時もしくは連続して施される処置と組み合わせて、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくは抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲートを含んでいる併用療法によって治療されることが、本明細書において意図される。

【０１５５】

「処置すること」または「処置」または「軽減」とは、治療的な処置と予防的または防止的な手段の両方のことをいい、その目的は、標的とする病理学的な状態または障害を予防するかまたは減速（低減）させることである。処置を必要とする者としては、すでにその障害を有する者ならびに障害を有する傾向にある者または障害を予防すべき者が挙げられる。被験体または哺乳動物は、本発明の方法に従って治療量の抗ＣＤ７９ｂ抗体を投与された後に、その患者が、以下のうち１つ以上の観察可能な減少および／もしくは測定可能な減少を示すかまたは以下の１つ以上が無くなることを示す場合に、ＣＤ７９ｂポリペプチド発現ガンに対して首尾よく「処置され」ている：癌細胞の数の減少または癌細胞がなくなること；腫瘍の大きさの減少；軟部組織および骨への癌の伝播を含む末梢器官への癌細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）；腫瘍増殖のある程度の阻害；および／または特定の癌に関連する症状の１つ以上のある程度の緩和；罹患率および死亡率の低下ならびに生活の質の問題の改善。抗ＣＤ７９ｂ抗体が、増殖を予防し得、そして／または既存の癌細胞を殺傷し得る程度に、それらは、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であり得る。これらの兆候または症状の減少はまた、患者が感じる場合もある。

【０１５６】

上記疾患における首尾よい処置および改善を評価するための上記のパラメータは、医師によく知られている慣用的な手順によって容易に測定可能である。癌治療に対して、有効性は、例えば、疾患が進行するまでの時間（ＴＴＰ）を評価することおよび／または奏功率（ＲＲ）を確認することによって、測定され得る。転移は、ステージングテストによって、および骨への伝播を測定する骨スキャンならびにカルシウムレベルおよび他の酵素についての試験によって、確認され得る。ＣＴスキャンもまた、骨盤およびその領域のリンパ節への伝播を観察するために行われ得る。胸部Ｘ線および公知の方法による肝臓酵素レベルの測定が、それぞれ肺および肝臓への転移を観察するために用いられる。この疾患をモニターするための他の慣用的な方法としては、経直腸超音波断層検査（ＴＲＵＳ）および経直腸的針生検（ＴＲＮＢ）が挙げられる。

【０１５７】

さらに局在性のガンである膀胱癌については、疾患の進行を決定するための方法としては、膀胱鏡検査による尿細胞検査、尿中の血液存在のモニタリング、超音波断層撮影または静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（ＣＴ）および磁気共鳴映像法（ＭＲＩ）による尿路上皮性路の可視化が挙げられる。遠隔転移の存在は、腹部のＣＴ、胸部Ｘ線、または骨格の放射性核種画像診断によって評価してもよい。

【０１５８】
「慢性、長期」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の、急性方式とは対照的な連続的な方式での薬剤（単数または複数）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、むしろ実際は周期的になされる処置である。
【０１５９】
「個体」とは脊椎動物である。特定の実施形態では、この脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物（ウシなど）、スポーツ用動物、愛玩動物（ネコ、イヌおよびウマ）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられる。特定の実施形態では、哺乳動物とはヒトである。
【０１６０】
癌の症状の緩和の処置を目的とする「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、これにはヒト、家畜用および農場用動物、ならびに動物園、スポーツ、またはペットの動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが挙げられる。好ましくは、この哺乳動物とはヒトである。
【０１６１】
１つ以上のさらなる治療薬「と組み合わせた」投与とは、同時（同時期）と任意の順序での連続投与を包含する。
【０１６２】
「キャリア」とは、本明細書において用いる場合、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤であって、それに対して曝露される細胞または哺乳動物に対して、使用される用量および濃度において無毒性である薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤を包含する。生理的に受容可能なキャリアは、水溶性のｐＨ緩衝溶液である場合が多い。生理的に受容可能なキャリアの例としては、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約１０残基未満の）ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー、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、アルギニンまたはリジン；単糖類、二糖類および他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む）；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；および／または非イオン性界面活性物質、例えば、ＴＷＥＥＮ（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）およびＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標））が挙げられる。
【０１６３】
「固相」または「固体支持体」とは、本発明の抗体が、接着または付着できる非水性マトリックスを意味する。本明細書中において包含される固相の例としては、ガラス（例えば、制御されたポアガラス）、多糖類（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およびシリコーンから部分的または完全に形成されたものが挙げられる。ある特定の実施形態において、その状況に応じて、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得る；他に、固相は、精製カラム（例えば、アフィニティー・クロマトグラフィ・カラム）である。この用語はまた、別々の粒子の不連続の固相、例えば、米国特許第４，２７５，１４９号に記載されている固相も包含する。
【０１６４】
「リポソーム」とは、種々のタイプの脂質、リン脂質および／またはサーファクタントから構成される小胞であり、これは、哺乳動物への薬物（例えば、ＣＤ７９ｂ抗体）の送達に有用である。リポソームの成分は、通常、生物学的膜の脂質の配列に類似した二重層を形成して配置されている。
【０１６５】
「小型、低」分子または「小型、低」有機分子とは、本明細書においては、約５００ダルトン未満の分子量を有するものと定義する。
【０１６６】

「個体」、「被験体」、または「患者」とは、脊椎動物である。特定の実施形態では、この脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物（ウシなど）、スポーツ用動物、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌおよびウマ）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられる。特定の実施形態では、哺乳動物とはヒトである。

【０１６７】

「薬学的処方物」という用語は、活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態の調製物であって、その製剤が投与される被験体に許容されない毒性の追加の成分を含有しない調製物を指す。このような処方物は無菌であり得る。

【０１６８】

「無菌」処方物とは、全ての生きている微生物およびそれらの胞子を有さず無菌である。

【０１６９】

本明細書中に開示されるような抗体の「有効量」とは、特に述べられる目的を果たすのに十分な量である。「有効量」は、経験的におよび述べられる目的に関する慣用的な方法によって決定され得る。

【０１７０】

「治療上有効な量」という用語は、被験体または哺乳動物において疾患または障害を「処置する」のに有効な抗体または他の薬物の量のことをいう。癌の場合において、薬物の治療上有効な量は、癌細胞の数を減少させることが可能で；腫瘍の大きさを減少させることが可能で；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）することが可能で；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）することが可能で；腫瘍増殖をある程度阻害することが可能で；そして／またはその癌に関連する症状の１つ以上をある程度緩和することが可能である。「処置する」についての本明細書中の定義を参照のこと。薬物が増殖を予防し得、そして／または既存の癌細胞を殺傷し得る程度に、その薬物は、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であり得る。「予防上有効な量」とは所望の予防的結果を達成するために必要な用量および時間での効果的な量を意味する。代表的にであって必ずしもというわけではないが、予防的な用量は疾患の初期段階またはそれより以前の被験体に用いるので、予防上有効な量は治療上有効な量よりも少ないであろう。

【０１７１】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の「増殖阻害量」とは、細胞、特に、腫瘍、例えば、癌細胞の増殖をインビトロまたはインビボのいずれかで阻害できる量である。抗ＣＤ７９ｂ抗体の「増殖阻害量」は、新生細胞の増殖を阻害する目的については、経験的に、そして慣用的に行われている方式で決定してもよい。

【０１７２】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の「細胞毒性量」とは、細胞、特に、腫瘍、例えば、癌細胞の破壊をインビトロまたはインビボのいずれかで引き起こすことができる量である。抗ＣＤ７９ｂ抗体の「細胞毒性量」は、新生細胞の増殖を阻害する目的について、経験的に、そして慣用的に行われている方式で決定してもよい。

【０１７３】

「ＣＤ７９ｂ発現細胞」とは、内因性のまたはトランスフェクトされたＣＤ７９ｂポリペプチドを細胞表面上または分泌型のいずれかで発現する細胞である。「ＣＤ７９ｂ発現癌」とは、細胞表面上に存在するＣＤ７９ｂポリペプチドを有する細胞、またはＣＤ７９ｂポリペプチドを産生して分泌する細胞を含む癌である。「ＣＤ７９ｂ発現癌」は必要に応じて、その細胞表面上に十分なレベルのＣＤ７９ｂポリペプチドを産生し、その結果抗ＣＤ７９ｂ抗体は、そこに結合し得、その癌に関して治療上の効果を有し得る。別の実施形態では、「ＣＤ７９ｂ発現癌」とは必要に応じて、十分なレベルのＣＤ７９ｂポリペプチドを産生しかつ分泌し、その結果抗ＣＤ７９ｂ抗体アンタゴニストは、そこに結合し得、その癌に関して治療上の効果を有する。後者に関しては、そのアンタゴニストは、腫瘍細胞による分泌されたＣＤ７９ｂポリペプチドの産生および分泌を減少、阻害または予防

するアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。ＣＤ７９ｂポリペプチドを「過剰発現する」癌とは、同じ組織タイプの癌でない細胞に比較して、その細胞表面に十分高レベルのＣＤ７９ｂポリペプチドを有するか、または産生および分泌する癌である。このような過剰発現は、遺伝子増幅によってまたは転写もしくは翻訳の増大によって生じ得る。ＣＤ７９ｂポリペプチドの過剰発現は、細胞表面上に存在するか、または細胞によって分泌されるＣＤ７９ｂタンパク質のレベルの増大を評価することによって検出または予後予測アッセイで確認され得る（例えば、ＣＤ７９ｂ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技術を用いて調製され得る単離されたＣＤ７９ｂポリペプチドに対して調製された抗ＣＤ７９ｂ抗体を用いる免疫組織化学アッセイを介して；ＦＡＣＳ分析など）。あるいは、またはさらに、ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードする核酸またはｍＲＮＡの細胞中のレベルは、例えば、ＣＤ７９ｂコード核酸またはその補体に対応する核酸ベースのプローブを用いる蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ；１９９８年１０月公開、国際公開第９８／４５４７９号を参照のこと）；サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術、例えば、リアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を介して測定してもよい。血清などの体液中の脱落抗原を、例えば抗体ベースのアッセイを用いて測定することによってＣＤ７９ｂポリペプチド過剰発現を研究することも可能である（例えば、１９９０年６月１２日発行の米国特許第４，９３３，２９４号；１９９１年４月１８日公開の国際公開第９１／０５２６４号；１９９５年３月２８日発行の米国特許第５，４０１，６３８号；ならびにＳｉａｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ１３２：７３～８０（１９９０）を参照のこと）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボのアッセイが当業者には利用可能である。例えば、検出可能な標識、例えば、放射性同位体で必要に応じて標識されている抗体に対して患者の体内で細胞を曝露することが可能であり、患者中の細胞に対する抗体の結合は、例えば、放射能について外部スキャンニングすることによって、または抗体に対して前に暴露された患者から採取された生検を分析することによって評価することが可能である。

【０１７４】

本明細書中で使用される場合、用語「イムノアドヘシン」とは、異種タンパク質の結合特異性（「アドヘシン」）と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを組み合わせた、抗体様分子を指す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位以外（すなわち、「異種」）の、所望の結合特異性を有するアミノ酸配列と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部は、代表的に、少なくともレセプターもしくはリガンドの結合部位を含んでいる、近接するアミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えば、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３もしくはＩｇＧ－４のサブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ－１およびＩｇＡ－２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭから得てもよい。

【０１７５】

本明細書中で使用される場合、「標識」という語句は、抗体に直接的もしくは間接的にコンジュゲートされて「標識された」抗体を生成する、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自身で検出され得る（例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識）か、または、酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物もしくは組成物の化学変化を触媒し得る。

【０１７６】

本明細書で用いられる「細胞毒性剤」という用語は、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、および／または細胞の破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、およびＬｕの放射性同位体）、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロランブシル、ダウノルビシンまたはその他インターカレート剤、酵素およびそのフラグメント、例えば核溶解性酵素

、抗生物質、および毒素、例えば小分子毒素、または細菌、糸状菌、植物もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素（そのフラグメントおよび／または変異体を含む）、そして下記に開示する種々の抗腫瘍または抗癌剤を含むものとする。他の細胞毒性剤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。

【０１７７】

「毒素」とは、細胞の成長または増殖に対して有害な作用を有し得る任意の物質である。

【０１７８】

「化学療法剤」は、作用機序にかかわらず、癌の処置に有用な化合物である。化学療法剤の分類としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アルキル化剤、代謝拮抗剤、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性／抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼインヒビター、抗体、光増感剤、およびキナーゼインヒビター。化学療法剤としては、「標的化療法」および従来の化学療法に用いられる化合物が挙げられる。化学療法剤の例としては以下が挙げられる：エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／ＯＳＩ　Ｐｈａｒｍ.）、ドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、５－ＦＵ（フルオロウラシル、５－フルオロウラシル、ＣＡＳ　Ｎｏ．５１－２１－８）、ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標），Ｌｉｌｌｙ）、ＰＤ－０３２５９０１（ＣＡＳ　Ｎｏ．３９１２１０－１０－９，Ｐｆｉｚｅｒ）、シスプラチン（ｃｉｓ－ジアミン、ジクロロ白金（ＩＩ）、ＣＡＳ　Ｎｏ．１５６６３－２７－１）、カルボプラチン（ＣＡＳ　Ｎｏ．４１５７５－９４－４）、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．），トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、テモゾラミド（４－メチル－５－オキソ－２，３，４，６，８－ペンタアザビシクロ［４．３．０］ノナ－２，７，９－トリエン－９－カルボキサミド、ＣＡＳ　Ｎｏ．８５６２２－９３－１、ＴＥＭＯＤＡＲ（登録商標）、ＴＥＭＯＤＡＬ（登録商標）、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　Ｐｌｏｕｇｈ）、タモキシフェン（（Ｚ）－２－［４－（１，２－ジフェニルブタ－１－エニル）フェノキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－エタンアミン、ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）、ＩＳＴＵＢＡＬ（登録商標）、ＶＡＬＯＤＥＸ（登録商標））、およびドキソルビシン（ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標））、Ａｋｔ－１／２，ＨＰＰＤ、およびラパマイシン。

【０１７９】

化学療法剤のさらなる例としては以下が挙げられる：オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（登録商標）、Ｓａｎｏｆｉ）、ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ（登録商標）、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍ.）、ステント（ｓｕｔｅｎｔ）（ＳＵＮＩＴＩＮＩＢ（登録商標）、ＳＵ１１２４８，Ｐｆｉｚｅｒ）、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（登録商標），Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、イマチニブメシレート（ＧＬＥＥＶＥＣ（登録商標），Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＸＬ－５１８（Ｍｅｋインヒビター，Ｅｘｅｌｉｘｉｓ，国際公開第２００７／０４４５１５号）、ＡＲＲＹ－８８６（Ｍｅｋインヒビター、ＡＺＤ６２４４，Ａｒｒａｙ　ＢｉｏＰｈａｒｍａ，Ａｓｔｒａ　Ｚｅｎｅｃａ）、ＳＦ－１１２６（ＰＩ３Ｋインヒビター、Ｓｅｍａｆｏｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＢＥＺ－２３５（ＰＩ３Ｋインヒビター、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＸＬ－１４７（ＰＩ３Ｋインヒビター、Ｅｘｅｌｉｘｉｓ）、ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、フルベストラント（ＦＡＳＬＯＤＥＸ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ロイコボリン（フォリン酸）、ラパマイシン（シロリムス，ＲＡＰＡＭＵＮＥ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）、ラパチニブ（ＴＹＫＥＲＢ（登録商標）、ＧＳＫ５７２０１６，Ｇｌａｘｏ　Ｓｍｉｔｈ　Ｋｌｉｎｅ）、ロナファルニブ（ＳＡＲＡＳＡＲ（商標），ＳＣＨ　６６３３６，Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　Ｐｌｏｕｇｈ）、ソラフェニブ（ＮＥＸＡＶＡＲ（登録商標）、ＢＡＹ４３－９００６，Ｂａｙｅｒ　Ｌａｂｓ）、ゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、イリノテカン（ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標）、ＣＰＴ－１１，Ｐｆｉｚｅｒ）、ティピファルニブ（ｔｉｐｉｆａｒｎｉｂ）（ＺＡＲＮＥＳ

ＴＲＡ（商標），Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎ）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（商標）（Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ非含有）、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方物（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐａｒｔｎｅｒｓ，Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ，Ｉｌ）、バンデタニブ（ｒＩＮＮ，ＺＤ６４７４，ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、クロラムブシル，ＡＧ１４７８，ＡＧ１５７１（ＳＵ５２７１；Ｓｕｇｅｎ）、テムシロリムス（ＴＯＲＩＳＥＬ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）、パゾパニブ（ｐａｚｏｐａｎｉｂ）（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）、カンホスファミド（ｃａｎｆｏｓｆａｍｉｄｅ）（ＴＥＬＣＹＴＡ（登録商標）、Ｔｅｌｉｋ）、チオテパおよびシクロフォスファミド（ｃｙｃｌｏｓｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）（ＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）、ＮＥＯＳＡＲ（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、イムプロスルファンおよびピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ（ｍｅｔｕｒｅｄｏｐａ）、およびウレドーパ（ｕｒｅｄｏｐａ）；エチレンイミンおよびメチルアメラミン、例として、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロメラミン；アセトゲニン（ａｃｅｔｏｇｅｎｉｎ）（特に、ブラタシン（ｂｕｌｌａｔａｃｉｎ）およびブラタシノン（ｂｕｌｌａｔａｃｉｎｏｎｅ））；カンプトテシン（例として、合成アナログのトポテカン）；ブリオスタチン（ｂｒｙｏｓｔａｔｉｎ）；カリスタチン（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ）；ＣＣ－１０６５（例として、そのアドゼレシン（ａｄｏｚｅｌｅｓｉｎ）、カルゼレシン（ｃａｒｚｅｌｅｓｉｎ）およびビゼレシン（ｂｉｚｅｌｅｓｉｎ）合成アナログ）；クリプトフィシン（ｃｒｙｐｔｏｐｈｙｃｉｎ）（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン（ｄｏｌａｓｔａｔｉｎ）；デュオカルマイシン（ｄｕｏｃａｒｍｙｃｉｎ）（例として、合成アナログのＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１）；エレウセロビン（ｅｌｅｕｔｈｅｒｏｂｉｎ）；パンクラチスタチン（ｐａｎｃｒａｔｉｓｔａｔｉｎ）；サルコジクチイン（ｓａｒｃｏｄｉｃｔｙｉｎ）；スポンジスタチン（ｓｐｏｎｇｉｓｔａｔｉｎ）；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン（ｎｏｖｅｍｂｉｃｈｉｎ）、フェネステリン（ｐｈｅｎｅｓｔｅｒｉｎｅ）、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（ｒａｎｉｍｎｕｓｔｉｎｅ）；抗生物質（例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ）、カリケアマイシンγ１Ｉおよびカリケアマイシンω Ｉ１（Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．（１９９４）３３：１８３～１８６））；ディネマイシン（ｄｙｎｅｍｉｃｉｎ）ディネマイシンＡ；ビスホスホネート（例えば、クロドロネート）；エスペラマイシン（ｅｓｐｅｒａｍｉｃｉｎ）；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（ａｕｔｈｒａｍｙｃｉｎ）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）、カルミノマイシン（ｃａｒｍｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カルチノフィリン、クロモマイシン（ｃｈｒｏｍｏｍｙｃｉｎｉｓ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシン）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン（ｍａｒｃｅｌｌｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシン（例えば、マイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、プロマイシン、ケラマイシン（ｑｕｅｌａｍｙｃｉｎ）、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン（ｔｕｂｅｒｃｉｄｉｎ）、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸アナログ（例えば、デノプテリン（ｄｅｎｏｐｔｅｒｉｎ）、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート）；プリンア

ナログ、例えば、フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤（ａｎｔｉ－ａｄｒｅｎａｌ）例えば、アミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、葉酸；アセグラトン；アルドホスファミド（ａｌｄｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）グリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル（ｅｎｉｌｕｒａｃｉｌ）；アムサクリン；ベストラブシル（ｂｅｓｔｒａｂｕｃｉｌ）；ビサントレン；エダトレキサート（ｅｄａｔｒａｘａｔｅ）；デフォファミン（ｄｅｆｏｆａｍｉｎｅ）；デメコルチン；ジアジコン（ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ）；エルフオルニチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン（ｅｐｏｔｈｉｌｏｎｅ）；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）；メイタンシノイド（ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄ）（例えば、マイタンシン（ｍａｙｔａｎｓｉｎｅ）およびアンサミトシン（ａｎｓａｍｉｔｏｃｉｎ））；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール（ｍｏｐｉｄａｎｍｏｌ）；ニトラエリン（ｎｉｔｒａｅｒｉｎｅ）；ペントスタチン；フェナメト（ｐｈｅｎａｍｅｔ）；ピラルビシン；ロソキサントロン（ｌｏｓｏｘａｎｔｒｏｎｅ）；ポドフィリン酸（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）；２－エチルヒドラジン；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖類複合体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）；ラゾキサン；リゾキシン（ｒｈｉｚｏｘｉｎ）；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（ｔｒｉｃｈｏｔｈｅｃｅｎｅ）（特に、Ｔ－２毒素、ベラクリンＡ（ベラクリンＡ）、ロリジンＡ（ｒｏｒｉｄｉｎ　Ａ）およびアングイジン（ａｎｇｕｉｄｉｎｅ））；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロホスファミド；チオテパ；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））；イバンドロネート（ｉｂａｎｄｒｏｎａｔｅ）；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼインヒビターＲＦＳ　２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド（例えば、レチン酸）；ならびに任意の上記の薬学的に受容可能な塩、酸および誘導体。

【０１８０】

「化学療法剤」の定義に含まれるものとしては、以下もある：（ｉ）腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように働く抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプターモジュレーター（ＳＥＲＭ）、例として、例えば、タモキシフェン（例として、ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）；クエン酸タモキシフェン）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン（ｄｒｏｌｏｘｉｆｅｎｅ）、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン（ｔｒｉｏｘｉｆｅｎｅ）、ケオキシフェン（ｋｅｏｘｉｆｅｎｅ）、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン（ｏｎａｐｒｉｓｔｏｎｅ）、およびＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）（クエン酸トレミフェン（ｔｏｒｅｍｉｆｉｎｅ　ｃｉｔｒａｔｅ））；（ｉｉ）副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素であるアロマターゼを阻害する、アロマターゼインヒビター、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）（酢酸メゲストロール）、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）（エキセメスタン；Ｐｆｉｚｅｒ）、フォルメスタニー（ｆｏｒｍｅｓｔａｎｉｅ）、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）（ボロゾール（ｖｏｒｏｚｏｌｅ））、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）（レトロゾール；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、およびＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）（アナストロゾール；ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）など；（ｉｉｉ）抗男性ホル

モン、例えば、フルタミド、ニルタミド（ｎｉｌｕｔａｍｉｄｅ）、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびにトロキサシタビン（ｔｒｏｘａｃｉｔａｂｉｎｅ）（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；（ｉｖ）プロテインキナーゼインヒビター、例えば、ＭＥＫインヒビター（国際公開２００７／０４４５１５号）；（ｖ）脂質キナーゼインヒビター；（ｖｉ）アンチセンスオリゴヌクレオチド（特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するものであり、例えば、ＰＫＣ－α、ＲａｆおよびＨ－Ｒａｓ（例えば、オブリメルセン（ｏｂｌｉｍｅｒｓｅｎ）（ＧＥＮＡＳＥＮＳＥ（登録商標），Ｇｅｎｔａ Ｉｎｃ．））；（ｖｉｉ）リボザイム、例えば、ＶＥＧＦ発現インヒビター（例えば、ＡＮＧＩＯＺＹＭＥ（登録商標））およびＨＥＲ２発現インヒビター；（ｖｉｉｉ）ワクチン（例えば、遺伝子治療ワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）、およびＶＡＸＩＤ（登録商標）；ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）ｒＩＬ－２；トポイソメラーゼ１インヒビター、例えば、ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；（ｉｘ）抗脈管形成剤、例えば、ベバシツマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標），Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；ならびに任意の上記の薬学的に受容可能な塩、酸および誘導体。

【０１８１】

「化学療法剤」の定義に含まれるものはまた、治療用抗体、例えば、アレツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（Ｃａｍｐａｔｈ）、ベザシツマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ（登録商標）、Ｉｍｃｌｏｎｅ）；パニツムマブ（ＶＥＣＴＩＢＩＸ（登録商標）、Ａｍｇｅｎ）、リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｂｉｏｇｅｎ Ｉｄｅｃ）、ペルツズマブ（ＯＭＮＩＴＡＲＧ（商標）、２Ｃ４，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、トシツズマブ（Ｂｅｘｘａｒ，Ｃｏｒｉｘｉａ）、および抗体薬物コンジュゲート、ゲムツズマブオゾガマイシ（ＭＹＬＯＴＡＲＧ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）である。

【０１８２】

「増殖阻害剤」とは、本明細書において用いる場合、細胞、特にＣＤ７９ｂを発現するガン細胞の成長をインビトロまたはインビボのいずれかで阻害する化合物または組成物を意味する。従って、増殖阻害剤とは、Ｓ期でＣＤ７９ｂを発現する細胞の割合を有意に減少させるものであってもよい。増殖阻害剤の例としては、細胞周期の進行を（Ｓ期以外の位置で）ブロックする薬剤、例えばＧ１停止またはＭ期停止を誘発する薬剤が挙げられる。古典的なＭ期ブロッカーとしては、ビンカ類（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン類、およびトポイソメラーゼＩＩ阻害剤類、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンが挙げられる。またＧ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ期停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、およびアラ－Ｃである。さらなる情報は、Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，ＭｅｎｄｅｌｓｏｈｎおよびＩｓｒａｅｌ，編，第１章，表題「Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ｏｎｃｏｇｅｎｅ，ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ」，Ｍｕｒａｋａｍｉら，（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ： Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９５）、特に１３頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ）は、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの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する。

【０１８３】

「ドキソルビシン」は、アントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの全化学名は、（８Ｓ－シス）－１０－［（３－アミノ－２，３，６－トリデオキシ－α－Ｌ－リキソ－ヘキサピラニシル）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。

【０１８４】

用語の「サイトカイン」は、細胞間伝達物質として別の細胞に作用する１つの細胞集団により放出されるタンパク質に関する一般名である。このようなサイトカイン類の例は、リンホカイン類、モノカイン類、および伝統的ポリペプチドホルモン類である。サイトカイン類の中に含まれるのは、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、およびウシ成長ホルモン；上皮小体ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン類、例えば、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、および黄体化ホルモン（ＬＨ）；肝成長因子；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子－αおよび－β；ミュラー抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポイエチン（ＴＰＯ）；ＮＧＦ－βなどの神経成長因子；血小板成長因子；ＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－βなどの形質転換成長因子（ＴＧＦ）；インスリン様成長因子－Ｉおよび－ＩＩ；エリトロポイエチン（ＥＰＯ）；造骨誘導因子；インターフェロン類、例えば、インターフェロン－α、－β、および－γ；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、マクロファージ－ＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）；顆粒細胞－マクロファージ－ＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）；および顆粒細胞－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）；インターロイキン（ＩＬ）類、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－αまたはＴＮＦ－β；ならびにＬＩＦおよびキットリガンド（ＫＬ）を含む他のポリペプチド因子である。本明細書に用いる場合、サイトカインという用語は、天然源または組換え細胞培養および天然の配列のサイトカイン類の生物活性等価体由来のタンパク質を包含する。

【０１８５】

「添付文書」という用語を用いて、このような治療用製品の使用に関する、適応症、使用法、投与量、投与法、禁忌および／または警告についての情報を含む治療用製品の商業包装に習慣的に含まれる説明書を指す。

【０１８６】

「細胞内代謝物」という用語は、抗体－抗原コンジュゲート（ＡＤＣ）上の細胞内部で代謝プロセスまたは反応から生じている化合物に関する。代謝プロセスまたは反応はＡＤＣのペプチドリンカーのタンパク質切断、またはヒドラゾン、エステルもしくはアミドなどの官能基の加水分解といった酵素的な過程であってもよい。細胞内代謝物としては、限定するものではないが、細胞内への進入、拡散、取り込みまたは輸送後に細胞内切断が行われた抗体および遊離の薬物が挙げられる。

【０１８７】

「細胞内で切断される」および「細胞内切断」という用語は、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）に対する細胞内の代謝プロセスまたは反応であって、これによって薬物部分（Ｄ）と抗体（Ａｂ）間の共有結合、すなわちリンカーが壊れ、その結果、細胞内の抗体から遊離の薬物が解離される代謝プロセスまたは反応を指す。従って、ＡＤＣの切断された成分は細胞内代謝物である。

【０１８８】

「生物学的利用性、バイオアベイラビリティ」という用語は、患者に投与される薬物の所定の量の全身有効性（すなわち、血液／血漿濃度）を指す。生物学的利用性（バイオアベイラビリティ）は、投与された剤形から全身循環に達する薬物の時間（速度）と総量（程度）の両方の測定値を示す絶対的な用語である。

【０１８９】

「細胞傷害活性」という用語は、ＡＤＣまたはＡＤＣの細胞内代謝物の細胞殺傷効果、細胞増殖抑制効果または増殖阻害効果を指す。細胞傷害活性は、細胞の半分が生残する単位容量あたりの濃度（モルまたは質量）であるＩＣ$_{50}$値として表されてもよい。

【０１９０】

「アルキル」という用語は、本明細書中で使用される場合、１個～１２個の炭素原子（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$）の、飽和した直鎖もしくは分枝鎖の一価炭化水素基を指しており、このアルキル基は必要に応じ、下に記載される１つ以上の置換基で独立して置換されてもよい。別の実施形態では、アルキルラジカルは、１～８個の炭素原子（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$）、または１～６個の炭素原子（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）である。アルキル基の例としては、限定するものではないが、メチル（Ｍｅ、－ＣＨ$_{3}$）、エチル（Ｅｔ、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、１－プロピル（ｎ－Ｐｒ、ｎ－プロピル、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、２－プロピル（ｉ－Ｐｒ、ｉ－プロピル、－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、１－ブチル（ｎ－Ｂｕ、ｎ－ブチル、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、２－メチル－１－プロピル（ｉ－Ｂｕ、ｉ－ブチル、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、２－ブチル（ｓ－Ｂｕ、ｓ－ブチル、－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、２－メチル－２－プロピル（ｔ－Ｂｕ、ｔ－ブチル、－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$）、１－ペンチル（ｎ－ペンチル、－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、３－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、２－メチル－２－ブチル（－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、３－メチル－２－ブチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、３－メチル－１－ブチル（－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、２－メチル－１－ブチル（－ＣＨ$_{2}$ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、１－ヘキシル（－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、２－ヘキシル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、３－ヘキシル（－ＣＨ（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$））、２－メチル－２－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、３－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）、４－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）ＣＨ$_{2}$ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、３－メチル－３－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、２－メチル－３－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、２，３－ジメチル－２－ブチル（－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$）、３，３－ジメチル－２－ブチル（－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、１－ヘプチル、１－オクチルなどが挙げられる。

【０１９１】

用語「アルケニル」とは、少なくとも１つの不飽和部位すなわち、炭素－炭素のｓｐ^{2}二重結合を有する、２個～８個の炭素原子（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{8}$）の、直鎖もしくは分枝鎖の一価炭化水素基を指しており、ここでアルケニル基は必要に応じて、本明細書に記載される１つ以上の置換基で独立して置換されてもよく、これには、「シス」配向および「トランス」配向、あるいは「Ｅ」配向および「Ｚ」配向を有する基が挙げられる。例としては、限定するものではないが、エチレニルまたはビニル（－ＣＨ＝ＣＨ$_{2}$）、アリル（－ＣＨ$_{2}$ＣＨ＝ＣＨ$_{2}$）などが挙げられる。

【０１９２】

「アルキニル」という用語は、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち、炭素間のｓｐ三重結合を有する、２個～８個の炭素原子（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{8}$）の直鎖もしくは分枝鎖の一価炭化水素基を指しており、ここでこのアルケニル基は必要に応じて、本明細書に記載される１つ以上の置換基で独立して置換されてもよい。例としては、限定するものではないが、エチニル（－Ｃ≡ＣＨ）、プロピニル（プロパルギル、－ＣＨ$_{2}$Ｃ≡ＣＨ）などが挙げられる。

【０１９３】

「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式環」および「シクロアルキル」という用語は、単環式環としては３個～１２個の炭素原子（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{12}$）、または二環式環としては７個～１２個の炭素原子を有する、一価の非芳香族の飽和または部分不飽和環をいう。７個～１２個の原子を有する二環式炭素環は、例えば、ビシクロ［４，５］系、ビシクロ［５，５］系、ビシクロ［５，６］系またはビシクロ［６，６］系として配置されても

よく、そして９個または１０個の環原子を有する二環式炭素環は、ビシクロ［５，６］系またはビシクロ［６，６］系として、あるいは橋架系（例えば、ビシクロ［２．２．１］ヘプタン、ビシクロ［２．２．２］オクタンおよびビシクロ［３．２．２］ノナン）として配置されてもよい。単環式炭素環の例としては限定するものではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペンター１－エニル、１－シクロペンター２－エニル、１－シクロペンター３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキサー１－エニル、１－シクロヘキサー２－エニル、１－シクロヘキサー３－エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、シクロドデシルなどが挙げられる。

【０１９４】

「アリール」とは、親芳香族環系の１個の炭素原子から１個の水素原子を除去することにより誘導される、６個～２０個の炭素原子（C_6－C_{20}）の一価の芳香族炭化水素基を意味する。いくつかのアリール基は、例示的な構造において、「Ａｒ」と表わされる。アリールは、飽和環、部分不飽和環、または芳香族の炭素環式環に縮合した芳香族環を含む、二環式の基を含む。代表的なアリール基としては、限定するものではないが、ベンゼン（フェニル）、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、１，２－ジヒドロナフタレン、１，２，３，４－テトラヒドロナフチルなどから誘導される基が挙げられる。アリール基は本明細書に記載される１つ以上の置換基で必要に応じて独立して置換される。

【０１９５】

「複素環」、「ヘテロシクリル」および「複素環式環」という用語は、本明細書中で交換可能に用いられ、そして飽和または部分不飽和（すなわち、環内に１つ以上の二重結合および／または三重結合を有する）の、３個～２０個の環原子（このうちの少なくとも１つの環原子は、窒素、酸素およびイオウから選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子は、Ｃであり、１つ以上の環原子は、以下に記載される１つ以上の置換基で必要に応じて独立して置換されている）の炭素環式基を指す。複素環は、３個～７個の環員（２個～６個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、Ｐ、およびＳから選択される１個～４個のヘテロ原子）を有する単環であっても、または７個～１０個の環員（４個～９個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、Ｐ、およびＳから選択される１個～６個のヘテロ原子）を有する二環（例えば、ビシクロ［４，５］系、ビシクロ［５，５］系、ビシクロ［５，６］系、またはビシクロ［６，６］系）であってもよい。複素環は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ，Ｌｅｏ Ａ．；「Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」（Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６８）（特に、第１章、第３章、第４章、第６章、第７章、および第９章）；「Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ」（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９５０年～現在）（特に、第１３巻、第１４巻、第１６巻、第１９巻、および第２８巻）；ならびにＪ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９６０）８２：５５６６に記載されている。「ヘテロシクリル」はまた、複素環基が、飽和環、部分不飽和環、または芳香族の炭素環式環または複素環式環に縮合している基を含む。複素環式環の例としては、限定するものではないが、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、２－ピロリニル、３－ピロリニル、インドリニル、２Ｈ－ピラニル、４Ｈ－ピラニル、ジオキサニル、１，３－ジオキソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニルイミダゾリニル、イミダゾリジニル、３－アザビシクロ［３．１．０］ヘキサニル、３－アザビシクロ［４．１．０］ヘプタニル、アザビシクロ［２．２．２］ヘキサニル、３Ｈ－インドリルキノリジニルおよびＮ－ピリジルウレア類が挙げら

れる。スピロ部分もまた、この定義の範囲内に含まれる。２個の環炭素原子がオキソ（＝Ｏ）部分で置換されている複素環式基の例は、ピリミジノニルおよび１，１－ジオキソ－チオモルホリニルである。本明細書における複素環式基は必要に応じて、本明細書に記載される１つ以上の置換基で独立して置換される。

【０１９６】

「ヘテロアリール」という用語は、５員環、６員環または７員環の一価の芳香族基を指しており、そして５～２０個の原子（窒素、酸素、およびイオウから独立して選択される１個以上のヘテロ原子を含む）の縮合環系（これらの環のうちの少なくとも１つが芳香族である）を含む。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル（例えば、２－ヒドロキシピリジニルが挙げられる）、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル（例えば、４－ヒドロキシピリミジニルが挙げられる）、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、チアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、およびフロピリジニルである。ヘテロアリール基は必要に応じて本明細書に記載される１つ以上の置換基で独立して置換される。

【０１９７】

複素環基またはヘテロアリール基は、可能である場合、炭素で結合（炭素結合）されても窒素で結合（窒素結合）されてもよい。例えば、限定ではないが、炭素結合した複素環またはヘテロアリールは、ピリジンの２位、３位、４位、５位、または６位、ピリダジンの３位、４位、５位、または６、ピリミジンの２位、４位、５位、または６、ピラジンの２位、３位、５位、または６位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールまたはテトラヒドロピロールの２位、３位、４位、または５位、オキサゾール、イミダゾールまたはチアゾールの２位、４位、または５位、イソオキサゾール、ピラゾール、またはイソチアゾールの３位、４位、または５位、アジリジンの２位または３位、アゼチジンの２位、３位、または４位、キノリンの２位、３位、４位、５位、６位、７位、または８位、あるいはイソキノリンの１位、３位、４位、５位、６位、７位、または８位で結合される。

【０１９８】

例としてであって限定ではないが、窒素結合した複素環またはヘテロアリールは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾールの１位、イソインドールまたはイソインドリンの２位、モルホリンの４位、およびカルバゾールまたはβ－カルボリンの９位で結合される。

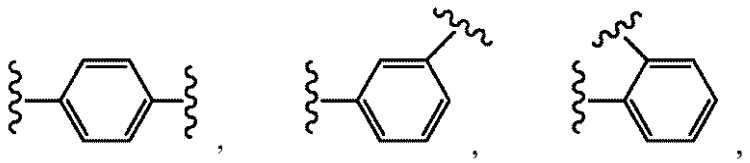
【０１９９】

「アルキレン」とは、１～１８の炭素原子であって、親のアルカンと同じまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子を取り除くことによって誘導される２つの一価のラジカルセンターを有する、飽和した、分岐鎖または直鎖または環式の炭化水素基を指す。代表的なアルキレン基としては、限定するものではないが、メチレン（－CH_2－）１，２－エチル（－CH_2CH_2－）、１，３－プロピル（－$CH_2CH_2CH_2$－）、１，４－ブチル（－$CH_2CH_2CH_2CH_2$－）などが挙げられる。

【０２００】

「C_1－C_{10}アルキレン」とは、式－（CH_2）$_{1-10}$－の直鎖の飽和した炭化水素基である。C_1－C_{10}アルキレンの例としては、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、およびデカレンが挙げられる。

【０２０１】
「アルケニレン」とは、２～１８の炭素原子であって、親のアルケンと同じまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子を取り除くことによって誘導される２つの一価のラジカルセンターを有する、不飽和の、分岐鎖または直鎖または環式の炭化水素基を指す。代表的なアルケニレン基としては、限定するものではないが、１，２－エチレン（－ＣＨ＝ＣＨ－）が挙げられる。
【０２０２】
「アルキニレン」とは、２～１８の炭素原子であって、親のアルキンと同じまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子を取り除くことによって誘導される２つの一価のラジカルセンターを有する、不飽和の、分岐鎖または直鎖または環式の炭化水素基を指す。代表的なアルキニレン基としては、限定するものではないが、アセチレン（－Ｃ≡Ｃ－）、プロパルギル（－ＣＨ$_2$Ｃ≡Ｃ－）、および４－ペンチニル（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ≡Ｃ－）が挙げられる。
【０２０３】
「アリーレン」とは２つの共有結合を有しており、以下の構造：
【０２０４】
【化１】



で示すようなオルト、メタまたはパラの立体配置であってもよいアリール基であって、ここで、フェニル基は置換されていなくてもよいし、限定するものではないが、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）$_2$－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、－ハロゲン、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$、および－ＣＮを含む最大４つの基にて置換されてもよく、それぞれのＲ’は、Ｈ、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキルおよびアリールから独立して選択される。
【０２０５】
「アリールアルキル」とは、炭素原子、代表的には末端またはｓｐ^{3}炭素原子に結合した水素原子のうちの１つがアリール基で置換されている非環式アルキル基を指す。代表的なアリールアルキル基としては、限定するものではないが、ベンジル、２－フェニルエタン－１－イル、２－フェニルエテン－１－イル、ナフチルメチル、２－ナフチルエタン－１－イル、２－ナフチルエテン－１－イル、ナフトベンジル、２－ナフトフェニルエタン－１－イルなどが挙げられる。アリールアルキル基は６～２０の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含む、アリールアルキル基のアルキル部分は１～６の炭素原子であり、アリール部分は５～１４の炭素原子である。
【０２０６】
「ヘテロアリールアルキル」とは、炭素原子、代表的には末端またはｓｐ^{3}炭素原子に結合した水素原子のうちの１つがヘテロアリール基で置換されている非環式アルキル基を指す。代表的なヘテロアリールアルキル基としては、限定するものではないが、２－ベンズイミダゾリルメチル、２－フリルエチルなどが挙げられる。ヘテロアリールアルキル基は６～２０の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含む、ヘテロアリールアルキル基のアルキル部分は１～６の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は５～１４の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３のヘテロ原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は３～７員環を有するモノシクロ（２～６の炭素原子）または７～１０員環を有するビシクロ（４～９の炭素原子

ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３のヘテロ原子）、例えばビシクロ［４，５］系、［５，５］系、［５，６］系、または［６，６］系であってもよい。

【０２０７】

本出願で用いられる「プロドラッグ」という用語は、親の化合物または薬物に比較して細胞に対する細胞傷害性が低い場合もあり、酵素的にもしくは加水分解的に活性化されるか、またはより活性な親型に変換され得る、本発明の化合物の前駆体または誘導体型を意味する。例えば、Ｗｉｌｍａｎ，「Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ」，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ，１４，：３７５～３８２頁，第６１５回 Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｂｅｌｆａｓｔ（１９８６）、およびＳｔｅｌｌａら、「Ｐｒｏｄｒｕｇｓ：Ａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｂｏｒｃｈａｒｄｔら、（編）、２４７～２６７頁，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（１９８５）を参照のこと。本発明のプロドラッグとしては、限定するものではないが、リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Ｄ－アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、β－ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬物に変換され得る５－フルオロシトシンおよび他の５－フルオロウリジンプロドラッグが挙げられる。本発明での使用のためのプロドラッグ型に誘導体化可能な細胞毒性剤の例としては、限定するものではないが、本発明の化合物、および上記のような化学療法剤が挙げられる。

【０２０８】

「代謝物」とは、特定の化合物またはその塩の体内における代謝を通じて産生される産物である。化合物の代謝物は、当該分野において公知の慣用的な技術を用いて特定され、その活性は、本明細書に記載されたような試験法を用いて測定される。そのような生成物は、例えば、投与される化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、脱アミノ化、エステル化、脱エステル化、酵素的切断などで生じ得る。従って、本発明は、本発明の化合物の代謝物を包含し、本発明の化合物を、それらの代謝生成物を得るのに充分な時間、哺乳動物と接触させる工程を包含するプロセスにより産生される化合物を包含する。

【０２０９】

「リポソーム」とは、種々の型の脂質、リン脂質および／またはサーファクタントからなる小胞であり、哺乳動物への薬物の送達に有用である。リポソームの成分は、通常は生物学的な膜の脂質配列に類似する二層形式に配列される。

【０２１０】

「リンカー」とは、共有結合を含む化学的な部分、または薬物部分に抗体を共有結合させる原子の鎖を指す。種々の実施形態では、リンカーとしては、二価の基、例えば、アルキルジイル、アリールジイル、ヘテロアリールジイル、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えばポリエチレンアミノ、Ｊｅｆｆａｍｉｎｅ（商標））の反復ユニットである－（CR_2）$_n$Ｏ（CR_2）$_n$－などの部分；ならびに、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネートおよびカプロアミドを含む二酸エステルおよびアミドが含まれる。

【０２１１】

「キラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができない特性を有する分子を指し、一方、「アキラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができる分子を指す。

【０２１２】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構造を有するが、空間の原子または基の配列に関しては異なる化合物を指す。

【０２１３】

「ジアステレオマー」とは、キラリティの２つ以上の中心を有し、その分子が互いの鏡

像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的性質、例えば融点、沸点、分光特性および反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動およびクロマトグラフィなどの高分解能解析手順により分離され得る。

【０２１４】

「鏡像異性体」とは、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の２つの立体異性体を指す。

【０２１５】

本明細書中で使用される立体化学的な定義および慣例は、一般に、Ｓ．Ｐ．Ｐａｒｋｅｒ編、ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｒｍｓ（１９８４）ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｂｏｏｋ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ならびにＥｌｉｅｌ、Ｅ．およびＷｉｌｅｎ、Ｓ．、「Ｓｔｅｒｅｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ」 Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９４に従う。多くの有機化合物は、光学的に活性な型で存在し、すなわち、これらは、平面偏光面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物の説明では、接頭辞ＤおよびＬ、またはＲおよびＳを用いて、そのキラル中心（単数または複数）についての分子の絶対配置を示す。接頭辞ｄおよびｌまたは（＋）および（－）を使用して、その化合物による平面偏光の回転の徴候を示し、（－）またはｌは、その化合物が左旋性であることを意味する。（＋）またはｄの接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所定の化学構造について、これらの立体異性体は、これらが互いに鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体を、エナンチオマーということもでき、このような異性体の混合物は、しばしば、エナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの５０：５０混合物を、ラセミ混合物またはラセミ体といい、これは、化学反応または化学的過程において立体選択または立体特異性がない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」および「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く２つのエナンチオマー種の等モル混合物を指す。

【０２１６】

「互変異性体」または「互変異性形態」という語は、低エネルギー障壁を介して相互転換可能な異なるエネルギーの構造異性体をいう。例えば、プロトン互変異性体（プロトトロピー互変異性体としても公知）としては、プロトンの移動による相互変換、例えば、ケト－エノールおよびイミン－エナミン異性化が挙げられる。原子価互変異性体としては、いくつかの結合電子の再編成による相互変換が挙げられる。

【０２１７】

「薬学的に受容可能な塩」という語句は、本明細書において用いる場合、本発明の化合物の薬学的に受容可能な有機塩または無機塩を指す。例示的な塩としては、限定するものではないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシル酸塩」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩（すなわち、１，１’メチレン－ビス－（２－ヒドロキシ－３－ナフトエ酸塩））が挙げられる。薬学的に受容可能な塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン、または他の対イオンなどの別の分子の含有を含んでもよい。対イオンは、親化合物の電荷を安定化する任意の有機部分または無機部分であってもよい。さらに、薬学的に受容可能な塩は、その構造中に２個以上の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に受容可能な塩の一部である例は、複数の対イオンを有してもよい。従って、薬学的に受容可能な塩は、２個以上の荷電原子および／または１つ以上の対イオンを有してもよい。

【０２１８】

本発明の化合物が塩基の場合、所望される薬学的に受容可能な塩は、例えば、塩酸、臭

化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸などの無機酸、あるいは酢酸、トリフルオロ酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ピルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシジル酸（グルクロン酸またはガラクツロン酸など）、αヒドロキシ酸（クエン酸または酒石酸など）、アミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）、芳香族酸（安息香酸または桂皮酸など）、スルホン酸（ｐ－トルエンスルホン酸またはエタンスルホン酸など）などの有機酸などで遊離塩基を処理することにより、当該分野において利用可能な適切な任意の方法により調製され得る。

【０２１９】

本発明の化合物が酸の場合、薬学的に受容可能な望ましい塩は、例えば、遊離の酸を、アミン（１級、２級または３級）、アルカリ金属水酸化物またはアルカリ土類金属水酸化物などの無機または有機の塩基で処理することにより、適切な任意の方法により調製され得る。適する塩の実例としては、限定するものではないが、グリシンおよびアルギニンなどのアミノ酸、アンモニア、１級、２級、および３級アミン、ならびにピペリジン、モルホリンおよびピペラジンなどの環状アミンから誘導される有機塩、ならびにナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウムおよびリチウムから誘導される無機塩が挙げられる。

【０２２０】

「薬学的に受容可能な」という語句は、その物質または組成物が、処方物に含まれる他の成分および／またはそれにより治療される哺乳動物と化学的および／または毒性学的に適合しなければならないことを示す。

【０２２１】

「溶媒和化合物」とは、１以上の溶媒分子と本発明の化合物との会合または複合体を意味する。溶媒和物を形成する溶媒の例としては、限定するものではないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、酢酸、およびエタノールアミンが挙げられる。「水和物」という用語は、溶媒分子が水である複合体を言う。

【０２２２】

「保護基」という用語は、化合物上の他の官能基と反応する間、特定の官能性をブロックまたは保護するために通常使用される置換基をいう。例えば、「アミノ保護基」とは、アミノ基と結合して化合物中のアミノ官能性をブロックまたは保護する置換基である。適切なアミノ保護基としては、アセチル、トリフルオロアセチル、ｔ－ブトキシカルボニル（ＢＯＣ）、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ）、および９－フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）が挙げられる。同様に、「ヒドロキシ保護基」とは、ヒドロキシ官能性をブロックまたは保護するヒドロキシル基の置換基をいう。適切な保護基としてはアセチルおよびシリルが挙げられる。「カルボキシ保護基」とは、カルボキシ官能性をブロックまたは保護するカルボキシ基の置換基をいう。一般的なカルボキシ保護基としては、フェニルスルホニルエチル、シアノエチル、２－（トリメチルシリル）エチル、２－（トリメチルシリル）エトキシメチル、２－（ｐ－トルエンスルホニル）エチル、２－（ｐ－ニトロフェニルスルフェニル）エチル、２－（ジフェニルホスフィノ）－エチル、およびニトロエチルなどが挙げられる。保護基およびその使用の一般的説明については、Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１を参照のこと。

【０２２３】

「脱離基」とは、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。特定の脱離基が当該分野で周知であり、例として、限定するものではないが、ハロゲン化物（例えば、クロライド、ブロマイド、イオジド）、メタンスルホニル（メシル）、ｐ－トルエンスルホニル（トシル）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフレート）、およびトリフルオロメチルスルホネートが挙げられる。

【０２２４】

省略記号

リンカー成分：
ＭＣ＝６－マレイミドカプロイル
Ｖａｌ－Ｃｉｔまたは「ｖｃ」＝バリン－シトルリン（プロテアーゼにより切断可能なリンカーの例示的なジペプチド）
シトルリン＝２－アミノ－５ウレイドペンタン酸
ＰＡＢ＝ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「自己犠牲（ｓｅｌｆ　ｉｍｍｏｌａｔｉｖｅ）」リンカー成分の例）
Ｍｅ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ＝Ｎ－メチル－バリン－シトルリン（リンカーペプチド結合が、カテプシンＢによる切断を阻害するように修飾されているもの）
ＭＣ（ＰＥＧ）６－ＯＨ＝マレイミドカプロイル－ポリエチレングリコール（抗体システインに結合し得る）
細胞毒性薬物：
ＭＭＡＥ＝モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＷ７１８）
ＭＭＡＦ＝薬物のＣ末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）の改変体（ＭＷ７３１．５）
ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ＝Ｃ末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にＤＭＡＥＡ（ジメチルアミノエチルアミン）を有するＭＭＡＦ（ＭＷ８０１．５）
ＭＭＡＦ－ＴＥＧ＝フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを有するＭＭＡＦ
ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ＝ＭＭＡＦのＣ末端にアミドとして結合した、Ｎ－ｔ－ブチル
ＤＭ１＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ（２’）－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシン
ＤＭ３＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ２－（４－メルカプト－１－オキソペンチル）－メイタンシン
ＤＭ４＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ２－（４－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）－メイタンシン
さらに、略語は以下のとおりである：ＡＥはアウリスタチンＥであり、ＢｏｃはＮ（ｔブトキシカルボニル）であり、ｃｉｔはシトルリンであり、ｄａｐはドラプロイン（ｄｏｌａｐｒｏｉｎｅ）であり、ＤＣＣは１，３－ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、ＤＣＭはジクロロメタンであり、ＤＥＡはジエチルアミンであり、ＤＥＡＤはジエチルアゾジカルボキシレートであり、ＤＥＰＣはジエチルホスホリルシアニダートであり、ＤＩＡＤはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、ＤＩＥＡはＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミンであり、ｄｉｌはドライソロイシンであり、ＤＭＡはジメチルアセトアミドであり、ＤＭＡＰは４－ジメチルアミノピリジンであり、ＤＭＥはエチレングリコールジメチルエーテル（または１，２－ジメトキシエタン）であり、ＤＭＦは、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドであり、ＤＭＳＯは、ジメチルスルホキシドであり、ｄｏｅはドラフェニン（ｄｏｌａｐｈｅｎｉｎｅ）であり、ｄｏｖはＮ，Ｎ－ジメチルバリンであり、ＤＴＮＢは５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）であり、ＤＴＰＡはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、ＤＴＴはジチオトレイトールであり、ＥＤＣＩは１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩であり、ＥＥＤＱは、２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノリンであり、ＥＳ－ＭＳはエレクトロスプレー質量分析であり、ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり、ＦｍｏｃはＮ－（９－フルオレニルメトキシカルボニル）であり、ｇｌｙはグリシンであり、ＨＡＴＵは、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、ＨＯＢｔは１－ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、ＨＰＬＣは高速液体クロマトグラフィであり、ｉｌｅはイソロイシンであり、ｌｙｓはリジンであり、ＭｅＣＮ（CH_3CN）はアセトニトリルであり、ＭｅＯＨはメタノールであり、Ｍｔｒは４－アニシルジフェニルメチル（または４－メトキシトリチル）であり、ｎｏｒは（１Ｓ，２Ｒ）－（＋）－ノルエフェドリンであり、ＰＢＳはリン酸塩緩衝生理食塩水（ｐＨ７．４）であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｐｈは

フェニルであり、Ｐｎｐはｐ－ニトロフェニルであり、ＭＣは６－マレイミドカプロイルであり、ｐｈｅはＬ－フェニルアラニンであり、ＰｙＢｒｏｐは、ブロモトリス－ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、ＳＥＣはサイズ排除クロマトグラフィであり、Ｓｕはスクシンイミドであり、ＴＦＡはトリフルオロ酢酸であり、ＴＬＣは薄層クロマトグラフィであり、ＵＶは紫外線であり、ｖａｌはバリンである。

【０２２５】

「遊離したシステインアミノ酸」とは、親抗体内へと操作されているシステインアミノ酸残基であって、チオール官能基（－ＳＨ）を有しており、対形成もしないし、分子内もしくは分子間ジスルフィド架橋の一部にもならないアミノ酸残基を指す。

【０２２６】

「チオール反応値」という用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴づけである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン操作された抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、１という最大値に変換される。例えば、ビオチン－マレイミド試薬などのチオール反応試薬と１００％の収率で反応してビオチン標識抗体を形成するシステイン操作された抗体上の遊離システインアミノ酸は、チオール反応値が１．０である。チオール反応試薬と８０％の収率で反応する同じまたは異なる親抗体内で改変された別のシステインアミノ酸はチオール反応値が０．８である。チオール反応試薬と完全に反応しない同じまたは異なる親抗体へと操作された別のシステインアミノ酸はチオール反応値が０である。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ＥＬＩＳＡアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、または他の定量的な分析試験によって行ってもよい。

【０２２７】

「親抗体」とは、１つ以上のアミノ酸残基が１つ以上のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然のまたは野生型の配列を含んでいてもよい。親抗体は、他の天然、野生型または修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾（例えば付加、欠失および／または置換）を有してもよい。親抗体は、目的の標的抗原、例えば、生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。非ポリペプチド抗原（例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第５０９１１７８号を参照のこと）に対する抗体も考慮される。

【０２２８】

【表１－１】

表1

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

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

【０２２９】

【表１－２】

表1（続き）

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

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

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

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

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

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

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

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

【０２３０】

【表１－３】

表1（続き）

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an 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, 0xFFFFFFF, 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)                                                          main
        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 */}
```

【０２３１】

【表１－４】

表1（続き）

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

【０２３２】

【表１－５】

表1（続き）

...nw

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

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

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

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

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

【０２３３】

【表１－６】

表1（続き）

```
                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) {
                                        writejmps(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) {
                                        writejmps(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);                      }
```

【０２３４】

【表１－７】

表1（続き）

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

#include "nw.h"

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

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

print()                                                          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();         }
```

【０２３５】

【表１－８】

表1（続き）

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

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

【０２３６】

【表１－９】

表1（続き）

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);                    ...getmat
        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()                                                                   pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                                                po[i] = out[i];         }
```

【０２３７】

【表１－１０】

表1（続き）

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                   ...pr_align
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                                     dumpblock
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

【０２３８】

【表１－１１】

表1（続き）

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                                    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; 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;                     {
```

【０２３９】

【表１－１２】

表1（続き）

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

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

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


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

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

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

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

【０２４０】

【表１－１３】

表1（続き）

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        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));

}
```

【０２４１】

【表１－１４】

表1（続き）

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                              cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                       getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

【０２４２】

【表１－１５】

表1（続き）

...getseq

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

g_calloc

```
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
```

readjmps

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

【０２４３】

【表１－１６】

表1（続き）

...readjmps

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

【０２４４】

【表１－１７】

表1（続き）

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

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

ＩＩＩ．本発明の組成物および方法

本発明は、抗ＣＤ７９ｂ抗体またはその機能的なフラグメント、および造血系の腫瘍の処置におけるその使用方法を提供する。

【０２４５】

一局面では、本発明は、上記または下記に記載の任意のポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメントを含む）、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはその各々の抗原性エピトープに対する抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、アウリスタチン、メイタンシノイド、ドロスタチン誘導体、またはカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解酵素などを含む毒素などの増殖阻害剤または細胞毒性剤に対して必要に応じてコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は必要に応じてＣＨＯ細胞または細菌細胞で産生されてもよく、好ましくはそれらが結合する細胞の死を誘導し得る。検出目的で、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固体支持体に結合されても、またはその他であってもよい。

【０２４６】

一局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしての抗体の親和性）は実質的に、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）と同じである。

【０２４７】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしての抗体の親和性）は低く、例えば、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）よりも少なくとも

１、２または３分の１低い。

【０２４８】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしての抗体の親和性）は大きく、例えば、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の一価の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）よりも少なくとも１、２または３倍大きい。

【０２４９】

一局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしての抗体の親和性）は、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）と実質的に同じである。

【０２５０】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしての抗体の親和性）は低く、例えば、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）よりも少なくとも１、２または３分の１低い。

【０２５１】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしての抗体の親和性）は大きく、例えば、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示される軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、マウス抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧフラグメントとしてのマウス抗体の親和性）またはキメラ抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＦａｂフラグメントとしてのキメラ抗体の親和性）よりも少なくとも１、２または３倍大きい。

【０２５２】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は、２．０ｎＭである。さらなる局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は２．０ｎＭ＋／－０．５である。

【０２５３】

別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は、１ｎＭ以上である。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は１．５ｎＭ以上である。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は、２ｎＭ以上である。別の

局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は２．５ｎＭ以上である。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は、３ｎＭ以上である。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は１ｎＭ～３ｎＭである。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は、１．５ｎＭ～２．５ｎＭである。別の局面では、本発明は、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供し、ここではＣＤ７９ｂに対するこの抗体の二価型の親和性（例えば、ＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性）は１．７５ｎＭ～２．２５ｎＭである。

【０２５４】

一局面では、ＣＤ７９ｂに対するマウス抗体の一価の親和性は実質的に、図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）の可変ドメイン配列を含むＦａｂフラグメントの結合親和性と同じである。別の局面では、ＣＤ７９ｂに対するマウス抗体の一価の親和性は実質的に、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作成された抗体の可変ドメイン配列を含んでいるＦａｂフラグメント、または２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作成された抗体由来の可変ドメインを含んでいるキメラ抗体の結合親和性と同じである。

【０２５５】

当該分野で確立されているとおり、リガンドのそのレセプターに対する結合親和性は任意の種々のアッセイを用いて測定され、種々の数値として表され得る。従って、一実施形態では、結合親和性はＫｄ値として表され、（例えば最小限の結合力での）内因性の結合親和性を反映する。一般的におよび好ましくは、結合親和性は、無細胞の設定または細胞を用いた設定のいずれであってもインビトロで測定される。本明細書中でさらに詳述するように、結合親和性の倍数的差異は、ヒト化抗体（例えばＦａｂ型）の一価の結合親和性値と、結合親和性値が類似のアッセイ条件で測定された参照／比較抗体（例えばＦａｂ型）（例えばドナー超可変領域配列を有するマウス抗体）の一価の結合親和性値との比に関して数量化してもよい。従って、一実施形態では、結合親和性の倍数的差異は、Ｆａｂ型のヒト化抗体のＫｄ値と前記参照／比較Ｆａｂ抗体との比として測定される。例えば、一実施形態では、本発明の抗体（Ａ）が、参照抗体（Ｍ）の親和性の「３分の１より低い」親和性を有する場合、ＡのＫｄ値が３倍ならば、ＭのＫｄ値を１倍とすると、ＭのＫｄ値に対するＡのＫｄ値の比率は３：１であろう。逆に、一実施形態では、本発明の抗体（Ｃ）が参照抗体（Ｒ）の親和性より「３倍大きい」親和性を有する場合、ＣのＫｄ値が１倍であるならば、ＲのＫｄ値を３倍とすると、ＲのＫｄ値に対するＣのＫｄ値の比率は１：３であろう。例えばＢｉａｃｏｒｅ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）およびＥＬＩＳＡを含め、本明細書中に記載のものを含む当該分野で公知の任意の多数のアッセイを用いて、結合親和性測定値を得ることができる。

【０２５６】

一局面では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、以下を含む抗体が提供される：

（ａ）以下からなる群より選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つのＨＶＲ：

（ｉ）Ａ１～Ａ１６がＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１５を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、

（ｉｉ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、

（ｉｉｉ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、

（ｉｖ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、
（ｖ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１０がＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３。
一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号５９の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号６０の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号６１の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号６２の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号６３の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号６４の配列を含む。一実施形態では、これらの配列を（本明細書に記載されるとおり組み合わせて）含んでいる本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体である。

【０２５７】

一局面では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、以下を含む抗体が提供される：
（ａ）以下からなる群より選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つのＨＶＲ：
（ｉ）Ａ１～Ａ１６がＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１５を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、
（ｉｉ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、
（ｉｉｉ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、
（ｉｖ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、
（ｖ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１０がＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３；ならびに
（ｂ）少なくとも１つの改変体ＨＶＲであって、この改変体ＨＶＲ配列が、配列番号５９、６０、６１、６２、６３または６４に示される配列の少なくとも１つの残基の修飾を含む、改変体ＨＶＲ。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号５９の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号６０の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号６１の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号６２の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号６３の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号６４の配列を含む。一実施形態では、これらの配列を（本明細書に記載されるとおり組み合わせて）含んでいる本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体である。

【０２５８】

一局面では、本発明は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つのＨＶＲを含んでいる抗体を提供し、ここで各々のＨＶＲは、配列番号５９、６０、６１、６２、６３、および６４からなる群より選択される配列を含むか、それらの配列からなるか、または本質的にそれらの配列からなり、ここで配列番号５９は、ＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号６０はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号６１はＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号６２はＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号６３はＨＶＲ－Ｈ２に対応し、そして配列番号６４はＨＶＲ－Ｈ３に対応する。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、ここで各々が順番に配列番号５９、６０、６１、６２、６３および６４を含む。

【０２５９】
本発明の抗体における改変体ＨＶＲは、ＨＶＲ内に１つ以上の残基の修飾を有し得る。一実施形態では、ＨＶＲ－Ｌ３改変体は、以下の位置のうち任意の組み合わせで１～２個（１または２個の）置換を含む：Ｃ１（Ｆ）およびＣ８（Ｆ）。以下の各々の位置のカッコ内の文字（単数または複数）は、例示としての置換（すなわち、置き換え）アミノ酸を示しており；当業者には明らかであるように、本明細書に記載の状況での置換アミノ酸としての他のアミノ酸の適切性は、当該分野で公知であるか、および／または本明細書に記載されている技術を用いて慣用的に評価できる。一実施形態では、改変体ＨＶＲ－Ｌ３のＣ１はＦである。一実施形態では、改変体ＨＶＲ－Ｌ３中のＣ８はＦである。一実施形態では、本発明の抗体は、Ｃ１がＦであり、かつＣ８がＦである改変体ＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２６０】
一実施形態では、本発明の抗体は、Ｃ１がＦである改変体ＨＶＲ－Ｌ３を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、Ｃ８がＦである改変体ＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、この改変体ＨＶＲ－Ｌ３抗体はさらに、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、ここで各々が順番に配列番号５９、６０、６１、６２、６３および６４に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施形態では、このフレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３および／または７８に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施形態では、位置７１はＡであり、７３はＴであるか、および／または７８はＡである。これらの抗体の一実施形態では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【０２６１】
一局面では、本発明は、図９（配列番号１８）に示されるＨＶＲ配列を含んでいる抗体を提供する。

【０２６２】
宿主被験体に用いるための治療剤は好ましくは、当該被験体における当該薬剤に対する免疫原性応答をほとんどもしくは全く誘発しない。一実施形態では、本発明はそのような薬剤を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、宿主被験体において配列番号１０および１４の配列を含んでいる抗体と比較して実質的に低減したレベルでヒト抗マウス抗体応答（ＨＡＭＡ）を誘発するか、および／または誘発することが期待されるヒト化抗体を提供する。別の例では、本発明は、ヒト抗マウス抗体応答（ＨＡＭＡ）を誘発するか、および／または最小限のヒト抗マウス抗体応答（ＨＡＭＡ）を誘発するか、もしくは全く誘発しないと予想されるヒト化抗体を提供する。一実施例では、本発明の抗体は、臨床的に受容可能なレベルであるか、それよりも低い抗マウス抗体応答を誘発する。

【０２６３】
本発明のヒト化抗体は、その重鎖および／または軽鎖の可変ドメインに１つ以上のヒトおよび／またはヒトコンセンサス非超可変領域（例えばフレームワーク）配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ヒトおよび／またはヒトコンセンサス非超可変領域配列内に１つ以上の付加的な修飾が存在する。一実施形態では、本発明の抗体の重鎖可変ドメインはヒトコンセンサスフレームワーク配列を含んでおり、一実施形態では、この配列はサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列である。一実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも一アミノ酸位置が修飾された改変体サブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む。例えば、一実施形態では、改変体サブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列は、位置７１、７３および／または７８の１つ以上に置換を含んでもよい。一実施形態では、このような置換はＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔおよび／またはＬ７８Ａのいずれかの組合せである。

【０２６４】
当該分野で公知であるように、また、本明細書でより詳細に後述するように、抗体の超

可変領域を示すアミノ酸位置／境界域は、（以下に記載のように）当該分野で公知の種々の定義および状況によって異なってもよい。可変ドメイン内のいくつかの位置は、ある設定の定義のもとで超可変領域内と判断されても、異なる定義のもとでは超可変領域外であると判断され得るハイブリッド超可変位置とみなされる場合がある。また、１つ以上のこれらの位置は、拡張した超可変領域（以下にさらに定義する）に見出され得る。本発明は、これらハイブリッド超可変位置内に修飾を含有する抗体を提供する。一実施形態では、これらの超可変位置には、重鎖可変ドメイン内の位置２６～３０、３３～３５Ｂ、４７～４９、５７～６５、９３、９４および１０１～１０２のうち１つ以上が含まれる。一実施形態では、これらハイブリッド超可変位置には、軽鎖可変ドメイン内の位置２４～２９、３５～３６、４６～４９、５６および９７の１つ以上が含まれる。一実施形態では、本発明の抗体は、１つ以上のハイブリッド超可変位置が修飾されたヒト改変体ヒトサブグループコンセンサスフレームワーク配列を含む。

【０２６５】

一局面では、本発明の抗体は、位置２６～３０、３３～３５、４８～４９、５８、６０～６３、９３、および１０１のうち１つ以上で修飾された改変体ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含む。

【０２６６】

一局面では、本発明の抗体は、位置２４、２７～２９、５６および９７のうち１つ以上で修飾された改変体ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む。

【０２６７】

一局面では、本発明の抗体は、位置２６～３０、３３～３５、４８～４９、５８、６０～６３、９３、および１０１のうち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６で、または全てで修飾された改変体ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む重鎖可変ドメインを含む。本発明の一実施形態では、本発明の抗体は、位置７１、７３および／または７８で修飾された改変体サブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含んでいる。一実施形態では、このような置換はＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔおよび／またはＬ７８Ａである。

【０２６８】

一局面では、本発明の抗体は、位置２４、２７～２９、５６および９７のうち１、２、３、４、５または全てで修飾された改変体ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む。

【０２６９】

本発明の抗体は、任意の適切なヒトまたはヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含んでもよく、ただし、この抗体は所望の生物学的特徴（例えば所望の結合親和性）を示すものとする。一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトｋ軽鎖のフレームワーク配列の少なくとも一部（または全て）を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトｋサブグループＩフレームワークコンセンサス配列の少なくとも一部（または全て）を含む。

【０２７０】

一局面では、本発明の抗体は、配列番号９（図７）および／または１３（図８Ａ～Ｂ）に示すフレームワーク配列を含んでいる重鎖および／または軽鎖可変ドメインを含む。

【０２７１】

一局面では、本発明の抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされたヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体である。一局面では、この細胞毒性剤にコンジュゲートされたヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体は、異種移植における腫瘍進行を阻害する。

【０２７２】

一局面では、ヒト化抗体およびキメラ抗体の両方とも一価である。一実施形態では、このヒト化抗体およびキメラ抗体の両方ともＦｃ領域に連結された単一のＦａｂ領域を含む。一実施形態では、参照キメラ抗体は、ヒトＦｃ領域に連結される図７（配列番号１０）および図８Ａ～Ｂ（配列番号１４）に示す可変ドメイン配列を含む。一実施形態では、ヒ

トＦｃ領域はＩｇＧのもの（例えばＩｇＧ１、２、３または４）である。
【０２７３】
一局面では、本発明は、図１３（配列番号３１～３３）に記載のＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣの配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含んでいる抗体を提供する。一実施形態では、この可変ドメインは、図１３（配列番号２７～３０）に記載のＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣの配列を含む。一実施形態では、この抗体は、図１３（配列番号３４～３５）に記載のＣＨ１配列および／またはＦｃ配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣの配列（図１３、配列番号３１～３３）を含んでいる重鎖可変ドメインと、ＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣの配列（図１３、配列番号２７～３０）とを含んでいる重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣ、および／またはＨＶＲ３－ＨＣの配列（図１３、配列番号３１～３３）を含んでいる重鎖可変ドメインと、図１３（配列番号３４～３５）に記載のＣＨ１および／またはＦＣ配列を含んでいる重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣ、および／またはＨＶＲ３－ＨＣの配列（図１３、配列番号３１～３３）を含んでいる重鎖可変ドメインと、ＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣの配列（図１３、配列番号２７～３０）ならびにＣＨ１および／またはＦｃ（図１３、配列番号３４～３５）とを含む。
【０２７４】
一局面では、本発明は、図１３（配列番号２３～２５）に記載のＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣの配列を含んでいる軽鎖可変ドメインを含んでいる抗体を提供する。一実施形態では、この可変ドメインは、図１３（配列番号１９～２２）に記載のＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣの配列を含む。一実施形態では、この抗体は、図１３（配列番号２６）に記載のＣＬ１配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図１３に記載のＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣ、および／またはＨＶＲ３－ＬＣの配列（配列番号２３～２５）と、ＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣの配列（配列番号１９～２２）とを含んでいる軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣ、および／またはＨＶＲ３－ＬＣの配列（配列番号２３～２５）と、図１３に記載のＣＬ１配列（配列番号２６）を含んでいる軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣ、および／またはＨＶＲ３－ＬＣの配列（配列番号２３～２６）を含んでいる軽鎖可変ドメインと、図１３に示されるＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣの配列（配列番号１９～２２）と、図１３（配列番号２６）に示されるＣＬ１配列とを含む。
【０２７５】
一局面では、本発明の抗体は、国際公開第２００６／０３４４８８；米国特許出願公開第２００７／００９２９４０号（本明細書において出典明記によって全体が援用される）に開示されるように、親抗体の１個以上のアミノ酸が遊離したシステインアミノ酸で置換されているシステイン操作された抗体を包含する。任意の形態の抗ＣＤ７９ｂ抗体が操作、すなわち変異されてもよい。例えば、親Ｆａｂ抗体フラグメントを操作して、本明細書中で「ＴｈｉｏＦａｂ」と称するシステイン操作Ｆａｂを形成してもよい。同様に、親のモノクローナル抗体を操作して、「ＴｈｉｏＭａｂ」を形成してもよい。単一の部位突然変異によりＴｈｉｏＦａｂの単一の改変したシステイン残基が生じるのに対して、ＩｇＧ抗体の二量体の性質に起因してＴｈｉｏＭａｂでは、単一の部位突然変異により２つの操作されたシステイン残基が生じることに注意すべきである。本発明のシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体としては、優先的に細胞関連のＣＤ７９ｂポリペプチドを結合するモノクローナル抗体、ヒト化もしくはキメラのモノクローナル抗体、および抗体の抗原結合フラグメント、融合ポリペプチドおよびアナログが挙げられる。あるいは、システイン操作抗体は、必ずしも親抗体を変える必要はなく、例えばファージディスプレイ抗体の設計

や選別によって、または軽鎖および／または重鎖フレームワーク配列と定常領域の新規な設計によって、抗体の配列設計および／または選別により生じる、抗体またはＦａｂの本明細書において開示される位置にシステインを含んでいる抗体を包含する。システイン操作抗体は、０．６～１．０、０．７～１．０または０．８～１．０の範囲のチオール反応値を有する１個以上の遊離したシステインアミノ酸を含む。遊離システインアミノ酸は、親抗体内で操作されているシステイン残基であり、ジスルフィド架橋の一部でない。システイン操作抗体は、例えばマレイミドまたはハロアセチルを通じて、操作されたシステインの部位での、細胞傷害性化合物および／または造影化合物の接着に有用である。Ｃｙｓ残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはＮ末端アミノ基などのタンパク質の任意の他のアミノ酸官能基の、およそ１０００倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応し得るが、より高いｐＨ（＞９．０）およびより長い反応時間が必要とされる（Ｇａｒｍａｎ，１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ）。

【０２７６】

ある局面では、本発明のシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、以下のいずれか１つの位置に操作されたシステインを含み、この位置は、軽鎖ではＫａｂａｔら（Ｋａｂａｔら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第5版．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤを参照のこと）に従って、重鎖（Ｆｃ領域を含む）ではＥＵナンバリング（上掲のＫａｂａｔら（１９９１）を参照のこと）に従ってナンバリングされ、図１７Ａおよび図１８Ａの下線で示す軽鎖定常領域は、位置１０９（Ｋａｂａｔナンバリング）で始まり、図１７Ｂおよび１８Ｂの下線で示す重鎖定常領域は位置１１８（ＥＵナンバリング）で始まる。また、この位置は、図１７～１８に示される全長の軽鎖もしくは重鎖のアミノ酸を順次ナンバリングする際にその位置で表されてもよい。本発明の一実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＬＣ－Ｖ２０５Ｃに操作されたシステインを含む（Ｋａｂａｔ番号：Ｖａｌ２０５；図１８Ａの連続番号２１０はその位置でＣｙｓになるように操作される）。軽鎖の操作されたシステインを図１８Ａにおいて太字の二重線で示す。一実施形態によれば、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＨＣ－Ａ１１８Ｃに操作されたシステインを含む（ＥＵ番号：Ａｌａ１１８、Ｋａｂａｔ番号１１４；図１７Ｂの連続番号１１８はその位置でＣｙｓになるように操作されている）。重鎖の操作されたシステインを図１７Ｂにおいて太字の二重線の文字で示す。一実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、Ｆｃ－Ｓ４００Ｃで操作されたシステインを含む（ＥＵ番号：Ｓｅｒ４００、Ｋａｂａｔ番号３９６；図１７－１８Ｂの連続番号４００はその位置でＣｙｓになるように操作されている）。一実施形態では、この重鎖の操作されたシステイン（Ｆｃ領域を含んでいる）は、以下の位置（Ｋａｂａｔのナンバリングに従い、カッコ内はＥＵナンバリング）のうちのいずれか１つである：５、２３、８４、１１２、１１４（１１８　ＥＵナンバリング）、１１６（１２０　ＥＵナンバリング）、２７８（２８２　ＥＵナンバリング）、３７１（３７５　ＥＵナンバリング）または３９６（４００　ＥＵナンバリング）。従って、本発明の親のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体のこれらの位置のアミノ酸の変化は、以下である：Ｖ５Ｃ、Ａ２３Ｃ、Ａ８４Ｃ、Ｓ１１２Ｃ、Ａ１１４Ｃ（Ａ１１８Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｔ１１６Ｃ（Ｔ１２０Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｖ２７８Ｃ（Ｖ２８２Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｓ３７１Ｃ（Ｓ３７５Ｃ　ＥＵナンバリング）またはＳ３９６Ｃ（Ｓ４００Ｃ　ＥＵナンバリング）。従って、本発明の親キメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体のこれらの位置でのアミノ酸の変化は以下である：Ｑ５Ｃ、Ｋ２３Ｃ、Ｓ８４Ｃ、Ｓ１１２Ｃ、Ａ１１４Ｃ（Ａ１１８Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｔ１１６Ｃ（Ｔ１２０Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｖ２７８Ｃ（Ｖ２８２Ｃ　ＥＵナンバリング）、Ｓ３７１Ｃ（Ｓ３７５Ｃ　ＥＵナンバリング）またはＳ３９６Ｃ（Ｓ４００Ｃ　ＥＵナンバリング）。他の実施形態では、軽鎖の操作されたシステインは、以下の位置（Ｋａｂａｔナンバリングによる）のうちのいずれか１つである：１５、１１０、１

１４、１２１、１２７、１６８、２０５。従って、本発明の親のヒト化抗体ＣＤ７９ｂ抗体のこれらの位置でのアミノ酸の変化は以下である：Ｖ１５Ｃ、Ｖ１１０Ｃ、Ｓ１１４Ｃ、Ｓ１２１Ｃ、Ｓ１２７Ｃ、Ｓ１６８Ｃ、またはＶ２０５Ｃ。従って、本発明の親のキメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体のこれらの位置でのアミノ酸の変化は以下である：Ｉ１５Ｃ、Ｖ１１０Ｃ、Ｓ１１４Ｃ、Ｓ１２１Ｃ、Ｓ１２７Ｃ、Ｓ１６８Ｃ、またはＶ２０５Ｃ。

【０２７７】

一局面では、本発明は、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含し、この抗体は、１つ以上の遊離システインアミノ酸を含み、ここではこのシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合するものであり、親の抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のアミノ酸残基を、システインで置換する工程を包含するプロセスによって調製され、この親抗体は、以下から選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列を含む：

（ａ）Ａ１～Ａ１６がＫＳＳＱＳＬＬＤＳＤＧＫＴＹＬＮ（配列番号５９）である配列Ａ１～Ａ１５を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ１と、

（ｂ）ＬＶＳＫＬＤＳ（配列番号６０）である配列Ｂ１～Ｂ７を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ２と、

（ｃ）ＷＱＧＴＨＦＰＹＴ（配列番号６１）またはＦＱＧＴＨＦＰＦＴ（配列番号７９）である配列Ｃ１～Ｃ９を含んでいる、ＨＶＲ－Ｌ３と、

（ｄ）ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＮ（配列番号６２）である配列Ｄ１～Ｄ１０を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ１と、

（ｅ）ＧＭＩＤＰＳＤＳＥＴＨＹＮＨＩＦＫＤ（配列番号６３）である配列Ｅ１～Ｅ１８を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ２と、

（ｆ）Ｆ１～Ｆ１０がＡＲＮＬＹＬ（配列番号６４）である配列Ｆ１～Ｆ６を含んでいる、ＨＶＲ－Ｈ３。

【０２７８】

特定の局面では、本発明は、本明細書において開示した全長アミノ酸配列を有するシステイン操作抗体、または本明細書において開示したシグナルペプチドを欠いているシステイン操作抗体アミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいる、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体に関する。

【０２７９】

よりさらなる局面では、本発明は、（ａ）本明細書に開示した全長アミノ酸配列を有しているシステイン操作抗体、（ｂ）本明細書に開示したシグナルペプチドを欠いているシステイン操作抗体アミノ酸配列、（ｃ）本明細書に開示した、シグナルペプチドを有するかまたは有さない、膜貫通型システイン操作抗体タンパク質の細胞外ドメイン、（ｄ）本明細書に開示した任意の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、または（ｅ）本明細書に開示した全長システイン操作抗体アミノ酸配列の任意の他の特異的に定義されるフラグメント、をコードしているＤＮＡ分子の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含んでいる、単離されたシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体に関する。

【０２８０】

特定の局面では、本発明は、Ｎ末端シグナル配列を有さないかおよび／または開始メチオニンを有さない単離されたシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、本明細書中に記載の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る抗体を提供する。本明細書中ではまた、前記抗体を産生するプロセスを記載しており、これらのプロセスは、システイン操作抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含んでいる宿主細胞を培養する工程と、細胞培養物からこのシステイン操作抗体を回収する工程とを包含する。

【０２８１】

本発明の別の局面では、膜貫通ドメインを欠失するか膜貫通ドメインを不活性化してある単離されたシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。本明細書中ではまた、このような抗体を産生するプロセスを記載しており、これらのプロセスは、システイン操作抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含んでいる宿主細胞を培養する工程と、この細胞培養物からシステイン操作抗体を回収する工程とを包含する。

【０２８２】

他の局面では、本発明は、異種性（非ＣＤ７９ｂ）のポリペプチドに融合させた、任意の本明細書中に記載したシステイン操作抗体を含んでいる単離された抗ＣＤ７９ｂキメラシステイン操作抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列または免疫グロブリンのＦｃ領域などの異種性のポリペプチドに融合させた、任意の本明細書中に記載したシステイン操作抗体を含む。

【０２８３】

システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、それぞれの抗原エピトープへの抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体または抗体であってもよい。本発明の抗体は必要に応じて、例えばアウリスタチン、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体またはカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解性の酵素などを含む毒素などの増殖阻害性剤もしくは細胞毒性剤にコンジュゲートさせてもよい。本発明の抗体は必要に応じて、ＣＨＯ細胞または細菌細胞内で産生され、好ましくは結合する細胞の成長もしくは増殖を阻害するか、または死を誘導する。診断目的のために、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固体キャリアなどに結合されても、その他であってもよい。

【０２８４】

本発明の他の局面では、本発明は、任意の本明細書中に記載した抗ＣＤ７９ｂ抗体および抗ＣＤ７９ｂシステイン操作抗体をコードするＤＮＡを含んでいるベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含んでいる宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞または酵母細胞であってもよい。本明細書中に記載の任意のポリペプチドを産生するためのプロセスがさらに提供され、所望のポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程と、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収する工程とを包含する。

【０２８５】

システイン操作抗体は癌の治療において有用であり、これには細胞表面および膜貫通型レセプター、および腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に特異的な抗体が挙げられる。このような抗体は、裸の抗体（薬剤または標識成分にコンジュゲートしていない）として、あるいは抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）として用いられてもよい。本発明のシステイン操作抗体は、チオール反応性の試薬と、部位特異的かつ効率的にカップリングされてもよい。チオール反応性の試薬は、多機能リンカー試薬、捕獲標識試薬、蛍光体（発蛍光団）試薬または薬物－リンカー中間生成物であってもよい。システイン操作抗体は、検出可能な標識により標識されても、固相キャリアに固定されても、および／または、薬物部分とコンジュゲートされもよい。チオール反応性は、任意の抗体に対して一般化されてもよく、ここでは反応性のシステインアミノ酸によるアミノ酸の置換が以下のアミノ酸範囲から選択される軽鎖中の範囲内で：Ｌ１０～Ｌ２０、Ｌ１０５～Ｌ１１５、Ｌ１０９～Ｌ１１９、Ｌ１１６～Ｌ１２６、Ｌ１２２～Ｌ１３２、Ｌ１６３～Ｌ１７３、Ｌ２００～Ｌ２１０；および以下のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内で：Ｈ１～Ｈ１０、Ｈ１８～Ｈ２８、Ｈ７９～Ｈ８９、Ｈ１０７～Ｈ１１７、Ｈ１０９～Ｈ１１９、Ｈ１１１～Ｈ１２１：およびＨ２７０～Ｈ２８０、Ｈ３６６～Ｈ３７６、Ｈ３９１～４０１から選択される範囲内のＦｃ領域で、作製され得、ここではアミノ酸位置のナンバリングは、Ｋａｂａｔナンバリングシステム（Ｋａｂａｔら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，　Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）の位置１から始まり、その後は国際公開第

２００６０３４４８８号；米国特許出願公開第２００７／００２９２４０号に開示されるように、順次続ける。チオール反応性はまた、抗体の特定のドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）および重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３に対して一般化され得る。０．６以上のチオール反応値を生じるシステイン置換は、ＩｇＧサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＡ２をそれぞれが含むインタクトな抗体：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭの重鎖定常ドメインα、δ、ε、γおよびμに作製されてもよい。このような抗体およびそれらの使用は、国際公開第２００６／０３４４８８号；米国特許出願公開第２００７／００９２９４０号に開示される。

【０２８６】

本発明のシステイン操作抗体は好ましくは、それらの野生型、親抗体対応物の抗原結合能を保持し得る。従って、システイン操作抗体は、抗原に対して好ましくは特異的に結合してもよい。このような抗原としては、例えば、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、細胞表面レセプタータンパク質、および他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達または分化に関連する（例えば機能的に寄与することが公知であるかまたは予測される）分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に関与する分子、脈管形成に関与する分子、および血管新生に関連する（例えば機能的に寄与することが公知であるかまたは予測される）分子が挙げられる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子（すなわち、ＣＤ７９ｂを包含するがこれに限定されないＣＤタンパク質）であってもよい。本発明のシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、それらの親抗ＣＤ７９ｂ抗体対応物の抗原結合能を保持する。従って、本発明のシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、限定するものではないがＢ細胞などの細胞の表面上にこのような抗原が発現される場合を含め、ヒトの抗ＣＤ７９ｂアイソフォームβおよび／またはαを含んでいるＣＤ７９ｂ抗原に対して、好ましくは特異的に結合し得る。

【０２８７】

一局面では、本発明の抗体は、反応性部分、活性化部分、または反応性システインチオール基を通じて抗体に共有結合され得る標識部分とコンジュゲートされてもよい（Ｓｉｎｇｈら、（２００２）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０４：１４７～１５；Ｈａｒｌｏｗ Ｅ．ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｄ．（１９９９）Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ；Ｌｕｎｄｂｌａｄ Ｒ．Ｌ．（１９９１）Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ，第２版．ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ）。付着された標識は、（ｉ）検出可能なシグナルを提供するか、（ｉｉ）第二標識と相互作用して、第一または第二標識によって生じる検出可能なシグナルを改変して、例えばＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）が生じるようにするか、（ｉｉｉ）抗原またはリガンドとの相互作用を安定させるかまたは結合の親和性を増加するか、（ｉｖ）電荷、疎水性、形状または他の物理学的なパラメータによって移動度、例えば電気泳動移動度または細胞透過性に作用するか、あるいは（ｖ）捕獲部分を与えて、リガンド親和性、抗体／抗原結合またはイオン錯体形成を調節するように機能し得る。

【０２８８】

標識されたシステイン操作抗体は、例えば、特定の細胞、組織または血清における目的の抗原の発現を検出するための診断的アッセイに有用となり得る。診断用適用のために、抗体は代表的には検出可能な部分を用いて標識されるであろう。多くの標識が利用可能であり、この標識は一般には、以下のカテゴリに分類してもよい：

放射性同位体類（ラジオアイソトープ類）（放射性核種類）、例えば^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔ、または^{213}Ｂｉ。放射性同位体標識抗体は、レセプター標的撮像実験において有用である。抗体は、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，Ｃｏｌｉｇｅｎら、

編集．Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｐｕｂｓ．（１９９１）のＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓに記載される技術を用いて、リガンド試薬が抗体の操作されたシステインチオールと反応性がある場合にキレートを結合するか、それ以外の状況では放射性同位体金属と複合化するこのリガンド試薬により標識してもよい。金属イオンを錯化し得るキレート化リガンドとしては、ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡ（Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）が挙げられる。放射性核種は、本発明の抗体－薬物コンジュゲートとの錯体形成により標的化され得る（Ｗｕら（２００５）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２３（９）：１１３７～１１４６）。

【０２８９】

リンカー試薬、例えば、ＤＯＴＡ－マレイミド（４－マレイミドブチルアミドベンジル－ＤＯＴＡ）は、イソプロピルクロロフォルメート（Ａｌｄｒｉｃｈ）によって活性化される４－マレイミド酪酸（Ｆｌｕｋａ）とアミノベンジル－ＤＯＴＡとの反応によって、その後のＡｘｗｏｒｔｈｙら、（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７（４）：１８０２～１８０７の手順によって調製されてもよい。ＤＯＴＡ－マレイミド試薬は、システイン操作抗体の遊離したシステインアミノ酸と反応して、抗体上の金属錯体形成リガンドを提供する（Ｌｅｗｉｓら、（１９９８）Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．９：７２～８６）。ＤＯＴＡ－ＮＨＳ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）などのキレート化リンカー標識試薬は、市販されている（Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出および定量化によって経路活性化のマーカーとなり得る（Ａｌｂｅｒｔら、（１９９８）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．８：１２０７～１２１０）。コンジュゲートした放射性金属は、リソソーム分解後に細胞内に残り得る。

【０２９０】

造影実験のための抗体標識として好適な金属－キレート複合体は以下に開示される：米国特許第５３４２６０６号；米国特許第５４２８１５５号；米国特許第５３１６７５７号；米国特許第５４８０９９０号；米国特許第５４６２７２５号；米国特許第５４２８１３９号；米国特許第５３８５８９３号；米国特許第５７３９２９４号；米国特許第５７５０６６０号；米国特許第５８３４４５６号；Ｈｎａｔｏｗｉｃｈら、（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ６５：１４７～１５７；Ｍｅａｒｅｓら、（１９８４）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４２：６８～７８；Ｍｉｒｚａｄｅｈら、（１９９０）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１：５９～６５；Ｍｅａｒｅｓら、（１９９０）Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ１９９０，Ｓｕｐｐｌ．１０：２１～２６；Ｉｚａｒｄら、（１９９２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．３：３４６～３５０；Ｎｉｋｕｌａら、（１９９５）Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２２：３８７～９０；Ｃａｍｅｒａら、（１９９３）Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２０：９５５～６２；Ｋｕｋｉｓら、（１９９８）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．３９：２１０５～２１１０；Ｖｅｒｅｌら、（２００３）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４４：１６６３～１６７０；Ｃａｍｅｒａら、（１９９４）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．２１：６４０～６４６；Ｒｕｅｇｇら、（１９９０）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５０：４２２１～４２２６；Ｖｅｒｅｌら、（２００３）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４４：１６６３～１６７０；Ｌｅｅら、（２００１）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６１：４４７４～４４８２；Ｍｉｔｃｈｅｌｌ，ら、（２００３）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４４：１１０５～１１１２；Ｋｏｂａｙａｓｈｉら、（１９９９）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１０：１０３～１１１；Ｍｉｅｄｅｒｅｒら、（２００４）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４５：１２９～１３７；ＤｅＮａｒｄｏら、（１９９８）Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４：２４８３～９０；Ｂｌｅｎｄら、（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ＆ Ｒａｄｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ １８：３５５～３６３；Ｎｉｋｕｌａら、（１９９９）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４０：１６６～７６；Ｋｏｂａｙａｓｈｉら、（１９９８）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．３９：８２９～３６；Ｍａｒｄｉ

ｒｏｓｓｉａｎら、（１９９３）Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２０：６５～７４；Ｒｏｓｅｌｌｉら、（１９９９）Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ＆ Ｒａｄｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，１４：２０９～２０。

【０２９１】

蛍光標識、例えば希有土類キレート（ユウロピウムキレート）、フルオレセイン種、例として、ＦＩＴＣ、５－カルボキシフルオレセイン、６カルボキシフルオレセイン；ＴＡＭＲＡを含むローダミン種；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；およびこれらのアナログ。蛍光標識は、例えば、上記のＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙのＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートしてもよい。蛍光色素および蛍光標識試薬としては、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ（Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）およびＰｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）から市販されている試薬が挙げられる。

【０２９２】

種々の酵素基質標識が利用可能であるか、または開示されている（米国特許第４２７５１４９号）。一般に、酵素は、種々の技術を用いて測定してもよい色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定してもよい基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変え得る。蛍光の変化を定量化する技術は上記されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起されて、次いで、測定することが可能な（例えば化学ルミノメーターを用いて）か、またはエネルギーを蛍光受容基に与える光を発し得る。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第４７３７４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタルアジネジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｐｈｔｈａｌａｚｉｎｅｄｉｏｎｅｓ）、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）、複素環のオキシダーゼ（例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎら（１９８１）、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ－Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ ｕｓｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ」ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍ．（編集 Ｊ．Ｌａｎｇｏｎｅ ＆ Ｈ．Ｖａｎ Ｖｕｎａｋｉｓ），Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，７３：１４７～１６６に記載されている。

【０２９３】

酵素基質の組合せの例としては、例えば以下が挙げられる：

（ｉ）基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、ここで水素ペルオキシダーゼが色素前駆体（例えば、オルソフェニレン（ｏｒｔｈｏｐｈｅｎｙｌｅｎｅ）ジアミン（ＯＰＤ）または３，３’，５，５’テトラメチルのベンジジン塩酸塩（ＴＭＢ））を酸化する；

（ｉｉ）色素生産性基質としてリン酸パラ－ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ（ＡＰ）；および

（ｉｉｉ）色素生産性基質（例えばｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ）または蛍光発生基質４－メチルウンベリフェリル（ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ）－β－Ｄ－ガラクトシダーゼを有するβ－Ｄ－ガラクトシダーゼ（β－Ｄ－Ｇａｌ）。

【０２９４】

多数の他の酵素基質の組合せが当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第４２７５１４９号および米国特許第４３１８９８０号を参照のこ

と。

【０２９５】

標識は、アミノ酸側鎖、活性化されたアミノ酸側鎖、システイン操作抗体などと間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した標識の任意の大きな３つの分類はアビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にストレプトアビジンと結合し、従って、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド改変体と標識とを間接的にコンジュゲートさせるために、このポリペプチド改変体は小ハプテン（例えばジゴキシン）とコンジュゲートさせ、前述した種々のタイプの標識のうちの１つは抗ハプテンポリペプチド改変体（例えば抗ジゴキシン抗体）とコンジュゲートさせる。従って、ポリペプチド改変体と標識とを間接的にコンジュゲートすることが可能である（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．（１９９６）ｉｎ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ）。

【０２９６】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばＥＬＩＳＡ、競合結合アッセイ、直接的および間接的なサンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイに使用してもよい（Ｚｏｌａ，（１９８７）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７～１５８，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）。

【０２９７】

検出標識は、結合または認識の事象を局所化し、可視化して、数値化するために有用であり得る。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出し得る。検出可能に標識した抗体についての別の用途は、ビーズに基づく免疫捕獲の方法であって、この方法は、蛍光標識抗体とビーズとをコンジュゲートさる工程と、リガンド結合の際の蛍光シグナルを検出する工程とを包含する。同様の結合検出方法論は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）効果を利用して抗体－抗原相互作用を測定して検出する。

【０２９８】

蛍光色素および化学発光色素などの検出標識（Ｂｒｉｇｇｓら、（１９９７）「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｓｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｄｙｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｔｏ Ａｍｉｎｅｓ ａｎｄ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ，」Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，Ｐｅｒｋｉｎ－Ｔｒａｎｓ．１：１０５１～１０５８）は検出可能なシグナルを提供し、通常、好ましくは以下のような特性により標識化抗体に応用可能である：（ｉ）標識抗体は、少量の抗体が無細胞アッセイおよび細胞に基づくアッセイにおいて鋭敏に検出されるように低いバックグランドで極めて高いシグナルを産生しなければならず；そして（ｉｉ）標識抗体は、有意に写真を退色させることなく、蛍光シグナルが観察され、モニターされ、記録されるように、光安定性でなければならない。膜または細胞表面、特に生きている細胞への標識抗体の細胞表面結合を伴う用途では、標識は、好ましくは、（ｉｉｉ）有効なコンジュゲート濃度と検出感度が達成されるように良好な水溶性であり、（ｉｖ）細胞の正常な代謝過程が破壊されないか、または早期に細胞死を引き起こさないように生きている細胞に対して毒性がない。

【０２９９】

細胞性蛍光強度の直接の定量化と蛍光標識事象、例えば、ペプチド－色素コンジュゲートの細胞表面結合の算出は、生きている細胞またはビーズによる非放射性アッセイである、混合と読み取り（ｍｉｘ－ａｎｄ－ｒｅａｄ）を自動化するシステム（ＦＭＡＴ（登録商標）８１００ ＨＴＳシステム、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆ．）で行ってもよい（Ｍｉｒａｇｌｉａ，「Ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ ｃｅｌｌ－ ａｎｄ ｂｅａｄ－ｂａｓｅｄ ａｓｓａｙｓ ｆｏｒ ｈｉｇｈ ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｍｉｃｒｏｖｏｌｕｍｅ ａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」，（１９９９）Ｊ．ｏ

ｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ４：１９３～２０４）。標識抗体の使用にはまた、細胞表面レセプター結合アッセイ、免疫捕獲（ｉｍｍｕｎｏｃａｐｔｕｒｅ）アッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ（ＦＬＩＳＡ）、カスパーゼ切断（Ｚｈｅｎｇ，「Ｃａｓｐａｓｅ－３ ｃｏｎｔｒｏｌｓ ｂｏｔｈ ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ａｎｄ ｎｕｃｌｅａｒ ｅｖｅｎｔｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ Ｆａｓ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ ｖｉｖｏ」，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：６１８～２３；米国特許第６３７２９０７号）、アポトーシス（Ｖｅｒｍｅｓ，「Ａ ｎｏｖｅｌ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ．Ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒｉｃ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｎ ｅａｒｌｙ ａｐｏｐｔｏｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｕｓｉｎｇ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｌａｂｅｌｌｅｄ Ａｎｎｅｘｉｎ Ｖ」（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８４：３９～５１）および細胞障害性アッセイが挙げられる。蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術を用いて、細胞表面を標識とする分子によって上方制御または下方制御を同定してもよい（Ｓｗａｒｔｚｍａｎ，「Ａ ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｍｉｃｒｏｖｏｌｕｍｅ ａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」，（１９９９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７１：１４３～５１）。

【０３００】

本発明の標識抗体は、種々の方法および以下のような生医学的かつ分子的撮像法の技術によってバイオマーカーおよびプローブを画像化するのに有用である：（ｉ）ＭＲＩ（磁気共鳴画像法）；（ｉｉ）ＭｉｃｒｏＣＴ（コンピュータ断層撮影法）、（ｉｉｉ）ＳＰＥＣＴ（単一光子放射型コンピュータ断層撮影法）；（ｉｖ）ＰＥＴ（ポジトロン放出断層撮影）Ｃｈｅｎら、（２００４）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１５：４１～４９；（ｖ）バイオルミネセンス、（ｖｉ）蛍光；および（ｖｉｉ）超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質によって標識された抗体が動物またはヒト患者に投与される造影手順であり、画像は抗体が局在する身体の部位のものである（米国特許第６５２８６２４号）。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、または治療的介入に対する薬理学的応答の指標として評価されてもよい。バイオマーカーにはいくつかの種類がある場合がある：タイプ０は、疾患の自然な成長マーカーであって、公知の臨床指標、例えば関節リウマチの滑液炎症のＭＲＩ評価と長軸方向に相関する；タイプＩマーカーは、例えばメカニズムが臨床転帰と関係していなくても、作用の機序（ｍｅｃｈａｎｉｓｍ－ｏｆ－ａｃｔｉｏｎ）の関係として介入の効果を捕らえる；タイプＩＩマーカーは代理のエンドポイントとして機能するものであり、このバイオマーカーの変化またはこのバイオマーカーのシグナルから、関節リウマチの骨浸食をＣＴで測定するなどの目的の応答を「有効と認める」ために臨床的な利点を予測する。従って、造影バイオマーカーは、（ｉ）標的タンパク質の発現、（ｉｉ）標的タンパク質に対する治療用の結合、すなわち選択性、および（ｉｉｉ）クリアランスおよび半減期の薬物動態学的データについての薬物動態学的（ＰＤ）治療的情報を提供し得る。研究室ベースのバイオマーカーと比較したときのインビボ造影バイオマーカーの利点としては、以下が挙げられる：非侵襲性処置、定量化できる、全身評価、反復性投与および評価、すなわち複数の時点の投与と評価、および臨床前（小動物）の結果を臨床（ヒト）の結果に可能性として置き換えることができる効果。用途によっては、生体イメージングは、前臨床研究において多くの動物実験の代替となるかまたはそれを最小限にする。

【０３０１】

ペプチド標識方法は周知である。Ｈａｕｇｌａｎｄ，２００３，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｂｒｉｎｋｌｅｙ，１９９２，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．３：２；Ｇａｒｍａｎ，（１９９７）Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ

Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ；Ｍｅａｎｓ（１９９０）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１：２；Ｇｌａｚｅｒら、（１９７５）Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ．Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｔ．Ｓ．ＷｏｒｋおよびＥ．Ｗｏｒｋ，編集）Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｌｕｎｄｂｌａｄ，Ｒ．Ｌ．ａｎｄ Ｎｏｙｅｓ，Ｃ．Ｍ．（１９８４）Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅａｇｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ，第Ｉ巻および第ＩＩ巻，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｐｆｌｅｉｄｅｒｅｒ，Ｇ．（１９８５）「Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」，Ｍｏｄｅｒｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｈ．Ｔｓｃｈｅｓｃｈｅ，編集，Ｗａｌｔｅｒ ＤｅＧｒｙｔｅｒ，Ｂｅｒｌｉｎ ａｎｄ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ならびにＷｏｎｇ（１９９１）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．）；Ｄｅ Ｌｅｏｎ－Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら、（２００４）Ｃｈｅｍ．Ｅｕｒ．Ｊ．１０：１１４９～１１５５；Ｌｅｗｉｓら、（２００１）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１２：３２０～３２４；Ｌｉら、（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３：１１０～１１５；Ｍｉｅｒら、（２００５）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１６：２４０～２３７を参照のこと。

【０３０２】

十分近接した蛍光レポーターとクエンチャーの２つの成分にて標識されたペプチドおよびタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）を受ける。レポーター基とは、代表的には、特定の波長で光によって励起され、エネルギーをアクセプターまたはクエンチャー基に移動して、それによって最大の明るさで発光するための適切なストークスシフトを伴う蛍光色素である。蛍光色素には、広範な芳香族性を有する分子、例えば、フルオレセインおよびローダミン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。蛍光レポーターは、インタクトなペプチドのクエンチャー成分によって部分的あるいは有意にクエンチングされ得る。ペプチダーゼまたはプロテアーゼによるペプチドの切断の際に、蛍光の検出可能な増大が測定され得る（Ｋｎｉｇｈｔ，Ｃ．（１９９５）「Ｆｌｕｏｒｉｍｅｔｒｉｃ Ａｓｓａｙｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃ Ｅｎｚｙｍｅｓ」，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２４８：１８～３４）。

【０３０３】

本発明の標識抗体はまた、親和性精製剤として用いられてもよい。このプロセスでは、標識抗体は、当該分野で周知の方法を用いて、セファデックス樹脂または濾紙などの固相に固定される。固定された抗体を、精製される抗原を含んでいるサンプルと接触させ、その後、その支持体を、精製される抗原以外のサンプル中の実質的に全ての物質を取り除く適切な溶媒にて洗浄し、固定されたポリペプチド改変体に結合させる。最後に、支持体を別の適切な溶媒、例えばグリシン緩衝液、ｐＨ５．０にて洗浄して、その抗原をポリペプチド改変体から遊離させる。

【０３０４】

標識化試薬は、代表的には、（ｉ）標識抗体を形成するためにシステイン操作抗体のシステインチオールと直接反応し得るか、（ｉｉ）リンカー－標識中間生成物を形成するためにリンカー試薬と反応し得るか、または（ｉｉｉ）標識抗体を形成するためにリンカー抗体と反応し得る反応官能基を保有する。標識試薬の反応性官能基としては、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル（例えば、ＮＨＳ、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、２，６－ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、およびホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基も用いられてよい。

【０３０５】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチンまたは蛍光色素のカルボキシル置換基のＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル（ＮＨＳ）である。標識のＮＨＳエステルは予め形成しても、単離しても、精製しても、および／または特徴付けてもよく、あるいはインサイチュで形成して、抗体の求核基と反応させてもよい。代表的には、標識のカルボキシル型を、カルボジイミド試薬、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、またはユーロニウム試薬、例えば、ＴＳＴＵ（Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルユーロニウム　テトラフルオロボレート）、ＨＢＴＵ（Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルユーロニウム・ヘキサフルオロホスフェート）、またはＨＡＴＵ（Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルユーロニウム　ヘキサフルオロホスフェート）、活性化因子、例えば１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、およびＮ－ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組み合わせと反応させることによって活性化して、標識のＮＨＳエステルを得る。場合によって、標識のインサイチュ活性化および抗体との反応によって標識と抗体とをカップリングさせて、一工程で標識－抗体コンジュゲートを形成させてもよい。他の活性化試薬およびカップリング試薬としては、ＴＢＴＵ（２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾ－１－イル）－１－１，３，３－テトラメチルユーロニウム・ヘキサフルオロホスフェート）、ＴＦＦＨ（Ｎ，Ｎ’，Ｎ”，Ｎ’”－テトラメチルユーロニウム　２－フルオロ－ヘキサフルオロホスフェート）、ＰｙＢＯＰ（ベンゾトリアゾール－１－イル－オキシ－トリス－ピロリジノ－ホスホニウム　ヘキサフルオロホスフェート、ＥＥＤＱ（２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロ－キノリン）、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド）；ＤＩＰＣＤＩ（ジイソプロピルカルボジイミド）、ＭＳＮＴ（１－（メシチレン－２－スルホニル）－３－ニトロ－１Ｈ－１，２，４－トリアゾール、およびアリール　スルホニル　ハロゲン化物、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニル　クロライドが挙げられる。

【０３０６】

本発明のアルブミン結合ペプチド－Ｆａｂ化合物：

一局面では、本発明の抗体はアルブミン結合タンパク質に融合される。血漿－タンパク質の結合は、短い寿命の分子の薬物動態学的な特性を向上させる有効な手段であり得る。アルブミンは血漿中で最も豊富なタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド類（ＡＢＰ）は、組織取り込み、浸透および拡散の変更を含んでいる、融合した活性なドメインタンパク質の薬物動態を変更し得る。これらの薬物動態学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列を特異的に選別することによって調節され得る（米国特許出願公開第２００４０００１８２７号）。一連のアルブミン結合ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングによって特定された（Ｄｅｎｎｉｓら（２００２）「Ａｌｂｕｍｉｎ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ａｓ　Ａ　Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｓｔｒａｔｅｇｙ　Ｆｏｒ　Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ　Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ　Ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２７７：３５０３５－３５０４３；国際公開第０１／４５７４６号）。本発明の化合物としては、（ｉ）Ｄｅｎｎｉｓら（２００２）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２７７：３５０３５～３５０４３、表ＩＩＩおよびＩＶ，３５０３８頁、（ｉｉ）米国特許公開２００４０００１８２７の［００７６］配列番号９～２２、および（ｉｉｉ）国際公開第０１／４５７４６号の１２～１３頁に教示されるＡＢＰ配列が挙げられる、これらの文献は全て出典明記によって本明細書中に援用される。アルブミン結合（ＡＢＰ）－Ｆａｂは、１：１の化学量論比（１ＡＢＰ／１Ｆａｂ）で、Ｆａｂ重鎖のＣ末端にアルブミン結合ペプチドを融合させることによって操作される。アルブミンとのこれらＡＢＰ－Ｆａｂの会合により、抗体の半減期がウサギおよびマウスの２５倍以上に増加したことが示された。従って、上記の反応性のＣｙｓ残基をこれらＡＢＰ－Ｆａｂに導入し、細胞毒性薬物との部位特異的にコンジュゲーションに用い、その後にインビボ動物実験に用いてもよい。

【０３０７】

例示的なアルブミン結合ペプチド配列としては、限定するものではないが、配列番号８

０～８４に列挙されるアミノ酸配列が挙げられる：
ＣＤＫＴＨＴＧＧＧＳＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号８０
ＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号８１
ＱＲＬＩＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦ　配列番号８２
ＲＬＩＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤ　配列番号８３
ＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷ　配列番号８４

抗体－薬物コンジュゲート

別の局面では、本発明は、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素活性性毒素、またはそのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち放射性コンジュゲート）などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含んでいる、イムノコンジュゲート、または抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を提供する。別の局面では、本発明はさらに、イムノコンジュゲートの使用方法を提供する。一局面では、イムノコンジュゲートは、細胞毒性剤または検出可能な薬剤に共有結合した任意の上記の抗ＣＤ７９ｂ抗体を含む。

【０３０８】

一局面では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、別のＣＤ７９ｂ抗体によって結合されたＣＤ７９ｂ上の同じエピトープに結合する。別の実施形態では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製されたモノクローナル抗体、配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の可変ドメインを含んでいるモノクローナル抗体、または２００６年７月１１日にＡＴＣＣに寄託されたＰＴＡ－７７１２ハイブリドーマから作製されたいずれかの抗体の可変ドメインおよびＩｇＧ１由来の定常ドメインを含んでいるキメラ抗体、または配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の配列を含んでいるモノクローナル抗体の可変ドメインのＦａｂフラグメントによって結合されるＣＤ７９ｂ上の同じエピトープに結合する。別の実施形態では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、別のＣＤ７９ｂ抗体（すなわち、ＣＢ３．１（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃａｔａｌｏｇ＃５５５６７８；Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＡＴ１０５－１（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ　Ｃａｔａｌｏｇ　＃ＭＣＡ２２０８；Ｒａｌｅｉｇｈ，ＮＣ）、ＡＴ１０７－２（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ　Ｃａｔａｌｏｇ＃ＭＣＡ２２０９）、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃａｔａｌｏｇ　＃５５７５９２；Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ））によって結合されるＣＤ７９ｂ上の同じエピトープに結合する。

【０３０９】

別の局面では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、別のＣＤ７９ｂ抗体によって結合されたエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。別の実施形態では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製されたモノクローナル抗体、配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の可変ドメインを含んでいるモノクローナル抗体、または２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製されたいずれかの抗体の可変ドメインおよびＩｇＧ１由来の定常ドメインを含んでいるキメラ抗体、または配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の配列を含んでいるモノクローナル抗体の可変ドメインのＦａｂフラグメントによって結合されるエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。別の実施形態では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、別のＣＤ７９ｂ抗体（すなわち、ＣＢ３．１（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃａｔａｌｏｇ＃５５５６７８；Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＡＴ１０５－１（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ　Ｃａｔａｌｏｇ　＃ＭＣＡ２２０８；Ｒａｌｅｉｇｈ，ＮＣ）、ＡＴ１０７－２（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ　Ｃａｔａｌｏｇ＃ＭＣＡ２２０９）、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃａｔａｌｏｇ　＃５５７５９２；Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ））によって結合されるＣＤ７９ｂ上のエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。

【０３１０】

別の局面では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製されたモノクローナル抗体、配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の可変ドメインを含んでいるモノクローナル抗体、または２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製された抗体の可変ドメインおよびＩｇＧ１由来の定常ドメインを含んでいるキメラ抗体、または配列番号１０（図７）および配列番号１４（図８Ａ～Ｂ）の配列を含んでいるモノクローナル抗体の可変ドメインのＦａｂフラグメントとは異なる（すなわち、そのフラグメントではない）。別の実施形態では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、別のＣＤ７９ｂ抗体（すなわち、ＣＢ３．１（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃａｔａｌｏｇ＃５５５６７８；Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）、ＡＴ１０５－１（ＡｂＤ Ｓｅｒｏｔｅｃ Ｃａｔａｌｏｇ ＃ＭＣＡ２２０８；Ｒａｌｅｉｇｈ，ＮＣ）、ＡＴ１０７－２（ＡｂＤ Ｓｅｒｏｔｅｃ Ｃａｔａｌｏｇ＃ＭＣＡ２２０９）、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃａｔａｌｏｇ ＃５５７５９２；Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ））のＦａｂフラグメントとは異なる（すなわちそのフラグメントではない）。

【０３１１】

一局面では、本発明の抗体は、第一動物種のＣＤ７９ｂと特異的に結合して、第二動物種のＣＤ７９ｂとは特異的に結合しない。一実施形態では、この第一動物種はヒトおよび／または霊長類（例えばカニクイザル）であり、第二動物種はマウス（例えばマウス）および／またはイヌである。一実施形態では、この第一動物種はヒトである。一実施形態では、この第一動物種は霊長類、例えばカニクイザルである。一実施形態では、この第二動物種はネズミ科、例えばマウスである。一実施形態では、この第二動物種はイヌである。

【０３１２】

一局面では、本発明は、本発明の１つ以上の抗体およびキャリアを含んでいる組成物を提供する。一実施形態では、このキャリアは薬学的に受容可能である。

【０３１３】

一局面では、本発明は、本発明のＣＤ７９ｂ抗体をコードしている核酸を提供する。

【０３１４】

一局面では、本発明は、本発明の核酸を含んでいるベクターを提供する。

【０３１５】

一局面では、本発明は、本発明の核酸またはベクターを含んでいる宿主細胞を提供する。ベクターは、任意の種類、例えば発現ベクターなどの組換えベクターであってもよい。任意の種々の宿主細胞が用いられてもよい。一実施形態では、宿主細胞は原核細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉ．である。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞などの哺乳類の細胞である。

【０３１６】

一局面では、本発明は、本発明の抗体の作製方法を提供する。例えば、本発明は、ＣＤ７９ｂ抗体（本明細書で定義されるように、その全長およびフラグメントを含む）の作製方法を提供し、この方法は、適切な宿主細胞において、この抗体（またはそのフラグメント）をコードする本発明の組み換えベクターを発現させる工程と、この抗体を回収する工程とを包含する。

【０３１７】

一局面では、本発明は、容器と；この容器内に含まれる組成物とを備える製品を提供し、この組成物は本発明の１つ以上のＣＤ７９ｂ抗体を含む。一実施形態では、この組成物は本発明の核酸を含む。一実施形態では、抗体を含んでいる組成物はキャリアをさらに含み、いくつかの実施形態では、このキャリアは薬学的に受容可能である。一実施形態では、本発明の製品は、被験体に組成物（例えば、抗体）を投与するための説明書をさらに備える。

【０３１８】

一局面では、本発明は、本発明の１つ以上のＣＤ７９ｂ抗体を含んでいる組成物を含む

第一容器と、緩衝液を含んでいる第二容器とを備えるキットを提供する。一実施形態では、この緩衝液は薬学的に受容可能である。一実施形態では、アンタゴニスト抗体を含んでいる組成物はキャリアをさらに含み、いくつかの実施形態では、このキャリアは薬学的に受容可能である。一実施形態では、キットは、被験体に対してこの組成物（例えば、抗体）を投与するための説明書をさらに備える。

【０３１９】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明のＣＤ７９ｂ抗体の使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２０】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明の核酸の使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２１】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明のベクターの発現の使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２２】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明の宿主細胞の使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２３】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明の製品の使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２４】

一局面では、本発明は、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの疾患の治療的処置および／または予防的処置のための医薬の調製における本発明のキットの使用を提供する。一実施形態では、ガン、腫瘍、および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性Ｎ

ＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３２５】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖を阻害する方法を提供し、この方法は、この細胞と、本発明の抗体とを接触させる工程と、それによってこの細胞の増殖の阻害を生じる工程とを包含する。一実施形態ではこの抗体は細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３２６】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞を含んでいる癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法を提供し、この方法は、本発明の抗体の治療上有効な量をこの哺乳動物に投与する工程と、これによってこの哺乳動物を有効に処置する工程とを包含する。一実施形態ではこの抗体は細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３２７】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂの発現の増大に関連する細胞増殖性障害を処置または予防する方法を提供し、この方法は、このような処置の必要な被験体に対して本発明の抗体の有効な量を投与する工程と、これによってこの細胞増殖性障害を有効に処置または予防する工程とを包含する。一実施形態ではこの増殖性障害はガンである。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３２８】

一局面では、本発明は、細胞の増殖を阻害するための方法を提供し、ここではこの細胞の増殖は、ＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存しており、この方法は、この細胞と、本発明の抗体の有効量とを接触させる工程と、それによってこの細胞の増殖を阻害する工程とを包含する。一実施形態ではこの抗体は細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３２９】

一局面では、本発明は、哺乳動物における腫瘍を治療的に処置する方法を提供し、ここで、この腫瘍の増殖は、ＣＤ７９ｂの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存しており、この方法は、この細胞と、本発明の抗体の有効量とを接触させる工程と、それによってこの腫瘍を有効に処置する工程とを包含する。一実施形態ではこの抗体は細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３３０】

一局面では、本発明は、本明細書に記載のイムノコンジュゲート、受容可能な希釈剤、キャリアまたは賦形剤を含んでいる薬学的処方物を患者に投与する工程を包含する、ガンを処置する方法を提供する。一実施形態では、このガンは、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施形態では、患者は、抗体－薬物コンジュゲート化合物と組み合わせた細胞毒性剤を投与される。

【０３３１】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対するイムノコンジュゲートの結合を可能にする条件下で、本発明の抗体を含んでいるイムノコンジュゲートに対して細胞を曝露する工程を包含する、Ｂ細胞増殖を阻害する方法を提供する。一実施形態では、Ｂ細胞増殖は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施形態では、Ｂ細胞は

異種移植片である。一実施形態では、曝露はインビトロで起こる。一実施形態では、この曝露はインビボで起こる。

【０３３２】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを含んでいると疑われるサンプル中のＣＤ７９ｂの存在を決定する方法を提供し、この方法は、このサンプルを本発明の抗体に対して曝露する工程と、このサンプル中のＣＤ７９ｂに対するこの抗体の結合を測定する工程とを包含し、ここでこのサンプル中のＣＤ７９ｂに対するこの抗体の結合は、このサンプル中のこのタンパク質の存在の指標である。一実施形態では、このサンプルは生物学的サンプルである。さらなる実施形態では、この生物学的サンプルはＢ細胞を含む。一実施形態では、この生物学的サンプルは、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫を包含するＢ細胞障害および／またはＢ細胞増殖障害を経験しているかまたは経験していると疑われる哺乳動物由来である。

【０３３３】

一局面では、本発明は、Ｂ細胞などの細胞における増大に関連する細胞増殖性障害を診断するための方法を提供し、ＣＤ７９ｂの発現が提供され、この方法は、生物学的サンプル中の試験細胞と、任意の上記の抗体とを接触させる工程と；ＣＤ７９ｂに対するこの抗体の結合を検出することによってこのサンプル中の試験細胞に対して結合した抗体のレベルを測定する工程と；コントロールサンプル中の細胞に対して結合した抗体のレベルを比較する工程とを包含し、ここで結合した抗体のレベルは、試験およびコントロールのサンプル中のＣＤ７９ｂ発現細胞の数に対して正規化され、この試験サンプル中の結合した抗体のレベルがコントロールサンプルに比較して高いことは、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に関連する細胞増殖性障害の存在を示す。

【０３３４】

一局面では、本発明は、血液または血清中の可溶性ＣＤ７９ｂを検出する方法を提供し、この方法は、Ｂ細胞増殖性障害を被っていると疑われる哺乳動物由来の血液または血清の試験サンプルと、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体とを接触させる工程と、正常な哺乳動物由来の血液または血清のコントロールサンプルに対して試験サンプル中の可溶性ＣＤ７９ｂの増大を測定する工程とを包含する。ある実施形態では、検出する方法は、哺乳動物の血液または血清中の可溶性ＣＤ７９ｂの増大に関連するＢ細胞増殖性障害を診断する方法として有用である。

【０３３５】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に対して本発明の抗体を結合する方法を提供し、この方法は、この細胞と、本発明の抗体とを接触させる工程を包含する。一実施形態では、この抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされる。一実施形態では、この抗体は、増殖阻害剤にコンジュゲートされる。

【０３３６】

本発明の方法は、任意の適切な病理学的状態、例えば、ＣＤ７９ｂの発現に関連する細胞および／または組織に影響するように用いられ得る。一実施形態では、本発明の方法において標的化される細胞は造血系細胞である。例えば、造血系細胞は、リンパ球、白血球、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞からなる群より選択される細胞であってもよい。一実施形態では、本発明の方法で標的される細胞とは、Ｂ細胞またはＴ細胞である。一実施形態では、本発明の方法で標的される細胞はガン細胞である。例えば、ガン細胞は、リンパ腫細胞、白血病細胞または骨髄腫細胞からなる群より選択される細胞であってもよい。

【０３３７】

本発明の方法は、さらに追加の処置工程を包含し得る。例えば、一実施形態では、ある方法は、放射線療法または化学療法剤に対して標的化細胞および／または組織（例えば、

ガン細胞）を曝露する工程をさらに包含する。

【０３３８】

本明細書において記載される場合、ＣＤ７９ｂとは、Ｂ細胞レセプターのシグナル伝達成分である。従って、本発明の方法の一実施形態では、標的される細胞（例えば、ガン細胞）とは、ＣＤ７９ｂを発現しない細胞に比較してＣＤ７９ｂが発現されている細胞である。さらなる実施形態では、この標的化細胞は、ガン細胞であって、ここではＣＤ７９ｂ発現が同じ組織タイプの正常な非ガン細胞に比べて増強されているガン細胞である。一実施形態では、本発明の方法は、標的された細胞の死滅をもたらす。

【０３３９】

本発明の一局面では、本発明は、本明細書に記載の任意の抗体をコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、任意のこのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞または酵母であってもよい。さらに、本明細書中に記載の任意の抗体を産生するためのプロセスが提供され、このプロセスは、所望の抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程と、細胞培養物から所望の抗体を回収する工程とを包含する。

【０３４０】

なおさらなる局面では、本発明は、キャリアと組み合わせて、本明細書に記載のような抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでいる物質の組成物に関する。必要に応じて、このキャリアは薬学的に受容可能なキャリアである。

【０３４１】

本発明の別の局面は、抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体に対して反応性である状態の処置に有用な医薬の調製のための、本明細書に記載の抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の使用に関する。

【０３４２】

本発明の別の局面は、式Ｉの抗体－薬物化合物の混合物を含んでいる組成物であって、ここでは１抗体あたりの平均の薬物ローディングは約２～約５、または約３～約４である。

【０３４３】

本発明の別の局面は式ＩのＡＤＣ化合物、式ＩのＡＤＣ化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和化合物の混合物、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアもしくは賦形剤を含む薬学的組成物である。

【０３４４】

別の局面では、式ＩのＡＤＣ化合物および抗ガン特性または他の治療効果を有している第二の化合物を含んでいる薬学的な組み合わせが提供される。

【０３４５】

別の局面は、腫瘍細胞またはガン細胞を殺傷するかまたはその増殖を阻害するための方法であって、この方法は、この腫瘍細胞またはガン細胞を殺傷するかまたはその増殖を阻害するために有効である量の式Ｉの抗体－薬物コンジュゲート、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和化合物を用いてこの細胞を処理する工程を包含する。

【０３４６】

別の局面は、式ＩのＡＤＣを含んでいる薬学的組成物の治療上有効な量を患者に投与する工程を包含する、ガンを処置する方法である。

【０３４７】

別の局面としては製品、すなわち、キットが挙げられ、これのキットは、抗体－薬物コンジュゲートと、容器と、添付文書または処置を指示している表示とを備える。

【０３４８】

本発明の局面は、式Ｉの抗体薬物コンジュゲート化合物を作製するための方法であって、この方法は、以下の工程：（ａ）システイン操作された抗体の操作されたシステイン基と、リンカー試薬とを反応させて、抗体－リンカー中間生成物Ａｂ－Ｌを形成する工程と；（ｂ）Ａｂ－Ｌと活性化薬物部分Ｄとを反応させ；これによってこの抗体－薬物コンジ

ュゲートを形成する工程とを包含するか；または以下の工程：（ｃ）薬物部分の求核性基と、リンカー試薬とを反応させて、薬物－リンカー中間生成物Ｄ－Ｌを形成する工程と；（ｄ）Ｄ－Ｌとシステイン操作された抗体の操作されたシステイン基とを反応させ；これによってこの抗体－薬物コンジュゲートを形成する工程とを包含する。

【０３４９】

本発明の局面は、ガン細胞を検出するためのアッセイであって、このアッセイは以下を包含する：（ａ）システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬物コンジュゲートに対して細胞を曝露する工程と；（ｂ）この細胞に対するシステイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬物コンジュゲート化合物の結合の程度を測定する工程。

【０３５０】

Ａ．抗ＣＤ７９ｂ抗体

一実施形態では、本発明は、本明細書において治療剤としての用途が見出され得る抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体およびヘテロコンジュゲート抗体が挙げられる。

【０３５１】

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、関連抗原およびアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）または腹腔内（ｉｐ）注射によって、動物において上昇される。免疫されるべき種において免疫原性であるタンパク質に関連抗原（特に合成ペプチドが用いられる場合）をコンジュゲートさせることは有用でありうる。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシンインヒビターへ、二官能性剤または誘導体化剤、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（システイン残基を通じたコンジュゲーション）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を通じたコンジュゲーション）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、$SOCl_2$、または$R^1N=C=NR$（ここで、ＲおよびＲ^{1}は異なるアルキル基である）を用いてコンジュゲートさせてもよい。

【０３５２】

例えば、１００μｇまたは５μｇのタンパク質またはコンジュゲート（それぞれウサギまたはマウスの場合）を３容量のフロイント完全アジュバントと混合すること、そ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または誘導体に対して動物を免疫する。１ヵ月後、複数部位への皮下注射によりフロイント完全アジュバント中のペプチドまたは結合体の元の量の１／５～１／１０を用いて動物を追加免疫する。７～１４日後、その動物から採血し、その血清の抗体力価をアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物を追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中において作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤を適宜用いて、免疫応答を増強する。

【０３５３】

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、初めて記述されたハイブリドーマ法を用いて作製されてもよいし、または組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）により作製されてもよい。

【０３５４】

ハイブリドーマ法においては、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターを上記したように免疫して、免疫に用いられるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生可能であるリンパ球を誘発させる。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。免疫の後、リンパ球を単離し、次いで適切な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ細胞株と融合することにより、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，５９～１０３頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０３５５】
このように調製されたハイブリドーマ細胞を適切な培養培地中に播種して生育させるが、その培地は、好ましくは、融合していない親ミエローマ細胞（融合パートナーとも呼ばれる）の成長または生存を阻害する１つ以上の物質を含む。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠失している場合は、ハイブリドーマに対する選択培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み（ＨＡＴ培地）、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の生育を妨害する。

【０３５６】
好ましい融合パートナーであるミエローマ細胞は、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した高レベルの産生を支援し、そして融合してい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ものである。好ましいミエローマ細胞株は、マウスミエローマ株、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ＵＳＡより入手可能なＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍から得られるミエローマ、ならびにＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ，ＵＳＡより入手可能なＳＰ－２および誘導体、例えば、Ｘ６３－Ａｇ８－６５３細胞である。ヒトミエローマおよびマウス－ヒトヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；およびＢｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，５１～６３頁（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０３５７】
ハイブリドーマ細胞を生育させる培養培地は、抗原に対して指向されたモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。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、免疫沈降によってまたはインビトロの結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によって測定する。

【０３５８】
モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）に記載のスキャッチャード分析により測定できる。

【０３５９】
所望の特異性、親和性および／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が一旦同定されれば、限界希釈手順によりそのクローンをサブクローニングして、標準的な方法により生育させ得る（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９～１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。この目的のための適切な培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、例えば、マウスへの細胞のｉ．ｐ．注射により、動物における腹水腫瘍としてインビボで生育させてもよい。

【０３６０】
サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の抗体精製手順、例えば、アフィニティクロマトグラフィ（例えば、プロテインＡまたはプロテインＧ－セファロースを用いる）またはイオン交換クロマトグラフィ、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析など）などにより、培養培地、腹水または血清から適宜に分離される。

【０３６１】
モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブ

を用いることにより）容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなＤＮＡの好ましい起源となる。一旦、単離されると、そのＤＮＡは、発現ベクター内に入れられてもよく、次いでこのベクターが宿主細胞、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはそれ以外では抗体タンパク質を産生しないミエローマ細胞にトランスフェクトされることにより、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成が行われる。抗体をコードするＤＮＡの細菌における組換え発現に関する総説文献としては、Ｓｋｅｒｒａら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６～２６２（１９９３）およびＰｌｕｅｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．１３０：１５１～１８８（１９９２）が挙げられる。

【０３６２】

さらなる実施形態では、モノクローナル抗体または抗体フラグメントは、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２～５５４（１９９０）に記載の技術を用いて作製した抗体ファージライブラリーから単離できる。Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８（１９９１）およびＭａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１～５９７（１９９１）は、ファージライブラリーを用いた、それぞれマウスおよびヒトの抗体の単離を記載している。その後の出版物では、チェーン・シャッフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）のヒト抗体の産生（Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９～７８３（１９９２））ならびに極めて大型のファージライブラリーを構築するためのストラテジーとしてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え（Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２１：２２６５～２２６６（１９９３））が記載されている。このように、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替法である。

【０３６３】

抗体をコードするＤＮＡは、例えば、相同なマウス配列についてヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメイン（C_HおよびC_L）配列を置換することにより（米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１（１９８４））、または非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）についてコード配列の全部または一部に免疫グロブリンコード配列を融合することにより、キメラ抗体または融合抗体のポリペプチドが産生されるように改変してもよい。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について置換してもよいし、またはそれらの配列を抗体の１つの抗原複合化部位の可変ドメインについて置換することにより、抗原に対する特異性を有する１つの抗原複合化部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原複合化部位を含んでいるキメラ２価抗体を作製してもよい。

【０３６４】

３．ヒト抗体およびヒト化抗体

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体としてはさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を挙げることができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンから得られる最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、抗体のＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$または他の抗原結合サブ配列）である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を包含し、これにおいては、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）に由来する残基が所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲに由来する残基で置き換えられている。一部の場合においては、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り置き換えられている。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲ配列またはフレームワーク配列のいずれにも見出されない残基を含んでよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、代表的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、これにおいては、ＣＤＲ領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に相当し、そしてＦＲ領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のＦＲ領域である。ヒト化抗体はま

た、必要に応じてさらに免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分、代表的には、ヒト免疫グロブリンのＦｃ領域を含む［Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２～５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３～３２９（１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３～５９６（１９９２）］。

【０３６５】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源からそれに導入された１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と呼ばれ、これらは、代表的には、「移入」可変ドメインに由来する。ヒト化は、本質的には、げっ歯類のＣＤＲまたはＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列と置換することにより、Ｗｉｎｔｅｒおよび共同研究者らの方法［Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２～５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３～３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４～１５３６（１９８８）］に従って実施してもよい。従って、そのような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が非ヒト種由来の対応する配列により置換されているキメラ抗体（米国特許第４，８１６，５６７号）である。実際、ヒト化抗体とは、代表的には、ある程度のＣＤＲ残基および恐らくは、ある程度のＦＲ残基が、げっ歯類抗体における類似の部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。

【０３６６】

ヒト化抗体の作製において用いられる軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗体がヒトの治療上の使用を意図している場合は、抗原性およびＨＡＭＡ（ヒト抗マウス抗体）応答を低減するために極めて重要である。ＨＡＭＡ反応の低減または排除は、適切な治療剤の臨床開発の重要な局面である。例えば、Ｋｈａｘｚａｅｌｉら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．（１９８８），８０：９３７；Ｊａｆｆｅｒｓら、Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ（１９８６），４１：５７２；Ｓｈａｗｌｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９８５），１３５：１５３０；Ｓｅａｒｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｍｏｄ．（１９８４），３．１３８；Ｍｉｌｌｅｒら、Ｂｌｏｏｄ（１９８３），６２：９８８；Ｈａｋｉｍｉら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９１），１４７：１３５２；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ（１９８８），３３２：３２３；Ｊｕｎｇｈａｎｓら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（１９９０），５０：１４９５を参照のこと。本明細書に記載するとおり、本発明はＨＡＭＡ応答が低減または排除されるようにヒト化されている抗体を提供する。これらの抗体の改変体は、下に詳述する当該分野で公知の慣用的方法を用いてさらに得ることができる。いわゆる「ベストフィット法」によれば、げっ歯類の動物抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。げっ歯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領域（ＦＲ）をヒト化抗体のために受け入れる（Ｓｉｍｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２２９６（１９９３）；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１（１９８７））。別の方法では、軽鎖また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用いる。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に用いてもよい（Ｃａｒｔｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；Ｐｒｅｓｔａら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２６２３（１９９３））。

【０３６７】

例えば、本明細書に記載される抗体に由来するアミノ酸配列は、フレームワークおよび／または超可変配列（単数または複数）の多様化のための出発（親）配列として機能できる。出発超可変配列が連結されている選択されたフレームワーク配列は本明細書においては、アクセプターヒトフレームワークと称される。アクセプターヒトフレームワークは、ヒト免疫グロブリン（そのＶＬおよび／またはＶＨ領域）由来であってもよいし、またはこれから誘導されてもよいが、好ましくはアクセプターヒトフレームワークは、ヒトコン

センサスフレームワーク配列由来であるか、またはこれから誘導され、その理由はそのようなフレームワークはヒト患者における免疫原性が最小限であるか、または皆無であることがわかっているためである。

【０３６８】

アクセプターがヒト免疫グロブリンから誘導される場合は、必要に応じて、ヒトフレームワーク配列のコレクション中の種々のヒトフレームワーク配列とドナーフレームワーク配列とをアラインメントさせることによりこのドナーフレームワーク配列への自身の相同性に基づいて選択されたヒトフレームワーク配列を選択し、アクセプターとして最も相同性であるフレームワーク配列を選択してよい。

【０３６９】

一実施形態では、本明細書のヒトコンセンサスフレームワークは、ＶＨサブグループＩＩおよび／またはＶＬκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列由来であるか、または、それから誘導される。

【０３７０】

従って、ＶＨアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列のうちの１つ、２つ、３つまたは全てであってもよい：
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳ（配列番号６９）を含むＦＲ１、
ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ（配列番号７０）を含むＦＲ２、
ＦＲ３を含むＦＲ３であって、ＲＦＴＩＳＸ$_1$ＤＸ$_2$ＳＫＮＴＸ$_3$ＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ（配列番号７３）を含み、ここでＸ$_1$はＡまたはＲであり、Ｘ$_2$はＴまたはＮであり、かつＸ$_3$はＡまたはＬである、ＦＲ３
ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号７２）を含むＦＲ４。

【０３７１】

ＶＨコンセンサスフレームワークの例としては以下が挙げられる：
ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔのＣＤＲ（配列番号３６）；
ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号３７～３９）；
ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔのＣＤＲ（配列番号４０）；
ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４１～４３）；
ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔのＣＤＲ（配列番号４４）；
ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４５～４７）；
ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスＫａｂａｔのＣＤＲ（配列番号４８）；
ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号４９～５０）；
ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナスＫａｂａｔのＣＤＲ（配列番号５１）；または
ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナス伸長された超可変領域（配列番号５２～５４）。

【０３７２】

一実施形態では、ＶＨアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列のうち１つ、２つ、３つまたは全てを含む：
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳ（配列番号６９）を含んでいるＦＲ１、
ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ（配列番号７０）を含んでいるＦＲ２、
ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ（配列番号７１）を含

んでいるＦＲ３、
ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡ（配列番号７４）、
ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号７５）
、
ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＳ（配列番号７６）、
または
ＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＳＲ（配列番号７７）
ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号７２）を含んでいるＦＲ４。
【０３７３】
ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列のうち１つ、２つ、３つまたは全てを含んでもよい：
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ（配列番号６５）を含んでいるＦＲ１
、
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号６６）を含んでいるＦＲ２、
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号６７）
を含んでいるＦＲ３、
ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号６８）を含んでいるＦＲ４。
【０３７４】
ＶＬコンセンサスフレームワークの例としては以下が挙げられる：
ヒトＶＬκサブグループＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５５）；
ヒトＶＬκサブグループＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５６）；
ヒトＶＬκサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク（配列番号５７）；または
ヒトＶＬκサブグループＩＶコンセンサスフレームワーク（配列番号５８）。
【０３７５】
アクセプターは、ヒト免疫グロブリンまたはヒトコンセンサスフレームワーク由来であるかにかかわらず、選択されたヒトフレームワーク配列に対して配列が同一であってもよいが、本発明は、ヒト免疫グロブリン配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列に対する既存のアミノ酸置換をアクセプター配列が含んでもよいものとする。これらの既存の置換は好ましくは最小限；通常はヒト免疫グロブリン配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して、通常は４つ、３つ、２つまたは１個のアミノ酸が相違するのみである。
【０３７６】
非ヒト抗体の超可変領域残基は、ＶＬおよび／またはＶＨアクセプターヒトフレームワーク内に取り込まれる。例えば、ＫａｂａｔのＣＤＲ残基、Ｃｈｏｔｈｉａの超可変ループ残基、Ａｂｍの残基および／または接触残基に相当する残基を取り込んでよい。必要に応じて、以下のような伸長超可変領域残基、２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）、２６～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～６５、４７～６５または４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２、９４～１０２または９５～１０２（Ｈ３）が取り込まれる。
【０３７７】
超可変領域残基の「取り込み」を本明細書において考察しているが、当然ながらこれは種々の方法で達成することが可能で、例えば、所望のアミノ酸配列をコードする核酸は、自身のフレームワーク領域がアクセプターヒトフレームワーク領域に変化するようにマウス可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異させることによるか、または、超可変ドメインの残基が非ヒト残基に変化するようにヒト可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異させることによるか、または、所望の配列をコードする核酸を合成することによるなどによって、作製してもよい。
【０３７８】
本明細書の実施例においては、超可変領域グラフト改変体は各々の超可変領域に対する別個のオリゴヌクレオチドを用いて、ヒトアクセプター配列をコードする核酸のＫｕｎｋ

ｅｌ突然変異誘発により作成した。Ｋｕｎｋｅｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５４：３６７～３８２（１９８７）。適切な変化は適切な超可変領域抗原相互作用を補正して再構築するための日常的な手法を用いてフレームワークおよび／または超可変領域内に導入してもよい。

【０３７９】

ファージ（ミド）ディスプレイ（本明細書においては一部の観点においてファージディスプレイとも称する）は、配列無作為化により作成されたライブラリー内に多くの異なる潜在的改変体抗体を作成し、かつスクリーニングするための好都合で迅速な方法として使用できる。しかしながら、改変された抗体を作成してスクリーニングするための他の方法も当業者には利用可能である。

【０３８０】

ファージ（ミド）ディスプレイの技術は抗原のようなリガンドに結合する新規なタンパク質を作成して選択するための強力な手段を提供している。ファージ（ミド）ディスプレイの技術を用いて、高い親和性を有する標的分子に結合する配列を迅速にソーティングしてもよいタンパク質改変体の大型ライブラリーの作成が可能になる。改変体ポリペプチドをコードする核酸は一般的に、遺伝子ＩＩＩタンパク質または遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のようなウイルスのコートタンパク質をコードする核酸配列に融合される。タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸配列が遺伝子ＩＩＩタンパク質の一部分をコードする核酸配列に融合されている１価のファージミドディスプレイが開発されている（Ｂａｓｓ，Ｓ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９（１９９０）；Ｌｏｗｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ａ　Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，３：２０５（１９９１））。１価のファージミドディスプレイ系においては、遺伝子融合は低水準で発現され、そして野生型の遺伝子ＩＩＩタンパク質もまた粒子の感染性が保持されるように発現される。ペプチドライブラリーを作成し、そのライブラリーをスクリーニングする方法は、多くの特許において開示されている（例えば米国特許第５，７２３，２８６号、米国特許第５，４３２，０１８号、米国特許第５，５８０，７１７号、例えば米国特許第５，４２７，９０８号および米国特許第５，４９８，５３０号）。

【０３８１】

抗体または抗原結合ポリペプチドのライブラリーは、ランダムなＤＮＡ配列の挿入によって単一遺伝子を変更することによって、または、関連遺伝子のファミリーのクローニングによって、などの多くの方法において作製されている。ファージ（ミド）ディスプレイを用いて抗体または抗原結合フラグメントを提示するための方法は米国特許第５，７５０，３７３号、同第５，７３３，７４３号、同第５，８３７，２４２号、同第５，９６９，１０８号、同第６，１７２，１９７号、同第５，５８０，７１７号、および同第５，６５８，７２７号に記載されている。次いで、所望の特性を有する抗体または抗原結合タンパク質の発現があるか、ライブラリーをスクリーニングする。

【０３８２】

テンプレート核酸内へ選択されたアミノ酸を置き換える方法は、当該分野で十分確立されており、その一部は本明細書に記載されるとおりである。例えば、超可変領域残基は、Ｋｕｎｋｅｌ法を用いて置換してもよい。例えば、Ｋｕｎｋｅｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５４：３６７～３８２（１９８７）を参照のこと。

【０３８３】

オリゴヌクレオチドの配列は、改変すべき超可変領域残基に対して設計されたコドンセット１つ以上を包含する。コドンセットは所望の改変体アミノ酸をコードするために用いられる種々のヌクレオチドの三つ組（トリプレット）配列のセットである。コドンセットは、ＩＵＢコードに従って以下に示すとおり、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を指定する文字を用いて表示してもよい。

【０３８４】

ＩＵＢコード

Ｇ　グアニン
Ａ　アデニン
Ｔ　チミン
Ｃ　シトシン
Ｒ（ＡまたはＧ）
Ｙ（ＣまたはＴ）
Ｍ（ＡまたはＣ）
Ｋ（ＧまたはＴ）
Ｓ（ＣまたはＧ）
Ｗ（ＡまたはＴ）
Ｈ（ＡまたはＣまたはＴ）
Ｂ（ＣまたはＧまたはＴ）
Ｖ（ＡまたはＣまたはＧ）
Ｄ（ＡまたはＧまたはＴ）Ｈ
Ｎ（ＡまたはＣまたはＧまたはＴ）。

【０３８５】

例えば、コドンセットＤＶＫにおいて、ＤはアヌクレオチドＡまたはＧまたはＴであってもよく；ＶはＡまたはＧまたはＣであってもよく；そしてＫはＧまたはＴであってもよい。このコドンセットは１８種の異なるコドンに相当し得、そしてアミノ酸Ａｌａ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｙｓ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、ＧｌｙおよびＣｙｓをコードし得る。

【０３８６】

オリゴヌクレオチドまたはプライマーセットは標準的な方法を用いて合成できる。あるセットのオリゴヌクレオチドは、例えば、コドンセットにより与えられる全ての可能な組み合わせのヌクレオチドの三つ組に相当し、アミノ酸の所望のグループをコードする配列を含有する固相合成により合成してもよい。特定の位置において選択されたヌクレオチド「縮重度」を有するオリゴヌクレオチドの合成は当該分野で周知である。特定のコドンセットを有するヌクレオチドのこのようなセットは市販の核酸合成装置（例えばＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡより入手可能）を用いて合成してもよいし、または、市販品を購入してもよい（例えばＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤより入手）。従って、特定のコドンセットを有する合成されたオリゴヌクレオチドのセットは、代表的には異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを包含し、その相違は、全体的配列内のコドンセットにより確立される。オリゴヌクレオチドは、本発明に従って用いる場合は、可変ドメイン核酸テンプレートへのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、そしてクローニング目的のための制限酵素部位を包含してもよい。

【０３８７】

１つの方法においては、改変体アミノ酸をコードする核酸配列はオリゴヌクレオチド媒介の突然変異誘発により作成できる。この技術はＺｏｌｌｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１０：６４８７～６５０４（１９８７）に記載されているとおり当該分野で周知である。要するに、ＤＮＡテンプレートに対して所望のコドンセットをコードするオリゴヌクレオチドセットをハイブリダイズさせることにより、改変体アミノ酸をコードする核酸配列を作成し、ここでは、テンプレートは可変領域核酸テンプレート配列を含有するプラスミドの１本鎖形態である。ハイブリダイゼーションの後、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、テンプレートの完全な第２の相補鎖を合成し、これがオリゴヌクレオチドプライマーを取り込むことになり、そしてオリゴヌクレオチドセットにより提供されるコドンセットを含有することになる。

【０３８８】

一般的に、少なくとも２５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを用いる。最適のオリゴヌクレオチドは、突然変異（単数または複数）をコードするヌクレオチド（単数または

複数）のいずれか側のテンプレートに完全に相補的である１２～１５ヌクレオチドを有する。これによって、オリゴヌクレオチドは１本鎖ＤＮＡテンプレート分子に適切にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、Ｃｒｅａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７５：５７６５（１９７８）に記載のもののような当該分野で公知の技術を用いて容易に合成される。

【０３８９】

ＤＮＡテンプレートは、バクテリオファージＭ１３ベクター（市販品のＭ１３ｍｐ１８およびＭ１３ｍｐ１９ベクターが適している）から誘導されるベクター、または、Ｖｉｅｒａら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：３（１９８７）により記載されている１本鎖ファージの複製起点を含有するベクターにより作製される。従って、突然変異されるべきＤＮＡをこれらのベクターの１つに挿入することにより１本鎖テンプレートを作成してもよい。１本鎖テンプレートの製造は、上記Ｓａｍｂｒｏｏｋら、のセクション４．２１～４．４１に記載されている。

【０３９０】

天然のＤＮＡ配列を改変するためには、オリゴヌクレオチドを適切なハイブリダイゼーション条件下で１本鎖テンプレートにハイブリダイズさせる。ＤＮＡ重合酵素、通常はＴ７ＤＮＡポリメラーゼまたはＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗフラグメントを次に添加することにより、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いながらテンプレートの相補鎖を合成する。このようにして、ＤＮＡの一方の鎖が遺伝子１の突然変異した型をコードし、そして他方の鎖（元のテンプレート）が遺伝子１の天然の未改変の配列をコードするようなヘテロ２本鎖分子が形成される。次にこのヘテロ２本鎖分子を適切な宿主細胞、通常は原核生物、例えばＥ．ｃｏｌｉのＪＭ１０１内に形質転換する。細胞を成育させた後、それらをアガロースプレートにプレートして、３２－ホスフェートで放射標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングすることによって、突然変異したＤＮＡを含有する細菌コロニーを特定する。

【０３９１】

すぐ上記した方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異（単数または複数）を含有する、ホモ２本鎖分子が形成されるように改変してもよい。この改変は以下のとおり行う：１本鎖オリゴヌクレオチドを上記したとおり１本鎖テンプレートにアニーリングする。３種のデオキシリボヌクレオチド、すなわちデオキシリボアデノシン（ｄＡＴＰ）、デオキシリボグアノシン（ｄＧＴＰ）およびデオキシリボチミジン（ｄＴＴ）の混合物をｄＣＴＰ－（ａＳ）と称される修飾チオデオキシリボシトシン（Ａｍｅｒｓｈａｍから入手可能）と組み合わせる。この混合物をテンプレート－オリゴヌクレオチド複合体に添加する。この混合物にＤＮＡポリメラーゼを添加すると、突然変異した塩基以外はテンプレートと同一のＤＮＡ鎖が形成される。さらに、ＤＮＡのこの新しい鎖はｄＣＴＰの代わりにｄＣＴＰ－（ａＳ）を含んでおり、このため、制限エンドヌクレアーゼによる消化から保護される。２本鎖のヘテロ二重鎖のテンプレート鎖が適切な制限酵素でニック処理された後、テンプレート鎖をＥｘｏＩＩＩヌクレアーゼまたは別の適切なヌクレアーゼにより、突然変異誘発すべき部位（単数または複数）を含む領域を過ぎた部分で消化してもよい。次に反応を停止して一部分だけが１本鎖となった分子を残す。次に４種全てのデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート、ＡＴＰおよびＤＮＡリガーゼの存在下ＤＮＡポリメラーゼを用いて、完全な２本鎖のＤＮＡホモ２本鎖を形成する。このホモ２本鎖分子を次に適切な宿主細胞中に形質転換する。

【０３９２】

上記したとおり、オリゴヌクレオチドセットの配列はテンプレート核酸にハイブリダイズするために十分な長さのものであり、そしてまた、必須ではないが、制限部位を含んでもよい。ＤＮＡテンプレートはバクテリオファージＭ１３ベクターから誘導されるベクター、または、Ｖｉｅｒａら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：３（１９８７）により記載されている１本鎖ファージの複製起点を含有するベクターにより生成され得る。このように、突然変異されるべきＤＮＡをこれらのベクターの１つに挿入することにより１

本鎖テンプレートを作成しなければならない。１本鎖テンプレートの製造は、上記Ｓａｍｂｒｏｏｋら、のセクション４．２１～４．４１に記載されている。

【０３９３】

別の方法によれば、抗原結合は、修復された超可変領域の選択を通じて抗体のヒト化の間に復旧され得る（２００５年２月１８日出願の出願番号１１／０６１，８４１号を参照のこと）。この方法は、アクセプターフレームワーク上に非ヒト超可変領域を組み込む工程と、さらに、このアクセプターフレームワーク配列を改変することなく１つ以上の超可変領域において１つ以上のアミノ酸置換を導入する工程とを包含する。あるいは、１つ以上のアミノ酸置換の導入は、アクセプターフレームワーク配列における改変によって達成してもよい。

【０３９４】

別の方法によれば、ライブラリーは、各々のセットが異なる配列のオリゴヌクレオチドの複数を有する、上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを与えることにより形成することができ、この異なる配列はオリゴヌクレオチドの配列内に与えられるコドンセットにより確立される。可変ドメインテンプレート核酸配列に沿った上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを、ポリメラーゼ連鎖反応において用いることによってＰＣＲ産物の「ライブラリー」を形成してもよい。ＰＣＲ産物は、確立された分子生物学の技術を用いて、他の関連または未関連の核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質および２量体化ドメインとそれらが融合できることから、「核酸カセット」と称してもよい。

【０３９５】

ＰＣＲプライマーの配列は、超可変領域内の溶媒接触可能な高度に多様な位置に対して、設計されたコドンセット１つ以上を包含する。上記したとおり、コドンセットは、所望の変異体アミノ酸をコードするために用いられる異なるヌクレオチドの三つ組配列のセットである。

【０３９６】

適切なスクリーニング／選択工程を通じて選択された、所望の基準に合致する抗体の選択可能物は、標準的な組み換え手法を用いて単離し、そしてクローニングしてもよい。

【０３９７】

抗原に対する高い結合親和性および他の望ましい生物学的特性を保持しながら抗体をヒト化させることがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析のプロセスにより、ヒト化抗体が調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、当業者によく知られているものである。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元高次構造を図示して表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を精査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際の残基の可能性のある役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能になる。このようにして、ＦＲ残基を、レシピエントおよび移入配列から選択して組み合わせることが可能であり、その結果、所望の抗体特性、例えば、標的抗原（単数または複数）に対して増大した親和性が達成される。一般に、超可変領域残基が、抗原結合への影響において、直接、そして最も実質的に関与する。

【０３９８】

種々の形態のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体が想定される。例えば、ヒト化抗体は、抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ）であってもよく、これは、必要に応じて、イムノコンジュゲートを形成するために１個以上の細胞毒性剤（単数または複数）とコンジュゲートされる。あるいは、ヒト化抗体は、インタクトな抗体、例えば、インタクトなＩｇＧ１抗体であってもよい。

【０３９９】

ヒト化の代替として、ヒト抗体が作製され得る。例えば、内因性免疫グロブリン産生のない状況下においてヒト抗体の完全なレパートリーを、免疫の際に産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが現在可能である。例えば、キメラマウ

スおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（J_H）遺伝子のホモ接合性の欠失は、内因性の抗体産生の完全な抑制をもたらすことが記載されている。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイをそのような生殖細胞系変異マウスへの移入することは、抗原チャレンジ時のヒト抗体の産生をもたらすことになる。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５～２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎら、Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏ．７：３３（１９９３）；米国特許第５，５４５，８０６号、同第５，５６９，８２５号、同第５，５９１，６６９号（全てＧｅｎＰｈａｒｍ）；同第５，５４５，８０７号；および国際公開第９７／１７８５２号を参照のこと。

【０４００】

あるいは、ファージディスプレイ技術（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５３［１９９０］）を用いることにより、免疫されていないドナー由来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ヒト抗体およびヒト抗体フラグメントをインビトロで作製してもよい。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子を糸状バクテリオファージ、例えば、Ｍ１３またはｆｄの主要なまたはマイナーなコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上の機能的抗体フラグメントとして提示させる。糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含むため、抗体の機能的特性に基づいた選択もまた、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。すなわち、ファージは、Ｂ細胞の特性のうちいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｋｅｖｉｎ Ｓ．およびＣｈｉｓｗｅｌｌ，Ｄａｖｉｄ Ｊ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：５６４～５７１（１９９３）において概説されている種々の形式で実施できる。Ｖ遺伝子セグメントのいくつかの起源をファージディスプレイのために用いることができる。Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８（１９９１）では、免疫したマウスの脾臓から得られたＶ遺伝子の小型のランダムなコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫されていないヒトドナー由来のＶ遺伝子のレパートリーを構築することが可能で、そして抗原の多様なアレイ（自己抗原を含む）に対する抗体を、Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１～５９７（１９９１）またはＧｒｉｆｆｉｔｈら、ＥＭＢＯ Ｊ．１２：７２５～７３４（１９９３）により記載された技術に本質的に従って単離してもよい。米国特許第５，５６５，３３２号および同第５，５７３，９０５号も参照のこと。

【０４０１】

上記したように、ヒト抗体はまた、インビトロでの活性化されたＢ細胞により作製され得る（米国特許第５，５６７，６１０号および同第５，２２９，２７５号を参照のこと）。

【０４０２】

４．抗体フラグメント

特定の状況において、抗体全体ではなく、抗体フラグメントを用いることが有利である。より小さいサイズのフラグメントによって、迅速なクリアランスが可能になり、そして固形腫瘍への向上した到達がもたらされ得る。

【０４０３】

抗体フラグメントの作製のための種々の技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化に由来していた（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４：１０７～１１７（１９９２）；およびＢｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照のこと）。しかしながら、これらのフラグメントは、現在、組換え宿主細胞により直接作製することができる。Ｆａｂ、ＦｖおよびＳｃＦｖ抗体フラグメントは全て、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて発現させ、これ

より分泌させることができ、これにより、大量のこれらのフラグメントを効率的に産生できる。抗体フラグメントは、上記した抗体ファージライブラリーから単離できる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントを直接、Ｅ．ｃｏｌｉから回収し、化学的に結合してＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成することができる（Ｃａｒｔｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３－１６７（１９９２）。別のアプローチによれば、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離できる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含むインビボ半減期が延長したＦａｂおよびＦ（ａｂ）$_2$フラグメントは、米国特許第５，８６９，０４６号に記載されている。抗体フラグメントの産生のための他の技術は、当業者に明らかである。他の実施形態では、選択された抗体は、一本鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）である。国際公開第９３／１６１８５号；米国特許第５，５７１，８９４号；および米国特許第５，５８７，４５８号を参照のこと。ＦｖおよびｓＦｖは、定常領域を欠いたインタクトな複合化部位を有する唯一の種であり；すなわち、それらは、インビボにおける使用の間の低い非特異的結合に適している。ｓＦｖ融合タンパク質を構築することにより、ｓＦｖのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパク質を融合させてよい。Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，編集、Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ，前出を参照のこと。抗体フラグメントはまた、例えば、米国特許第５，６４１，８７０号に記載の「線状抗体」であってもよい。このような線状抗体フラグメントは、単一特異性であっても、または二重特異性であってもよい。

【０４０４】

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する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、本明細書中に記載されるＣＤ７９ｂタンパク質の２つの異なるエピトープに結合することができる。他のそのような抗体は、ＣＤ７９ｂ結合部位を、別のタンパク質についての結合部位と組み合わせることができる。あるいは、ＣＤ７９ｂを発現している細胞に対して細胞性の防御機構を集中させ、かつ局在化させるために、抗ＣＤ７９ｂアームを、Ｔ細胞レセプター分子のような白血球上の誘引分子（ｔｒｉｇｇｅｒｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌｅ）（例えば、ＣＤ３）、またはＩｇＧについてのＦｃレセプター（ＦｃγＲ）（例えば、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）、およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６））に結合するアームと組み合わせてもよい。二重特異性抗体はまた、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に対して、細胞毒性薬を局在化させるために用いてもよい。これらの抗体は、ＣＤ７９ｂ結合アームと、細胞毒性剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン－α、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート、または放射性同位体ハプテン）に結合するアームとを保有している。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調製できる。

【０４０５】

国際公開第９６／１６６７３号は、二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩＩＩ抗体を記載しており、そして米国特許第５，８３７，２３４号は、二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩ抗体を開示している。二重特異性抗ＥｒｂＢ２／Ｆｃα抗体は、国際公開第９８／０２４６３号に示されている。米国特許第５，８２１，３７７号は、二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＣＤ３抗体を教示している。

【０４０６】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の従来の作製は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づいており、その場合、２つの鎖は、異なる特異性を有する（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７～５３９（１９８３））。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな取合せに起因して、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、そのうちわずか１種のみが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティクロマトグラフィ工程により行われる正しい分子の精製は、かなり面倒であり、そして生成物収率は低い。同様の手順が国際公開第９３／０８８２９号およびＴｒａ

ｕｎｅｃｋｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ，１０：３６５５～３６５９（１９９１）に開示されている。

【０４０７】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体抗原複合化部位）を、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。好ましくは、融合は、少なくとも一部のヒンジ、C_H2およびC_H3領域を含んでいるＩｇ重鎖定常ドメインと行う。融合物の少なくとも１つにおいて存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第１の重鎖定常領域（C_H1）を有することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望であれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡを、別々の発現ベクターに挿入し安定な宿主細胞に同時トランスフェクトする。これにより、構築において用いられる３種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場合、その３種のポリペプチドフラグメントの相互の割合を調節する際に広範な柔軟性がもたらされる。しかしながら、等しい比率における少なくとも２つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、または比率が所望の鎖の組み合わせの収率に有意に影響しない場合は、単一の発現ベクター内に２つまたは３つ全てのポリペプチド鎖に関するコード配列を挿入することが可能である。

【０４０８】

このアプローチの好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームにおいて第１の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおいてハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対（第２の結合特異性をもたらす）から構成される。この非対称の構造は、二重特異性分子の片方にのみ免疫グロブリン軽鎖が存在することにより、分離の効率的方法が提供されるため、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物を分離することを容易にすることが見出された。このアプローチは、国際公開第９４／０４６９０号に開示されている。二重特異性抗体の作製のさらに詳細な説明は、例えば、Ｓｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １２１：２１０（１９８６）を参照のこと。

【０４０９】

米国特許第５，７３１，１６８号に記載の別のアプローチによれば、抗体分子対の間の境界面を操作することにより、組換え細胞培養から回収されるヘテロ２量体の割合を最大限にすることができる。好ましい界面は、C_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第１の抗体分子の界面に由来する１つ以上の小型アミノ酸側鎖をより大きい鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換える。大型の側鎖（単数または複数）と同一または同様のサイズの代償的な「空洞」が、大型のアミノ酸側鎖をより小さいもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）と置き換えることによって、第２の抗体分子の界面上に形成される。これによって、ホモ２量体などの他の望ましくない最終生成物よりもヘテロ２量体の収率を増大させるための機序が提供される。

【０４１０】

二重特異性抗体としては、架橋結合された抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体が挙げられる。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体の一方をアビジンに、そして他方をビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞を標的するため（米国特許第４，６７６，９８０号）およびＨＩＶ感染の処置のため（国際公開第９１／００３６０号、国際公開第９２／２００３７３および欧州特許第０３０８９号）に提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合な架橋結合法を用いて作製され得る。適切な架橋結合剤は、当該分野で周知であり、そして多くの架橋結合の技術と共に米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０４１１】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を作製するための技術もまた、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、キメラ連結を用いて調製できる。Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体をタンパク質分解的に切断して$F(ab')_2$フラグメントを作製する手順を記載している。これらのフラグメ

ントをジチオール錯化剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元することにより、隣接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィドの形成を妨害する。次に、形成されたＦａｂ’フラグメントをチオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換する。次に、Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の１つを、メルカプトエチルアミンで還元することによりＦａｂ’－チオールに再変換して、等モル量の他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合することにより、二重特異性抗体を形成する。生成した二重特異性抗体を、酵素の選択的固定化のための薬剤として用いてもよい。

【０４１２】

最近の進歩により、化学的に結合することにより二重特異性抗体を形成することができる、Ｅ．ｃｏｌｉからのＦａｂ’－ＳＨフラグメントの直接の回収が容易になっている。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（ａｂ’）$_2$分子の作製を記載している。各々のＦａｂ’フラグメントを別個にＥ．ｃｏｌｉから分泌させ、インビトロの指向性化学カップリングに供することにより、二重特異性抗体を作製した。このようにして形成された二重特異性抗体は、ＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトＴ細胞に結合することが可能で、同様にヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性をトリガーすることも可能であった。

【０４１３】

組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体フラグメントを作製して単離する種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８（５）：１５４７～１５５３（１９９２）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合により２種の異なる抗体のＦａｂ’部分に連結した。その抗体のホモ２量体を、ヒンジ領域で還元することによりモノマーを形成し、次に、再び酸化して抗体ヘテロ２量体を形成させた。この方法はまた、抗体ホモ２量体の産生にも利用できる。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４～６４４８（１９９３）に記載の「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替的な機序を提供している。そのフラグメントは、同じ鎖の２ドメイン間の対形成を可能とするには短すぎるリンカーによってV_Lに接続されたV_Hを含む。従って、１つのフラグメントのV_HドメインおよびV_Lドメインが別のフラグメントの相補的なV_LドメインおよびV_Hドメインに強制的に対形成させられ、これにより２つの抗原結合部位が形成される。一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）２量体の使用による二重特異性抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーも報告されている。Ｇｒｕｂｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照のこと。

【０４１４】

２価より多価の抗体も企図される。例えば、３重特異性抗体が作製され得る。Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

【０４１５】

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、本発明の範囲内に含まれる。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構成される。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞を標的するため［米国特許第４，６７６，９８０号］およびＨＩＶ感染の処置のため［国際公開第９１／００３６０号、国際公開第９２／２００３７３号および欧州特許第０３０８９号］に提案されている。この抗体は、架橋結合剤に関与する方法を包含する合成タンパク質化学における公知の方法を用いてインビトロで調製可能であると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的に適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル－４－メルカプトブチルイミデートならびに、例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている試薬が挙げられる。

【０４１６】

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って、２価抗体より急速に内部移行（および／または異化）され得る。本発明の抗体は、３つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体（ＩｇＭクラス以外である）（例えば、４価抗体）であってもよく、その抗体は、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作製できる。多価抗体は、二量体化ドメインおよび３つ以上の抗原結合部位を含んでもよい。好ましい二量体化ドメインは、Ｆｃ領域またはヒンジ領域を含む（またはそれからなる）。このシナリオにおいて、その抗体は、Ｆｃ領域、およびＦｃ領域に対してアミノ末端側に３つ以上の抗原結合部位を含む。好ましい多価抗体は、本明細書中で３個～約８個、好ましくは、４個の抗原結合部位を含む（またはそれからなる）。多価抗体は、少なくとも１つのポリペプチド鎖（および好ましくは、２つのポリペプチド鎖）を含み、ここでそのポリペプチド鎖（単数または複数）は、２つ以上の可変ドメインを含む。例えば、そのポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_{n}$－ＶＤ２－（Ｘ２）$_{n}$－Ｆｃを含み得、この式中、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１つのポリペプチド鎖であり、Ｘ１およびＸ２はアミノ酸またはポリペプチドに相当しており、かつｎは、０または１である。例えば、そのポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＨ－ＣＨ１－柔軟なリンカー－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖；またはＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖を含む場合がある。本明細書中の多価抗体は、好ましくは、さらに少なくとも２つ（および好ましくは、４つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。本明細書中の多価抗体は、例えば、約２個～約８個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでもよい。本明細書において企図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含み、そして必要に応じて、さらにＣＬドメインを含む。

【０４１７】

８．エフェクター機能の操作

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが望ましい場合がある。これは、１つ以上アミノ酸置換を抗体のＦｃ領域に導入することにより達成され得る。代替または追加として、システイン残基（単数または複数）をＦｃ領域に導入してもよく、これによってこの領域における鎖間のジスルフィド結合の形成が可能となり得る。このように作製されたホモ２量体抗体は、向上した内部移行能力ならびに／または増大した補体媒介性の細胞の殺滅および抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を有し得る。Ｃａｒｏｎら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７６：１１９１～１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ，Ｂ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：２９１８～２９２２（１９９２）を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ２量体抗体はまた、Ｗｏｌｆｆら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：２５６０～２５６５（１９９３）に記載されているように、ヘテロ２官能性架橋リンカーを用いて調製され得る。あるいは、二重のＦｃ領域を有しており、それによって増強された補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有し得る抗体を作製することもできる。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら、Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ３：２１９～２３０（１９８９）を参照のこと。その抗体の血清中半減期を延長するために、例えば、米国特許第５，７３９，２７７号に記載されるように抗体（特に抗体フラグメント）中にサルベージレセプター結合エピトープを取り込んでよい。本明細書中で使用される場合、「サルベージレセプター結合エピトープ」という用語は、ＩｇＧ分子（例えば、ＩｇＧ$_{1}$、ＩｇＧ$_{2}$、ＩｇＧ$_{3}$およびＩｇＧ$_{4}$）のインビボの血清中半減期を延長する原因となるＩｇＧ分子のＦｃ領域のエピトープのことをいう。

【０４１８】

９．イムノコンジュゲート

本発明はまた、細胞毒性剤、例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素またはそのフラグメント）または放射性同位体（すなわち、ラジオコンジュゲート）にコンジュゲートされた抗体を含むイムノコンジュゲート（交換可能に「抗体－薬物コンジュゲート」または「ＡＤＣ」と呼ばれる）

に関する。

【０４１９】

特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、抗体および化学療法剤または他の毒素を含む。このようなイムノコンジュゲートの作製に有用な化学療法剤は、上記されている。使用され得る酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン（ｓａｒｃｉｎ）、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａのインヒビター、クルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓのインヒビター、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（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）およびトリコテシン（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）が挙げられる。種々の放射性核種が、放射性結合体化抗体の作製のために使用できる。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙおよび^{186}Ｒｅが挙げられる。抗体と細胞毒性剤とのコンジュゲートは、種々の２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－ピリジルチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの２官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣＬ）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビスジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン２，６－ジイソシアネート）およびビス活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製される。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され得る。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ペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体への放射性核種のコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６を参照のこと。

【０４２０】

抗体および１つ以上の低分子毒素、例えば、カリケアマイシン、アウリスタチンペプチド、例えば、モノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）（ドラスタチンの合成アナログ）、メイタンシノイド、例えばＤＭ１、トリコテン（ｔｒｉｃｈｏｔｈｅｎ）およびＣＣ１０６５、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体のコンジュゲートもまた本明細書中で企図される。

【０４２１】

例示的なイムノコンジュゲート－抗体－薬物コンジュゲート

本発明のイムノコンジュゲート（または「抗体－薬物コンジュゲート」（「ＡＤＣ」））は、以下の式Ｉのものであり、任意のリンカー（Ｌ）を通じて、１つ以上の薬物部分（Ｄ）に抗体がコンジュゲート（すなわち共有結合）しているものである。ＡＤＣはチオＭＡｂ薬物コンジュゲート（「ＴＤＣ」）を含んでもよい。

【０４２２】

【化２】

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

従って、抗体は直接またはリンカーを介して薬物にコンジュゲートされてもよい。式Ｉでは、ｐは抗体あたりの薬物部分の平均数であり、例えば１抗体あたり、約１～約２０の薬物部分、ある実施形態では、１抗体あたり１～約８の薬物部分の範囲であってもよい。本発明は、式Ｉの抗体－薬物化合物の混合物を含んでいる組成物を包含し、ここでこの１

抗体あたりの平均の薬物ローディングは、約２～約５、または約３～約４である。

【０４２３】

ａ．例示的なリンカー

リンカーは、１つ以上のリンカー成分を含んでもよい。例示的なリンカー成分としては、６－マレイミドカプロイル（「ＭＣ」）、マレイミドプロパノイル（「ＭＰ」）、バリン－シトルリン（「ｖａｌ－ｃｉｔ」または「ｖｃ」）、アラニン－フェニルアラニン（「ａｌａ－ｐｈｅ」）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「ＰＡＢ」）、ならびに以下のリンカー試薬：Ｎ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（「ＳＰＰ」）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（「ＳＭＣＣ」これは、本明細書では「ＭＣＣ」とも呼ばれる）、およびＮ－スクシンイミジル（４－イオド－アセチル）アミノ安息香酸エステル（「ＳＩＡＢ」）とのコンジュゲーションから生じるものが挙げられる。種々のリンカー成分が当該分野で公知であり、そのいくつかを以下に記載する。

【０４２４】

リンカーは、細胞内での薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸に弱いリンカー（例えばヒドラゾン）、プロテアーゼ感受性（例えばペプチダーゼ感受性）リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：１２７～１３１（１９９２）；米国特許第５２０８０２０号）を用いてもよい。

【０４２５】

特定の実施形態では、リンカーは以下の式ＩＩ：

【０４２６】

【化３】

II

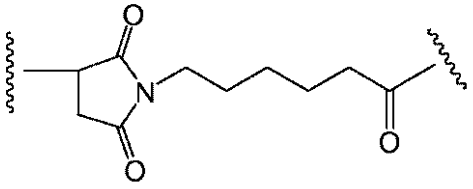
に従って示されるとおりであり、式中Ａは、ストレッチャーユニットであり、ａは０～１の整数であり；Ｗはアミノ酸単位であり、ｗは０～１２の整数であり；Ｙはスペーサーユニットであり、かつｙは０、１または２であり；そして、Ａｂ、Ｄおよびｐは、式Ｉに関して上記に定義される。このようなリンカーの例示的な実施形態は、米国特許出願公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１に記載されており、これは出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

【０４２７】

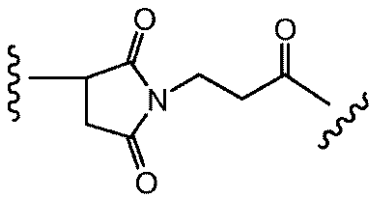
いくつかの実施形態では、リンカーは、抗体を別のリンカー成分または薬物部分に連結する「ストレッチャーユニット」を含んでもよい。例示的なストレッチャーユニットを以下に示す（波線は抗体への共有結合の部位を示す）：

【０４２８】

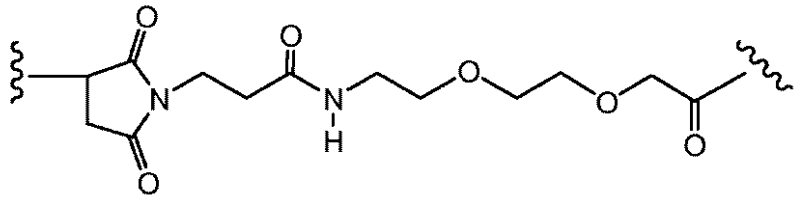
【化４】



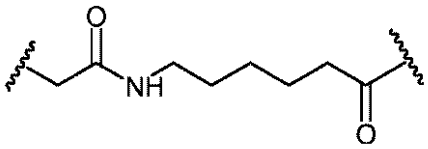
MC



MP



MPEG



いくつかの実施形態では、リンカー成分は、アミノ酸ユニットを含み得る。そのような実施形態の１つでは、アミノ酸ユニットにより、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能となり、それによってリソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露によってイムノコンジュゲートからの薬物放出が促される。例えば、Ｄｏｒｏｎｉｎａら．，（２００３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１：７７８－７８４を参照のこと。例示的なアミノ酸単位としては、限定するものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）；フェニルアラニン－リジン（ｆｋまたはｐｈｅ－ｌｙｓ）；またはＮ－メチル－バリン－シトルリン（Ｍｅ－ｖａｌ－ｃｉｔ）が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）が挙げられる。アミノ酸単位は、天然に存在するアミノ酸残基、ならびに微量のアミノ酸および天然には存在しないアミノ酸アナログ、例えばシトルリンを含んでもよい。アミノ酸ユニットは設計され、特に酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、ＣおよびＤまたはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、直接、あるいはストレッチャーユニットおよび／またはアミノ酸ユニットにより、抗体を薬物部分に連結する「スペーサー」ユニットを含んでもよい。スペーサーユニットは、「自己犠牲」または「非自己犠牲」であってもよい。「非自己犠牲」のスペーサーユニットは、ＡＤＣの酵素的な（例えばタンパク質分解性の）切断によりスペーサーユニットの一部または全てが薬物部分に結合したままとなっているユニットである。非自己犠牲のスペーサーユニットの例としては、限定するものではないが、グリシンスペーサーユニットおよびグリシン－グリシンスペーサーユニッ

トが挙げられる。また、配列特異的な酵素的切断の影響を受けるペプチド性スペーサーの他の組合せも考慮される。例えば、グリシン－グリシンスペーサーユニットを含有するＡＤＣの腫瘍細胞関連のプロテアーゼによる酵素切断によって、残りのＡＤＣからグリシン－グリシン－薬物部分が放出されるであろう。そのような実施形態では、グリシン－グリシン－薬物部分は、腫瘍細胞の異なる加水分解処理を受け、それによってグリシン－グリシンスペーサーユニットが薬物部分から分離される。

【０４３０】

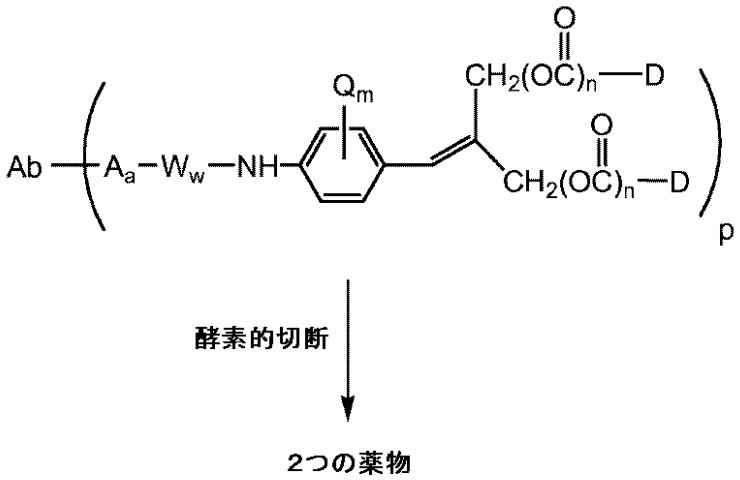
「自己犠牲」のスペーサーユニットは、別の加水分解工程を経ずに薬物部分を放出することを可能にする。特定の実施形態では、リンカーのスペーサーユニットは、ｐ－アミノベンジルユニットを含む。このような実施形態では、ｐ－アミノベンジルアルコールは、アミド結合によりアミノ酸ユニットに結合し、カルバメート、メチルカルバメートまたはカルボネートが、ベンジルアルコールと細胞毒性剤との間に作られる。例えば、Ｈａｍａｎｎら、（２００５）Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｔｈｅｒ．Ｐａｔｅｎｔｓ（２００５）１５：１０８７～１１０３を参照のこと。一実施形態では、スペーサーユニットは、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）である。ある実施形態では、ｐ－アミノベンジルユニットのフェニレン部分はＱｍに置き換えられ、このＱは－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり；そしてｍは０～４の範囲の整数である。さらに、自己犠牲のスペーサーユニットの例としては、限定するものではないが、ｐ－アミノベンジルアルコールに電子工学的に類似している芳香族化合物（例えば、米国特許公開第２００５／０２５６０３０号Ａ１を参照のこと）、例えば２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体（Ｈａｙら、（１９９９）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．９：２２３７）およびオルソ－もしくはパラ－アミノベンジルアセタール類が挙げられる。アミド結合加水分解により環化されるスペーサー、例えば、置換されたおよび非置換の４－アミノ酪酸アミド類（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓら、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５，２，２２３）；適切に置換されたビシクロ［２．２．１］およびビシクロ［２．２．２］環系（Ｓｔｏｒｍ，ら、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１９７２，９４，５８１５）；および、２－アミノフェニルプロピオン酸アミド類（Ａｍｓｂｅｒｒｙ，ら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，１９９０，５５，５８６７）が用いられてもよい。グリシンのａ－位置で置換されているアミン含有薬剤の除去（Ｋｉｎｇｓｂｕｒｙ，ら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９８４，２７，１４４７）もまたＡＤＣに有用な自己犠牲のスペーサーの例である。

【０４３１】

一実施形態では、以下に示すようなスペーサーユニットは分岐したビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）ユニットであり、これを用いて複数の薬剤の取り込みと放出が行われ得る。

【０４３２】

【化５】



ここで、Ｑは－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり、ｎは０または１であり、そして、ｐは１～約２０の範囲である。

【０４３３】

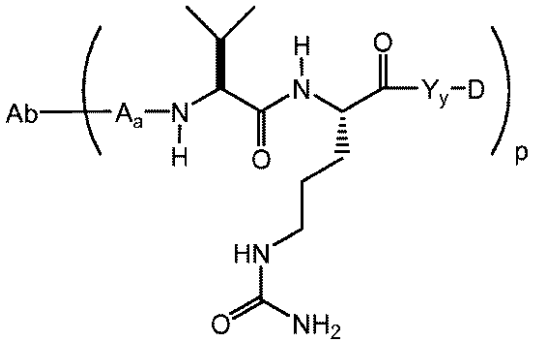
別の実施形態では、リンカーＬは、分岐した多機能性リンカー部分を通じて、２つ以上の薬物部分を抗体へ共有結合させるための樹状型リンカーであってもよい（Ｓｕｎら（２００２）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　１２：２２１３～２２１５；Ｓｕｎら（２００３）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１１：１７６１～１７６８）。樹状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比、すなわちローディングを増大することができ、これはＡＤＣの力価に関連がある。従って、システイン操作された抗体が１つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬物部分が樹状のリンカーを介して結合され得る。

【０４３４】

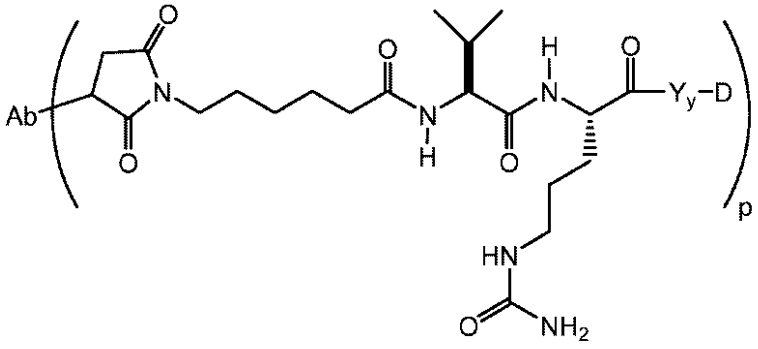
例示的なリンカー成分およびその組合せは、式ＩＩのＡＤＣの状況では以下に示される：

【０４３５】

【化６】



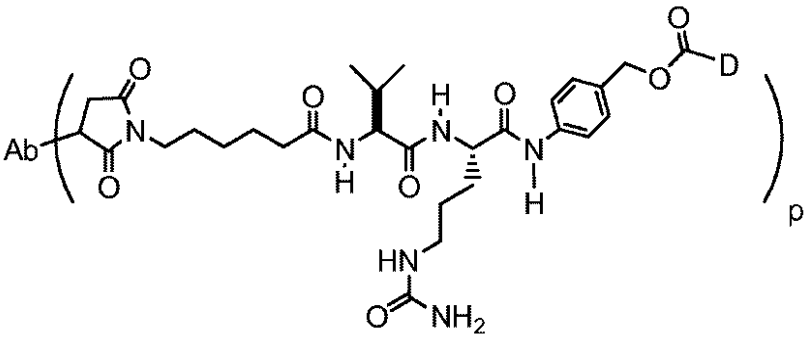
Val-Cit またはVC



MC-val-cit

【０４３６】

【化７】



MC-val-cit-PAB

ストレッチャー、スペーサーおよびアミノ酸ユニットを含んでいるリンカー成分は、例えば米国特許公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１に記載の方法など、当該分野で公知の方法によって合成され得る。

【０４３７】

ｂ．例示的な薬物部分

（１）メイタンシンおよびメイタンシノイド

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは１つ以上のメイタンシノイド分子とコンジュゲートしている抗体を含む。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂インヒビターである。メイタンシンは、最初、東アフリカのシラブ（低木）Ｍａｙｔｅｎｕｓ　ｓｅｒｒａｔａから単離された（米国特許第３８９６１１１号）。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノールおよび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ならびにその誘導体およびアナログは、例えば米国特許第４，１３７，２３０号；同第４，２４８，８７０号；同第４，２５６，７４６号；同第４，２６０，６０８号；同第４，２６５，８１４号；同第４，２９４，７５７号；同第４，３０７，０１６号；同第４，３０８，２６８号；同第４，３０８，２６９号；

同第４，３０９，４２８号；同第４，３１３，９４６号；同第４，３１５，９２９号；同第４，３１７，８２１号；同第４，３２２，３４８号；同第４，３３１，５９８号；同第４，３６１，６５０号；同第４，３６４，８６６号；同第４，４２４，２１９号；同第４，４５０，２５４号；同第４，３６２，６６３号；および同第４，３７１，５３３号に開示されている。

【０４３８】

メイタンシノイド薬物部分は、（ｉ）発酵または発酵産物の化学修飾もしくは誘導体化によって調製するために相対的に利用可能であり（ｉｉ）抗体に対するジスルフィドリンカーおよび非ジスルフィドリンカーによるコンジュゲーションに適切な官能基による誘導体化を受けやすく、（ｉｉｉ）血漿中で安定であり、そして（ｉｖ）種々の腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体－薬物コンジュゲートの魅力的な薬物部分である。

【０４３９】

メイタンシノイド薬物部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当該分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、または遺伝子工学技術および発酵技術を用いて産生してもよい（米国特許第６７９０９５２号；米国特許第出願公開第２００５／０１７０４７５号；Ｙｕら（２００２）ＰＮＡＳ　９９：７９６８～７９７３）。マイタンシノールおよびマイタンシノールアナログはまた、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

【０４４０】

例示的なメイタンシノイド薬物部分としては、以下のような修飾された芳香族環を有する薬物部分が挙げられる：Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４２５６７４６号）（アンサマイトシン（ａｎｓａｍｙｔｏｃｉｎ）Ｐ２の水素化アルミニウムリチウムによる還元で調製した）；Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－デメチル）＋／－Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４３６１６５０号および同第４３０７０１６号）（ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓもしくはＡｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓを用いる脱メチル化、またはＬＡＨを用いる脱塩素によって調製）；およびＣ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－デクロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（塩化アシルを用いるアシル化によって調製した）、ならびに他の位置で修飾を有する薬物部分。

【０４４１】

例示的なメイタンシノイド薬物部分としてはまた、以下のような修飾を有する薬物部分が挙げられる：Ｃ－９－ＳＨ（米国特許第４４２４２１９号）（H_2SまたはP_2S_5とのメイタンシノールの反応によって調製）；Ｃ－１４－アルコキシメチル（デメトキシ／CH_2OR）（米国特許第４３３１５９８号）；Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（CH_2OHまたはCH_2OAc）（米国特許第４４５０２５４号）（Ｎｏｃａｒｄｉａから調製した）；Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（米国特許第４３６４８６６号）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓによるメイタンシノールの変換によって調製した）；Ｃ－１５－メトキシ（米国特許第４３１３９４６および４３１５９２９）（Ｔｒｅｗｉａ　ｎｕｄｌｆｌｏｒａから単離した）；Ｃ－１８－Ｎ－デメチル（米国特許第４３６２６６３号および同第４３２２３４８号）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓによるマイタンシノールの脱メチル化によって調製した）；および４，５－デオキシ（米国特許第４３７１５３３号）（マイタンシノールの三塩化チタン／ＬＡＨ還元によって調製した）。

【０４４２】

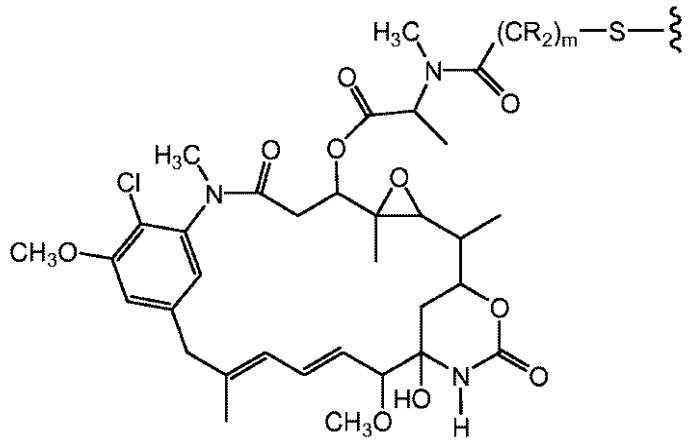
マイタンシン化合物上の多くの位置は、連結のタイプに依存して、連結位置として有用であることが公知である。例えば、エステル連結を形成することによって、ヒドロキシル基を有するＣ－３位置、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ－１４位置、ヒドロキシル基で修飾されたＣ－１５位置、およびヒドロキシル基を有しているＣ－２０位置は全て適切である（米国特許第５２０８０２０号；米国再発行特許第３９１５１号；米国特許第６９１３７４８号；米国特許第７３６８５６５号；米国特許出願公開第２００６／０１６７２４５号；米国特許出願公開第２００７／００３７９７２号）。

【０４４３】

メイタンシノイド薬物部分としては、以下の構造：

【０４４４】

【化８】



を有する薬物部分が挙げられ、

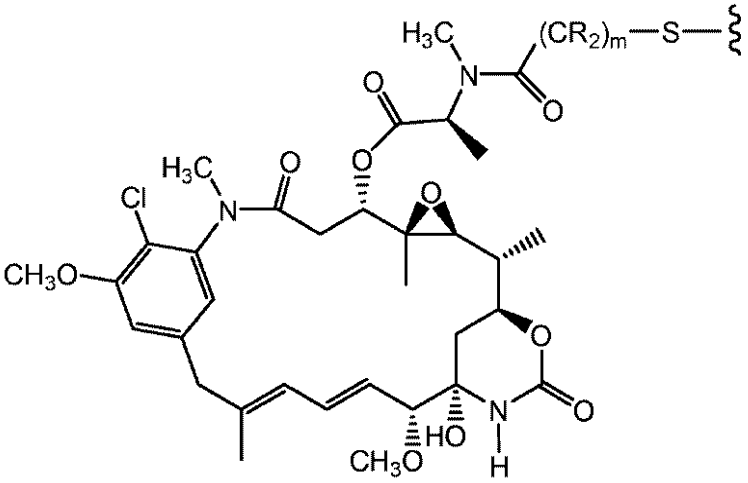
式中、波線は、ＡＤＣのリンカーへの、メイタンシノイド薬物部分のイオウ原子の共有結合を示す。Ｒは、独立して、ＨもしくはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであってもよい。このイオウ原子へアミド基を結合するアルキレン鎖は、メタニル（ｍｅｔｈａｎｙｌ）、エタニル（ｅｔｈａｎｙｌ）、またはプロピルであってもよい（すなわち、ｍは、１、２、もしくは３である）（米国特許第６３３４１０号、同第５２０８０２０号、米国特許第７２７６４９７号；Ｃｈａｒｉら、（１９９２）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：１２７～１３１；Ｌｉｕら，（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ９３：８６１８～８６２３）。

【０４４５】

メイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体（すなわち、Ｄのキラル炭素におけるＲ配置とＳ配置との任意の組み合わせ）が、本発明の化合物について企図される。一実施形態において、上記メイタンシノイド薬物部分は、以下の立体配置を有する：

【０４４６】

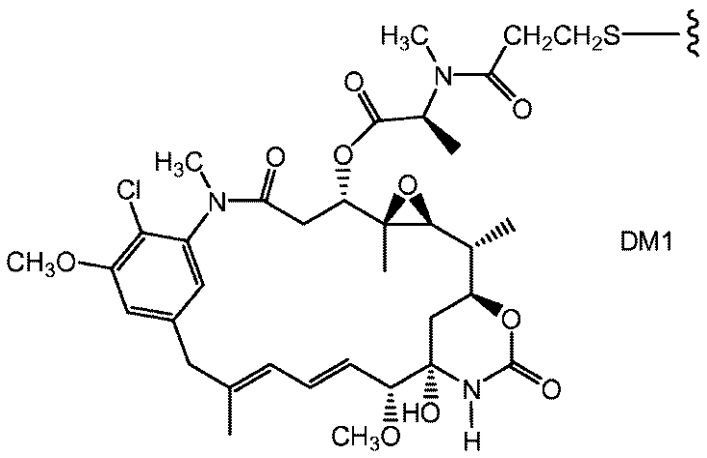
【化９】

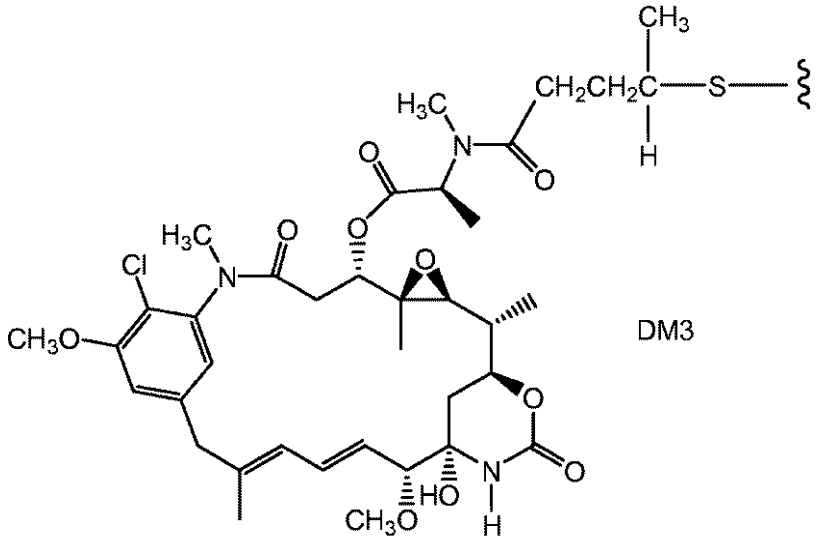


メイタンシノイド薬物部分の例示的な実施形態としては、以下の構造を有する、ＤＭ１；ＤＭ３およびＤＭ４：

【０４４７】

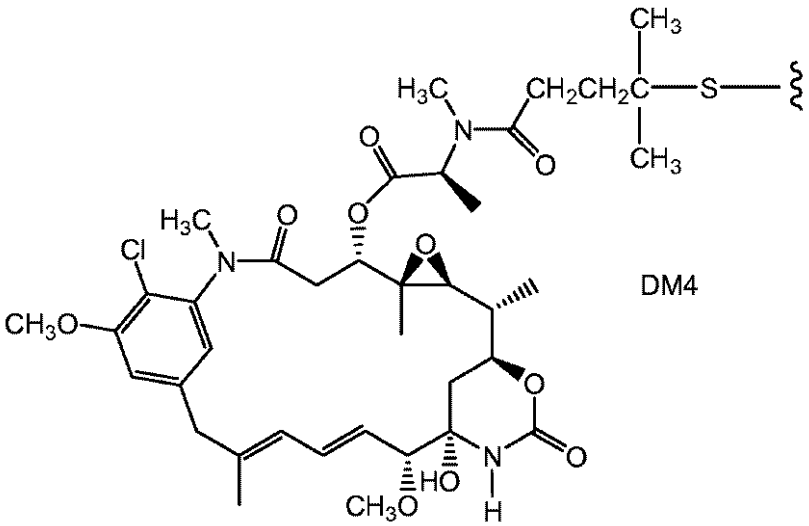
【化１０】





【０４４８】

【化１１】



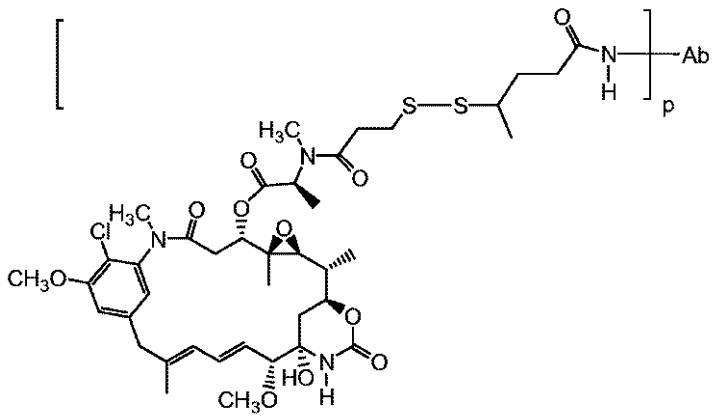
が挙げられ、式中、波線は、抗体－薬物コンジュゲートのリンカー（Ｌ）の薬物のイオウ原子の共有結合を示している（国際公開第２００５／０３７９９２号；米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号Ａ１）。

【０４４９】

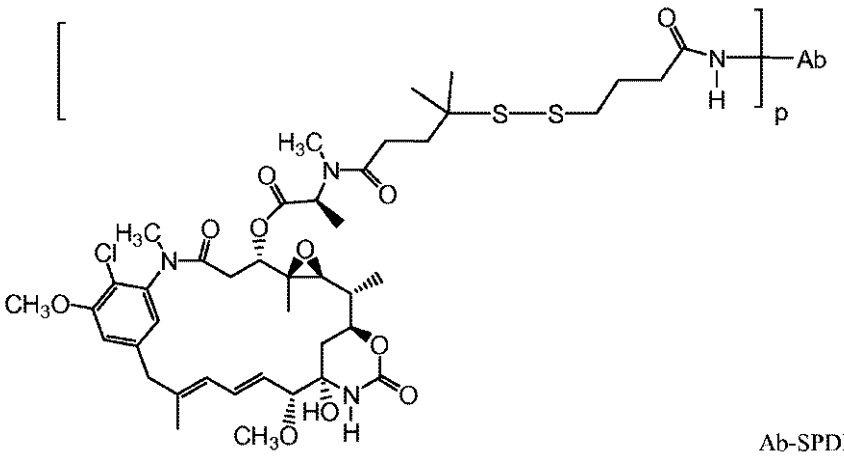
メイタンシノイド抗体－薬物コンジュゲートの他の例は、以下の構造および略号を有する、（ここでＡｂは抗体であり、ｐは１～約８である）：

【０４５０】

【化１２】



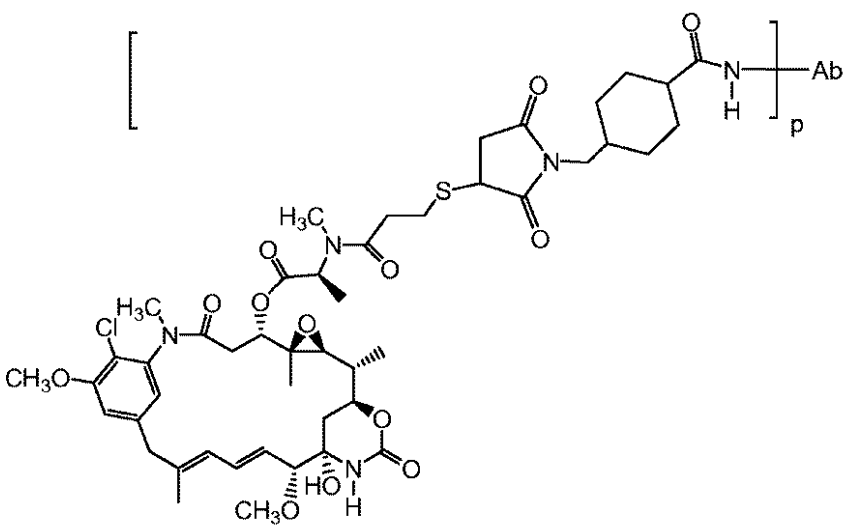
Ab -SPP-DM1



Ab-SPDB-DM4

【０４５１】

【化１３】

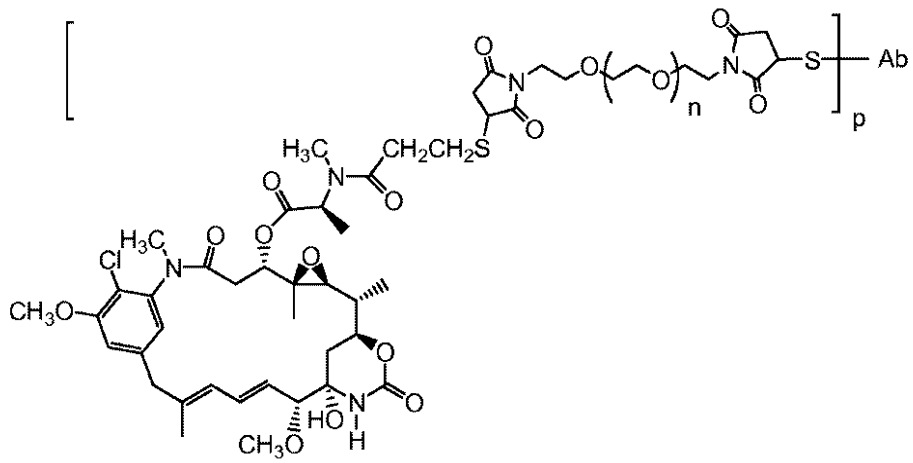


Ab-SMCC-DM1

抗体のチオール基に対してＢＭＰＥＯリンカーを通じてＤＭ１が連結されている例示的な抗体－薬物コンジュゲートは以下の構造および略号を有しており：

【０４５２】

【化１４】



式中、Ａｂは抗体であり；ｎは０、１、または２であり；かつｐは１、２、３または４である。

【０４５３】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、これを作製する方法、およびそれらの治療用途は、例えば、Ｅｒｉｃｋｓｏｎ，ら（２００６）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６６（８）：４４２６～４４３３；米国特許第５，２０８，０２０号、同第５，４１６，０６４号、米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号Ａ１、および欧州特許第０４２５２３５号Ｂ１（その開示が出典明記によって本明細書に明示的に援用される）に開示されている。

【０４５４】

抗体－メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性も優位に低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第５，２０８，０２０号（この開示内容は出典明記によって本明細書に明示的に援用される）を参照のこと。メイタンシノイドは、公知の技術で合成してもよいし、天然の供給源から単離してもよい。適切なメイタンシノイド、例えば、種々のマイタンシノールエステルなどのマイタンシノール分子の芳香族環または他の位置で修飾されたマイタンシノールおよびマイタンシノールアナログなどが、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号に、ならびに他の特許および上述の特許以外の刊行物に開示されている。

【０４５５】

例えば、米国特許第５２０８０２０号または欧州特許第０４２５２３５号Ｂ１；Ｃｈａｒｉら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５２：１２７～１３１（１９９２）、および米国特許出願公開第２００５／０１６９９３号Ａ１（これらの開示内容は出典明記によって本明細書に明示的に援用される）に開示されているものなどを含む、抗体－メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分ＳＭＣＣを含んでなる抗体－メイタンシノイドコンジュゲートは、米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号Ａ１，「Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ．」に開示されるように調製されてもよい。このリンカーは、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、またはエステラーゼ不安定性基を含む。さらなるリンカーを本願明細書中に記載し、例示する。

【０４５６】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリン

グ剤、例えば、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル類の二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミダートＨＣｌ）、活性エステル類（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート類（例えば、トルエン－２，６－ジイソシアネート）、およ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）を用いて作製することができる。特定の実施形態では、カップリング剤は、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）（Ｃａｒｌｓｓｏｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１７３：７２３～７３７（１９７８））またはＮ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルチオ）ペンタノアート（ＳＰＰ）であって、ジスルフィド結合が得られる。

【０４５７】

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用い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。この反応はヒドロキシル基を有するＣ－３位、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ－１４位、ヒドロキシル基で修飾されたＣ－１５位、およびヒドロキシル基を有するＣ－２０位で生じ得る。一実施形態では、結合はメイタンシノールまたはメイタンシノールのアナログのＣ－３位で形成される。

【０４５８】

（２）アウリスタチン類およびドラスタチン類

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチンまたはドロスタチンペプチド性アナログもしくは誘導体、例えば、アウリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）（米国特許第５６３５４８３号；同第５７８０５８８号）にコンジュゲートした抗体を含む。ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解および核と細胞の分割を妨げ（Ｗｏｙｋｅら、（２００１）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４５（１２）：３５８０～３５８４）、抗癌活性（米国特許第５６６３１４９号）および抗真菌性活性（Ｐｅｔｔｉｔら（１９９８）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４２：２９６１～２９６５）を有することが示されている。ドラスタチンまたはアウリスタチン薬物部分は、ペプチド性薬物部分のＮ（アミノ）末端またはＣ（カルボキシル）末端により抗体に接着し得る（国際公開第０２／０８８１７２号）。

【０４５９】

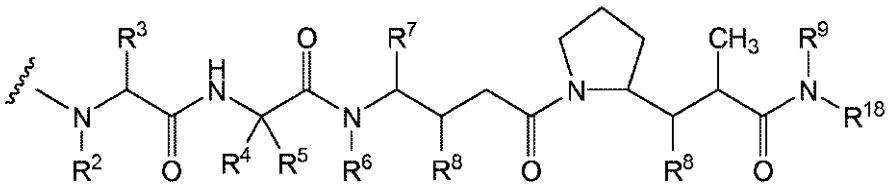
例示的なアウリスタチンの実施形態としては、Ｎ末端連結モノメチルアウリスタチン薬物部分ＤＥおよびＤＦが挙げられる（２００４年3月２８日に公開されたＳｅｎｔｅｒら、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅ ４５，Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｕｍｂｅｒ ６２３に開示される、米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号であって、その開示内容は出典明記によってその全体が明示的に援用される）。

【０４６０】

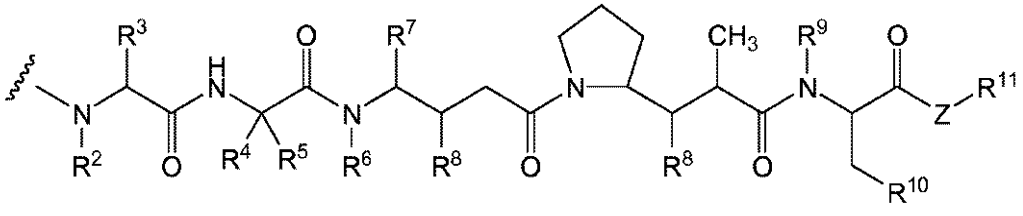
ペプチド性薬物部分は以下の式D_EおよびD_F：

【０４６１】

【化１５】



D_E



D_F

から選択され得、この式中、D_EおよびD_Fの波線は、抗体または抗体－リンカー成分への共有結合部位を、独立して各々の位置で示す：

R^2は、HおよびC_1－C_8アルキルから選択され；

R^3は、H、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環式化合物、アリール、C_1－C_8アルキル－アリール、C_1－C_8アルキル－（C_3－C_8炭素環式化合物）、C_3－C_8複素環およびC_1－C_8アルキル－（C_3－C_8複素環）から選択され；

R^4は、H、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環式化合物、アリール、C_1－C_8アルキル－アリール、C_1－C_8アルキル－（C_3－C_8炭素環式化合物）、C_3－C_8複素環およびC_1－C_8アルキル－（C_3－C_8複素環）から選択され；

R^5は、Hおよびメチルから選択され；

またはR^4およびR^5は一緒になって環状炭素を形成し、かつ式－（CR^aR^b）$_n$－を有しており、式中R^aおよびR^bが独立してH、C_1－C_8アルキルおよびC_3－C_8炭素環から選択され、ｎが２、３、４、５および６から選択され；

R^6は、HおよびC_1－C_8アルキルから選択され；

R^7は、H、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環、アリール、C_1－C_8アルキル－アリール、C_1－C_8アルキル－（C_3－C_8炭素環）、C_3－C_8複素環およびC_1－C_8アルキル－（C_3－C_8複素環）から選択され；

各々のR^8は独立して、H、OH、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環およびO－（C_1－C_8アルキル）から選択され；

R^9は、HおよびC_1－C_8アルキルから選択され；

R^{10}は、アリールまたはC_3－C_8複素環から選択され；

ZはO、S、NH、またはNR^{12}であり、R^{12}がC_1－C_8アルキルであり；

R^{11}は、H、C_1－C_{20}アルキル、アリール、C_3－C_8複素環、－（$R^{13}O$）$_m$－R^{14}、または－（$R^{13}O$）$_m$－$CH(R^{15})_2$から選択され；

ｍは、１～１０００の範囲の整数であり；

R^{13}はC_2－C_8アルキルであり；

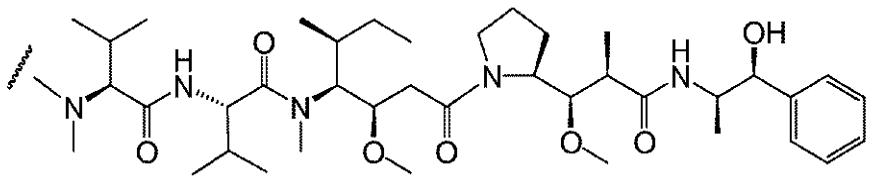
R^{14}は、HまたはC_1－C_8アルキルであり；

各々のR^{15}の出現は、独立してH、COOH、－（CH_2）$_n$－$N(R^{16})_2$、－（CH2）$_n$－SO_3H、または－（CH_2）$_n$－SO_3－C_1－C_8アルキルであり；各々のR^{16}の出現は、独立してH、C_1－C_8アルキル、または－（CH_2）$_n$－COOHであり；

R^{18}は、－C（R^8）$_2$－C（R^8）$_2$－アリール、－C（R^8）$_2$－C（R^8）$_2$（C_3－C_8複素環）、および－C（R^8）$_2$－C（R^8）$_2$（C_3－C_8炭素環）から選択され；かつ、

ｎは０から６の範囲の整数である。

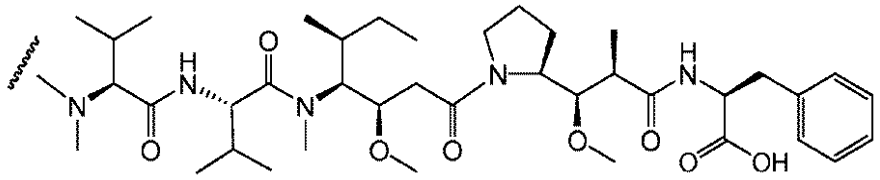
【０４６２】
一実施形態では、R^3、R^4およびR^7は、独立してイソプロピルまたはｓｅｃ－ブチルであり、かつR^5は－Ｈまたはメチルである。ある例示的な実施形態では、R^3およびR^4は各々イソプロピルであり、R^5は－Ｈであり、かつR^7はｓｅｃ－ブチルである。
【０４６３】
さらに別の実施形態では、R^2およびR^6は各々メチルであり、R^9は－Ｈである。
【０４６４】
さらに別の実施形態では、各々のR^8の出現は$-OCH_3$である。
【０４６５】
例示的な実施形態では、R^3およびR^4は各々がイソプロピルであり、R^2およびR^6は各々がメチルであり、R^5は－Ｈであり、R^7はｓｅｃ－ブチルであり、各々のR^8の出現は$-OCH_3$であり、かつR^9は－Ｈである。
【０４６６】
一実施形態では、Ｚは－Ｏ－または－ＮＨ－である。
【０４６７】
一実施形態では、R^{10}はアリールである。
【０４６８】
ある例示的な実施形態では、R^{10}は－フェニルである。
【０４６９】
ある例示的な実施形態では、Ｚが－Ｏ－の場合、R^{11}は－Ｈ、メチルまたはｔ－ブチルである。
【０４７０】
一実施形態では、Ｚが－ＮＨである場合に、R^{11}は$-CH(R^{15})_2$であり、式中R^{15}は$-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$であり、かつR^{16}は$-C_1-C_8$アルキルまたは$-(CH_2)_n-COOH$である。
【０４７１】
別の実施形態では、Ｚが－ＮＨである場合に、R^{11}は$-CH(R^{15})_2$であり、式中、R^{15}は$-(CH_2)_n-SO_3H$である。
【０４７２】
式D_Eの例示的なアウリスタチンの実施形態はＭＭＡＥであり、ここで、波線は抗体－薬物コンジュゲートのリンカー（Ｌ）への共有結合を示す：
【０４７３】
【化１６】



MMAE

式D_Fの例示的なアウリスタチンの実施形態はＭＭＡＦであり、式中、波線は抗体－薬物コンジュゲートのリンカー（Ｌ）への共有結合を示す（米国特許公開第２００５／０２３８６４９号およびＤｏｒｏｎｉｎａら（２００６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１７：１１４～１２４を参照のこと）：
【０４７４】

【化１７】



MMAF

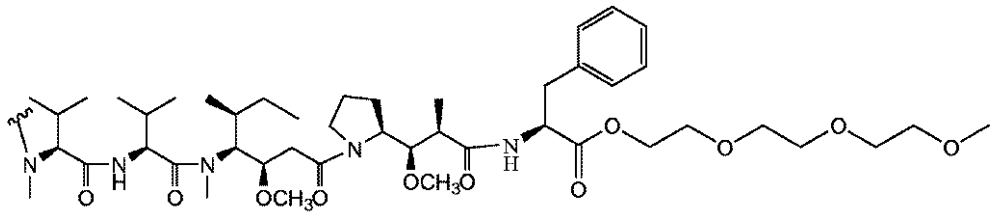
他の例示的な実施形態としては、ペンタペプチドアウリスタチン薬物部分のＣ末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有しているモノメチルバリン化合物（国際公開第２００７／００８８４８号）、およびペンタペプチドアウリスタチン薬物部分のＣ末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有しているモノメチルバリン化合物（国際公開第２００７／００８６０３号）が挙げられる。

【０４７５】

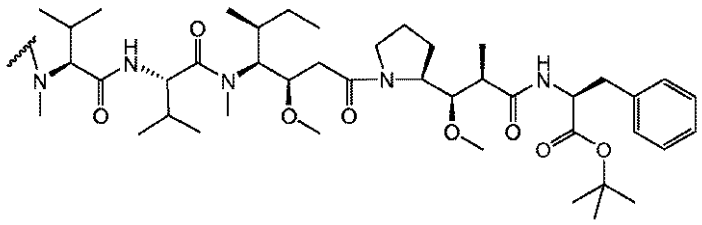
他の薬物部分としては以下のＭＭＡＦ誘導体が挙げられ、ここで、波線は抗体－薬物コンジュゲートのリンカー（Ｌ）への共有結合を示す：

【０４７６】

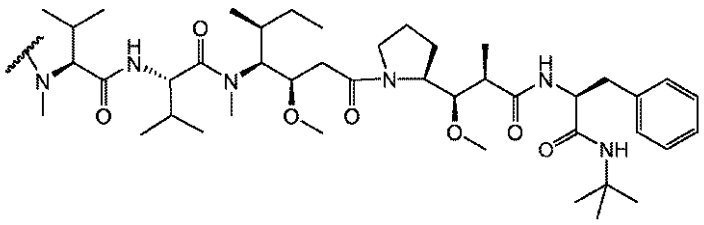
【化１８】



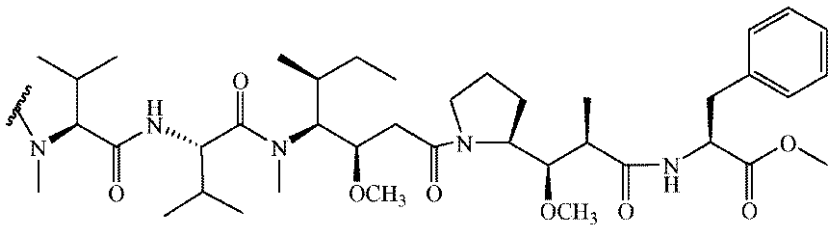
,



,



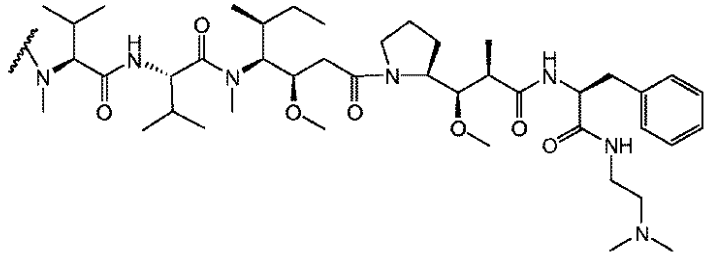
,

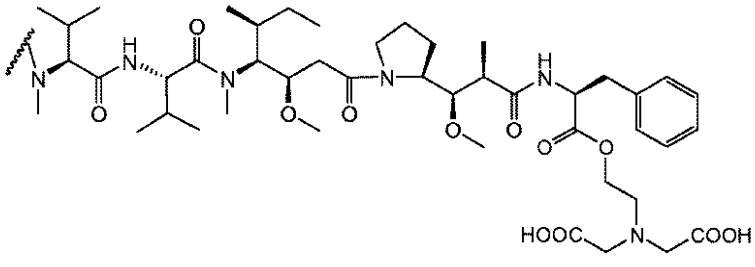


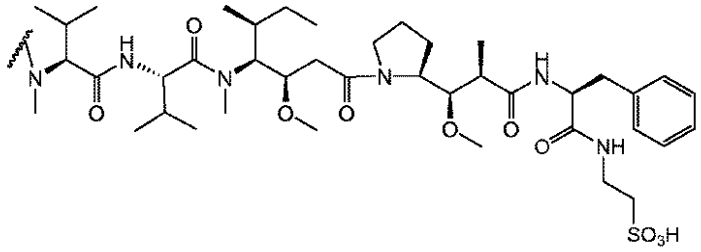
,

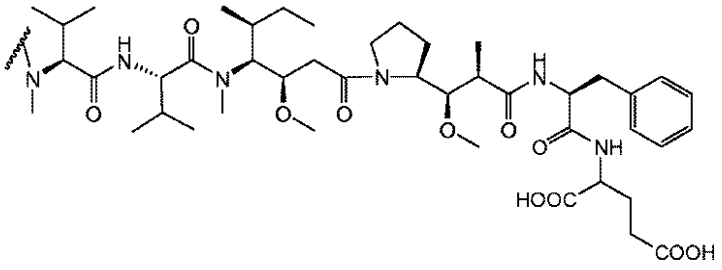
【０４７７】

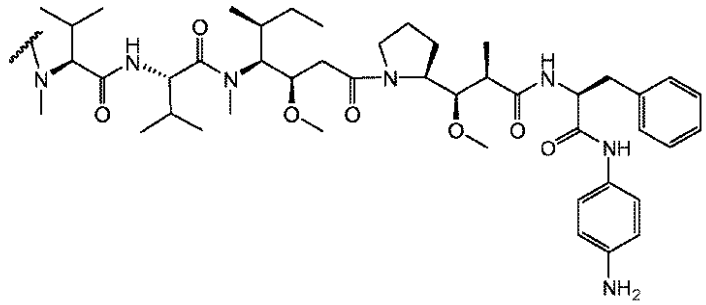
【化１９】


,


,


,


, および



一局面では、限定するものではないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル（ＴＥＧ）を含む親水基はＲ１１で薬物部分に結合することができる。ある特定の理論に縛られるものではないが、親水基は薬物部分の内在化および非凝集を補助する。

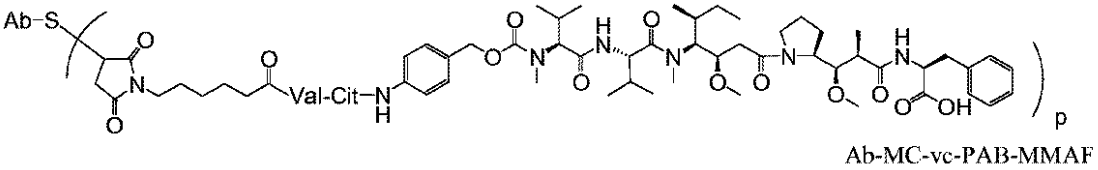
【０４７８】

アウリスタチン／ドラスタチンまたはその誘導体を含んでいる式ＩのＡＤＣの例示的な実施形態は、米国特許出願公開第２００５－０２３８６４９号およびＤｏｒｏｎｉｎａら

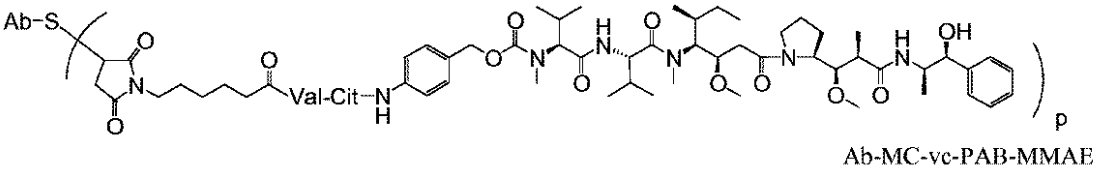
、（２００６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１７：１１４～１２４に記載されており、これは出典明記によって本明細書に明確に援用される。ＭＭＡＥまたはＭＭＡＦと種々のリンカー成分を含んでいる式ＩのＡＤＣの例示的な実施形態は、以下の構造および略記号を有する（ここで、「Ａｂ」は抗体であり、ｐは１～約８であり、「Ｖａｌ－Ｃｉｔ」または「ｖｃ」はバリン－シトルリンジペプチドであり；そして「Ｓ」はイオウ原子である。本明細書のイオウ連結ＡＤＣの構造的な特定の説明では、この抗体は、単にイオウ連結の特徴を示すために「Ａｂ－Ｓ」として表わされており、特定のイオウ原子が複数のリンカー－薬物部分を保有することを示すものではない。以下の構造の左のカッコはまた、ＡｂとＳとの間に、イオウ原子の左側においてもよく、これは、本明細書全体にわたって記載されている本発明のＡＤＣの等しい説明である。

【０４７９】

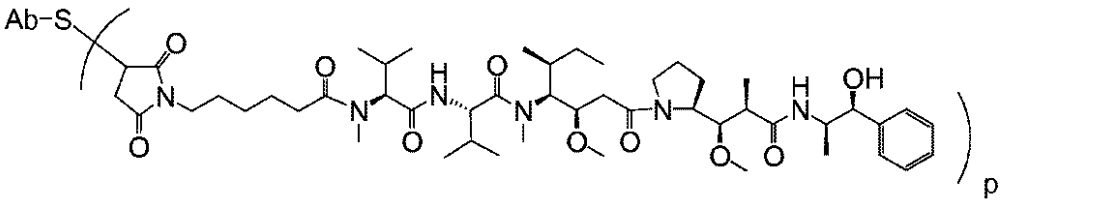
【化２０】



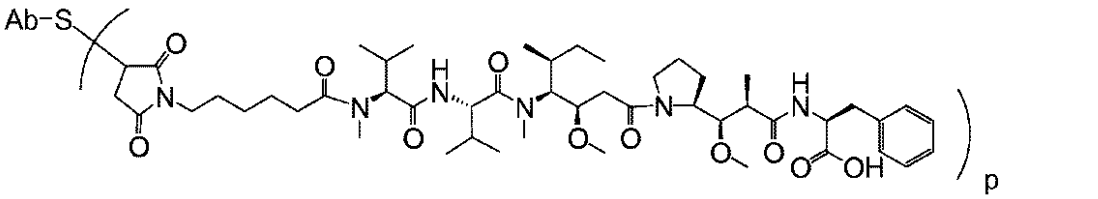
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

ＭＭＡＦと種々のリンカー成分とを含んでいる式ＩのＡＤＣの例示的な実施形態としてはさらに、Ａｂ－ＭＣ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦおよびＡｂ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦが挙げられる。興味深いことに、タンパク質分解性の切断を受けないリンカーによって抗体に結合しているＭＭＡＦを含んでいるイムノコンジュゲートは、タンパク質分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合しているＭＭＡＦを含んでいるイムノコンジュゲートに匹敵する活性を有することが示されている。Ｄｏｒｏｎｉｎａら、（２００６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１７：１１４～１２４を参照のこと。このような場合、薬剤放出は、細胞内の抗体分解に影響を受けると考えられる（同上）。

【０４８０】

代表的には、ペプチドベースの薬物部分は、２以上のアミノ酸および／またはペプチドフラグメント間でペプチド結合を形成することによって調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知である液相合成方法に従って調製す

ることができる（Ｅ．ＳｃｈｒｏｄｅｒおよびＫ．Ｌｕｂｋｅ，「Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」第１巻，７６～１３６頁，１９６５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓを参照のこと）。アウリスタチン／ドラスタチン薬物部分は、米国特許公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１；米国特許第５６３５４８３号；米国特許第５７８０５８８号；Ｐｅｔｔｉｔら、（１９８９）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１１：５４６３～５４６５；Ｐｅｔｔｉｔら、（１９９８）Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ １３：２４３～２７７；Ｐｅｔｔｉｔ，Ｇ．Ｒ．，ら、Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，１９９６，７１９～７２５；Ｐｅｔｔｉｔら、（１９９６）Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１ ５：８５９～８６３；およびＤｏｒｏｎｉｎａ （２００３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１（７）：７７８～７８４の方法に従って調製され得る。

【０４８１】

詳細には、式D_Fのアウリスタチン／ドラスタチン薬物部分、例えばＭＭＡＦおよびその誘導体は、米国特許出願公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１およびＤｏｒｏｎｉｎａら、（２００６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１７：１１４～１２４に記載の方法を用いて調製され得る。式D_Eのアウリスタチン／ドラスタチン薬物部分、例えばＭＭＡＥおよびその誘導体は、Ｄｏｒｏｎｉｎａら、（２００３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：７７８～７８４に記載の方法を用いて調製され得る。薬物－リンカー部分であるＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ、およびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥは、例えばＤｏｒｏｎｉｎａら、（２００３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：７７８～７８４、および米国特許公開第２００５／０２３８６４９号Ａ１に記載のような慣用的な方法によって都合よく合成され、次いで、目的の抗体にコンジュゲートされてもよい。

【０４８２】

（３）カリケアマイシン

他の実施形態では、イムノコンジュゲートは、１つ以上のカリケアマイシン分子とコンジュゲートされた抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、サブ－ピコモルの濃度で二重鎖ＤＮＡ破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第５，７１２，３７４号、同第５，７１４，５８６号、同第５，７３９，１１６号、同第５，７６７，２８５号、同第５，７７０，７０１号、同第５，７７０，７１０号、同第５，７７３，００１号、同第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アナログとしては、限定するものではないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、Ｎ－アセチル－γ_1^I、ＰＳＡＧおよびθ^I_1が挙げられる（Ｈｉｎｍａｎら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５３：３３３６～３３４２（１９９３）、Ｌｏｄｅら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５８：２９２５～２９２８（１９９８）および上述したＡｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄの米国特許）。抗体がコンジュゲート可能な別の抗腫瘍薬物は、葉酸代謝拮抗薬であるＱＦＡである。カリケアマイシンおよびＱＦＡは双方共に、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。従って、抗体媒介性の内部移行によるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞傷害性の効果が大きく増強される。

【０４８３】

ｃ.他の細胞毒性剤

抗体にコンジュゲート可能な他の抗腫瘍剤としては、ＢＣＮＵ、ストレプトゾシン、ビンクリスチンおよび５－フルオロウラシル、米国特許第５，０５３，３９４号、同第５，７７０，７１０号に記載されているＬＬ－Ｅ３３２８８複合体として集合的に公知の薬剤のファミリー、ならびにエスペラマイシン（ｅｓｐｅｒａｍｉｃｉｎｅ）（米国特許第５，８７７，２９６号）が挙げられる。

【０４８４】

使用可能な酵素活性毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇ

ｉｎｏｓａ）、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）、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉのタンパク質、ジアンシン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａのタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａのインヒビター、クルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓのインヒビター、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、エノマイシンおよびトリコセセンス（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅｓ）が挙げられる。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。

【０４８５】

本発明はさらに、抗体と核酸分解活性を有する化合物（例えばリボヌクレアーゼまたは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；ＤＮアーゼ）との間に形成されるイムノコンジュゲートを企図する。

【０４８６】

特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは高い放射性を有する原子を含んでもよい。放射性コンジュゲートした抗体を作製するためには、種々の放射性同位体が利用される。例としては、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}およびＬｕの放射性同位体が挙げられる。イムノコンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えばtc^{99m}またはI^{123}、または核磁気共鳴（ＮＭＲ）画像（磁気共鳴画像、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、マンガンまたは鉄を含んでもよい。

【０４８７】

放射－または他の標識が、公知の方法でイムノコンジュゲートに導入され得る。例えば、ペプチドは生合成されてもよいし、または、例えば、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用いる化学的なアミノ酸合成により合成されてもよい。標識、例えばtc^{99m}またはI^{123}、Re^{186}、Re^{188}および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の導入に用いることができる。他の方法は、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｓｃｉｎｔｉｇｒａｐｈｙ」（Ｃｈａｔａｌ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ １９８９）に詳細に記載されている。

【０４８８】

特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、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を参照のこと）を抗癌剤などの活性な薬物へ変換するプロドラッグ活性化酵素へコンジュゲートされた抗体を含んでもよい。このようなイムノコンジュゲートは、抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法（「ＡＤＥＰＴ」）に有用である。抗体にコンジュゲートされ得る酵素としては、限定するものではないが、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；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およびカテプシン（例えば、カテプシンＢおよびＬ）；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；グリコシル化プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用な炭水化物切断酵素、例えば、β－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ；β－ラクタムで誘導体化された薬物を遊離の薬物に変

換させるのに有用なβ－ラクタマーゼ；およ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また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物を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリンＶアミダーゼまたはペニシリンＧアミダーゼが挙げられる。酵素は当該分野で周知の組み換えＤＮＡ技術によって抗体に共有結合されてもよい。例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、，Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６０４～６０８（１９８４）を参照のこと。

【０４８９】

ｄ．薬物ローディング（Ｄｒｕｇ　Ｌｏａｄｉｎｇ）

薬物ローディングは、式Ｉの分子において、１抗体あたりの薬物部分の平均数であるｐによって表される。薬物ローディングは１抗体あたり１～２０個の薬物部分（Ｄ）の範囲であってもよい。式ＩのＡＤＣは、１から２０個の薬物部分の範囲でコンジュゲートされる抗体の集合を包含する。コンジュゲーション反応からのＡＤＣの調製において１抗体あたりの薬物部分の平均数は、質量分析、ＥＬＩＳＡアッセイおよびＨＰＬＣなどの従来の方法によって特徴付けられ得る。ｐに関するＡＤＣの定量的分布も決定され得る。いくつかの場合には、ｐが他の薬物ローディングを有するＡＤＣの一定の値である場合の均質なＡＤＣの分離、精製および特徴づけは、逆相ＨＰＬＣまたは電気泳動などの手段によって達成され得る。従って、式Ｉの抗体－薬物コンジュゲートの薬学的処方物は、１、２、３、４個またはそれ以上の薬物部分に連結された抗体とこのようなコンジュゲートとの異種の混合物であってもよい。

【０４９０】

ある抗体－薬物コンジュゲートについては、ｐは抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施形態のように、抗体はただ１個もしくはいくつかのシステインチオール基を有してもよいし、またはリンカーが結合し得るただ１個もしくはいくつかの十分に反応性のチオール基を有してもよい。特定の実施形態では、薬物ローディングが高いほど、例えばｐ＞５であれば、特定の抗体－薬物コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性または細胞透過性の喪失が生じ得る。特定の実施形態では、本発明のＡＤＣの薬物ローディングは、１～約８の範囲；約２～約６；または、約３～約５の範囲である。実際、特定のＡＤＣでは、１抗体あたりの薬物部分の最適の比は、８未満であってもよいし、約２～約５であってもよいことが示されている。米国特許出願公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１を参照のこと。

【０４９１】

特定の実施形態では、理論的な最大よりも少ない薬物部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、下に考察されるように、薬物－リンカー中間生成物またはリンカー試薬とは反応しないリジン残基を含んでもよい。一般に、抗体は薬物部分に結合し得る多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まず；実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある実施形態では、抗体は、部分的もしくは完全に還元な還元条件下で、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）またはトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）などの還元剤により還元されて、反応性のシステインチオール基が生成され得る。特定の実施形態では、抗体は変性条件下に曝されて、リジンまたはシステインなどの反応性の求核基が現れる。

【０４９２】

ＡＤＣのローディング（薬剤／抗体比率）は、例えば、（ｉ）抗体に対する薬物－リンカー中間生成物またはリンカー試薬のモル過剰を制限すること、（ｉｉ）コンジュゲートの反応時間または温度を制限すること、および（ｉｉｉ）システインチオール修飾のための部分的還元条件または限定された還元条件によって、異なる方法で制御できる。

【０４９３】

２個以上の求核基が、薬物－リンカー中間生成物またはリンカー試薬と、続いて薬物部分試薬と反応するならば、その結果生じる生成物は、抗体に結合した１個以上の薬物部分の分布を有するＡＤＣ化合物の混合物であると理解されるべきである。１抗体あたりの薬物の平均数は、抗体特異的であってかつ薬物特異的である二重ＥＬＩＳＡ抗体アッセイに

よって混合物から算出され得る。個々のＡＤＣ分子は、質量分析によって混合物中で識別され、ＨＰＬＣ、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィによって分離され得る（例えば、ＭｃＤｏｎａｇｈら（２００６）Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇｒ．Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ １９（７）：２９９～３０７；Ｈａｍｂｌｅｔｔら（２００４）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１０：７０６３～７０７０；Ｈａｍｂｌｅｔｔ，Ｋ．Ｊ．，ら「Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｄｒｕｇ ｌｏａｄｉｎｇ ｏｎ ｔｈｅ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ，ａｎｄ ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｏｆ ａｎ ａｎｔｉ－ＣＤ３０ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ，」Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．６２４，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｍａｒｃｈ ２７～３１，２００４，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ＡＡＣＲ，第４５巻，Ｍａｒｃｈ ２００４；Ａｌｌｅｙ，Ｓ．Ｃ．，ら、「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ ｔｈｅ ｌｏｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｒｕｇ ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．６２７，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｍａｒｃｈ ２７～３１，２００４，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ＡＡＣＲ，Ｖｏｌｕｍｅ ４５，Ｍａｒｃｈ ２００４を参照のこと）。特定の実施形態では、単一のローディング値を有する均質なＡＤＣは、電気泳動またはクロマトグラフィによってコンジュゲート混合物から単離してもよい。

【０４９４】

ｅ．イムノコンジュゲート調製の特定の方法

式ＩのＡＤＣは、当業者に公知の有機化学の反応、条件および試薬を使用するいくつかの経路、例としては：（１）共有結合を介してＡｂ－Ｌを形成するための抗体の求核基と二価のリンカー試薬との反応と、その後の薬物部分Ｄとの反応、および（２）共有結合を介してＤ－Ｌを形成するための、薬物部分の求核基と二価のリンカー試薬との反応、その後の抗体の求核基との反応などによって調製されてもよい。後者の経路を介した式ＩのＡＤＣを調製するための例示的な方法は、出典明記によって本明細書中に明確に援用される、米国特許出願公開第２００５－０２３８６４９号Ａ１に記載されている。

【０４９５】

抗体の求核基としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：（ｉ）Ｎ末端アミン基、（ｉｉ）側鎖アミン基、例えばリジン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えばシステイン、および（ｉｖ）抗体がグリコシル化される糖水酸基またはアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性基により共有結合を形成することが可能で、このリンカー部分およびリンカー試薬としては以下が挙げられる：（ｉ）活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類および酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；（ｉｉｉ）アルデヒド類、ケトン類、カルボキシルおよびマレイミド基。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全もしくは部分的に還元されるように、還元剤、例えばＤＴＴ（ジチオトレイトール）またはトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）による処置によって、リンカー試薬とのコンジュゲーション反応を行ってもよい。したがって、各々のシステイン架橋は、理論的には、２つの反応性のチオール求核基を形成する。リジン残基の修飾によって、例えば、チオールにアミンを転換させる２－イミノチオラン（トラウトの試薬）とリジンとを反応させることによって、抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、１、２、３、４またはそれ以上のシステイン残基を導入することによって（例えば、１個以上の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでいる改変体抗体を調製することによって）抗体に導入されてもよい。

【０４９６】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートはまた、アルデヒドもしくはケトンカルボニル基などの抗体上の求電子性基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によって生

成してもよい。リンカー試薬上の有用な求核基としては、限定するものではないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられる。一実施形態では、抗体を修飾して、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応させることができる求電子性の部分を導入する。別の実施形態では、グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化試薬を用いて酸化して、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成してもよい。生じたイミンシッフ塩基群は安定結合を形成してもよいし、または例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって還元されてもよい。一実施形態では、ガラクトースオキシダーゼまたはナトリウムメタ過ヨウ素酸塩のいずれかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬物（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）上の適切な基と反応することができる抗体のカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基が生じ得る。別の実施形態では、Ｎ末端セリンまたはトレオニン残基を含んでいる抗体は、ナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応し得、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する（Ｇｅｏｇｈｅｇａｎ　＆　Ｓｔｒｏｈ，（１９９２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．３：１３８～１４６；米国特許第５３６２８５２号）。このようなアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核基と反応することができる。

【０４９７】

薬物部分上の求核基としては、限定するものではないが、以下：反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合を形成することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基が挙げられ、このリンカー部分およびリンカー試薬としては以下：（ｉ）活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類および酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド類；（ｉｉｉ）アルデヒド類、ケトン類、カルボキシルおよびマレイミド基、が挙げられる。

【０４９８】

本発明の化合物は、限定するものではないが、以下の架橋試薬で調製したＡＤＣが明らかに考えられる：（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ．，Ｕ．Ｓ．Ａから；２００３－２００４　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ａｎｄ　Ｃａｔａｌｏｇの４６７～４９８頁を参照のこと）市販されているＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、およびスルホ－ＳＭＰＢ、およびＳＶＳＢ（スクシンイミジル－（４－ビニルスルホン）安息香酸塩）。

【０４９９】

抗体と細胞毒性剤とを含むイムノコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル類の二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミダートＨＣｌ）、活性エステル類（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン－２，６－ジイソシアネート）、およ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）を用いて作製することもできる。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号を参照のこと。

【０５００】

別法として、抗体と細胞毒性剤とを含んでいる融合タンパク質は、例えば組換え技術またはペプチド合成により作製される。組み換えＤＮＡ分子は、互いに隣接しているか、また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、コンジュゲートの抗体および細胞傷害性の部分をコードする領域を含んでもよい。

【０５０１】

さらに別の実施形態では、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てもよく、ここで抗体－レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を用いて循環から未結合のコンジュゲートを除去し、細胞毒性剤（例えば放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートしている「リガンド」（例えばアビジン）を投与する。

【０５０２】

例示的なイムノコンジュゲート－チオ－抗体薬物コンジュゲート

ａ．システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製

本発明のシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体および親抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ酸配列改変体をコードするＤＮＡは、限定するものではないが、（天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合には）天然の供給源からの単離、ポリペプチドをコードする予め調製したＤＮＡの、部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介性）突然変異誘発（Ｃａｒｔｅｒ（１９８５）ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：４４３１～４４４３；Ｈｏら、（１９８９）Ｇｅｎｅ（Ａｍｓｔ．）７７：５１～５９；Ｋｕｎｋｅｌら、（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：４８８；Ｌｉｕら、（１９９８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：２０２５２～２０２６０）、ＰＣＲ突然変異誘発（Ｈｉｇｕｃｈｉ，（１９９０）ｉｎ ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｐｐ．１７７～１８３，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｉｔｏら、（１９９１）Ｇｅｎｅ １０２：６７～７０；Ｂｅｒｎｈａｒｄら、（１９９４）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：１２６～１３２；およびＶａｌｌｅｔｔｅら、（１９８９）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：７２３～７３３）、およびカセット突然変異誘発（Ｗｅｌｌｓら、（１９８５）Ｇｅｎｅ ３４：３１５～３２３）を含む、種々の方法によって調製される。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）多部位－指向性突然変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）などの、突然変異誘発プロトコール、キットおよび試薬が市販されている。また、ＰＣＲベースの突然変異誘発によってテンプレートとして二本鎖プラスミドＤＮＡを用いるオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発によって、単一突然変異が生成される（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ，（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第3版；Ｚｏｌｌｅｒら、（１９８３）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１００：４６８～５００；Ｚｏｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｍ．（１９８２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１０：６４８７～６５００）。組み換え抗体の改変体はまた、制限酵素断片化操作によって、または合成オリゴヌクレオチドによるオーバーラップ伸展ＰＣＲによって構築してもよい。突然変異誘発プライマーは、システインコドン置換（単数または複数）をコードする。標準的な突然変異誘発技術を使用し、このような変異体システイン操作抗体をコードするＤＮＡを生成することができる（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９；およびＡｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９９３）。

【０５０３】
ファージディスプレイ技術（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２～５５３）を用いて、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、インビトロで抗ＣＤ７９ｂヒト抗体および抗体フラグメント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、繊維状バクテリオファージ、例えばＭ１３またはｆｄのメジャーなまたはマイナーなコートタンパク質遺伝子のどちらかをインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面で機能的抗体フラグメントとして提示させる。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選別を行ってもそれらの性質を表す抗体をコードする遺伝子が選別される。従って、ファージはＢ細胞の性質のいくつかを模倣する（Ｊｏｈｎｓｏｎら、（１９９３）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：５６４～５７１；Ｃｌａｃｋｓｏｎら、（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８；Ｍａｒｋｓら、（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１～５９７；Ｇｒｉｆｆｉｔｈら、（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：７２５～７３４；米国特許第５５６５３３２号；米国特許第５５７３９０５号；米国特許第５５６７６１０号；米国特許第５２２９２７５号）。

【０５０４】
抗ＣＤ７９ｂ抗体は、公知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成されてもよいし、組み換え技術を用いて調製して精製されてもよい。適切なアミノ酸配列、またはその一部を、固相法技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成してもよい（Ｓｔｅｗａｒｔら、Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，（１９６９）Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，（１９６３）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８５：２１４９～２１５４）。インビトロタンパク質合成は、手動の技術で行ってもまたは自動で行ってもよい。例えば、ｔ－ＢＯＣまたはＦｍｏｃ保護アミノ酸を使用して、そして製造業者の指示を用いたＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓのペプチド合成機（Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ）（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を用いて、自動固相合成法を行ってもよい。抗ＣＤ７９ｂ抗体またはＣＤ７９ｂポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成して、化学的または酵素的な方法を用いて組み合わせ、所望の抗ＣＤ７９ｂ抗体またはＣＤ７９ｂポリペプチドを産生させてもよい。

【０５０５】
抗体フラグメントの産生のために種々の技術が開発されている。以前から、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解によって生じるか（Ｍｏｒｉｍｏｔｏら、（１９９２）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４：１０７～１１７；およびＢｒｅｎｎａｎら、（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１）、または組換え宿主細胞によって直接生産された。Ｆａｂ、ＦｖおよびＳｃＦｖ抗ＣＤ７９ｂ抗体フラグメントは全て、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて発現され、Ｅ．ｃｏｌｉから分泌されるため、大量のフラグメントを容易に生成することができる。抗体フラグメントは、本明細書において述べられる抗体ファージライブラリーから単離してもよい。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから直接回収して、化学的にカップリングしてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成させるか（Ｃａｒｔｅｒら、（１９９２）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３～１６７）、または組換え宿主細胞培養物から直接単離してもよい。抗ＣＤ７９ｂ抗体は（ｓｃＦｖ）単鎖Ｆｖフラグメントであってもよい（国際公開第９３／１６１８５号；米国特許第５５７１８９４号；米国特許第５５８７４５８号）。抗ＣＤ７９ｂ抗体フラグメントはまた「直鎖状抗体」であってもよい（米国特許第５６４１８７０号）。このような直鎖の抗体フラグメントは、単一特異性でも二重特異性でもよい。

【０５０６】
以下の記載は主に、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードする核酸を含むベクターにて形質転換されるか、またはこのベクターをトランスフェクトされた細胞を培養することによる、抗Ｃ

Ｄ７９ｂ抗体の産生に関する。抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡは、抗ＣＤ７９ｂ抗体のｍＲＮＡを有し、検出可能なレベルに発現すると思われる組織から調製したｃＤＮＡライブラリーから得てもよい。従って、ヒト抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはＣＤ７９ｂポリペプチドＤＮＡは、ヒト組織から調製したｃＤＮＡライブラリーから都合よく得ることができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体コード遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから得てもよいし、または公知の合成手順（例えば自動核酸合成）によって得てもよい。

【０５０７】

本発明の設計、選別および調製方法により、求電子性の官能性と反応するシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設計した選択した部位に薬物分子を有する抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）化合物などの抗体コンジュゲート化合物が可能である。抗体表面上の反応性のシステイン残基により、マレイミドまたはハロアセチルなどのチオール反応基を通じた薬物部分の特異的なコンジュゲートが可能である。マレイミド基に対するＣｙｓ残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはＮ－末端アミノ基などのタンパク質内の任意の他のアミノ酸官能性に比べて、およそ１０００倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応するが、より高いｐＨ（＞９．０）とより長い反応時間が必要である（Ｇａｒｍａｎ，１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ）。タンパク質内の遊離チオールの量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンＭはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンＧは、サブユニットを一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このようなタンパク質では、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）またはセレノール（ｓｅｌｅｎｏｌ）（Ｓｉｎｇｈら、（２００２）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０４：１４７～１５６）などの試薬によるジスルフィド結合の還元は、反応性の遊離チオールを生成するために必要である。このアプローチにより、抗体立体構造および抗原結合特異性が失われ得る。

【０５０８】

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲ（反応性チオールの選別のためのファージＥＬＩＳＡ）アッセイにより、ＥＬＩＳＡファージ形式での抗体の反応性システイン基の検出が可能であり、これによってシステイン操作抗体の設計が助けられる（Ｊｕｎｕｔｕｌａ，Ｊ．Ｒ．ら、（２００８）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ３３２：４１～５２；国際公開第２００６／０３４４８８号；米国特許出願公開第２００７／００９２９４０号）。システイン操作抗体をウェルの表面にコートし、続いてファージ粒子とインキュベートして、ＨＲＰ標識した二次抗体を添加して、吸光度を検出する。ファージにディスプレイされる変異体タンパク質は、迅速で、強力な、ハイ－スループット方式でスクリーニングされ得る。システイン操作抗体のライブラリーを作製して同じアプローチを用いて結合選別に供して、抗体または他のタンパク質のランダムなタンパク質－ファージライブラリーから遊離Ｃｙｓ取り込みの適切な反応性の部位を同定することができる。この技術は、ファージに提示されるシステイン変異タンパク質と、親和性試薬またはレポーター基（チオール反応性でもある）とを反応させる工程を包含する。

【０５０９】

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲアッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能になる。この方法によるＡ１２１Ｃ改変体の同定は一例である。完全なＦａｂ分子は、反応性チオール基を有するＴｈｉｏＦａｂ改変体をより多く同定するために、効果的に検索され得る。パラメータである断片的な表面のアクセス可能性を使用して、ポリペプチド内のアミノ酸残基に対する溶媒のアクセスしやすさを同定して、定量化した。表面のアクセス可能性は、溶媒分子、例えば水が接触することができる表面積（Å^2）として表され得る。水が占める面積は、１．４Åの半径球と概算される。ソフトウェアは、アルゴリズムを使用して公知のＸ線結晶学由来の座標によりタンパク質の各アミノ酸の表面アクセス可能性を算出する、結晶学プログラムのＣＣＰ４ Ｓｕｉｔｅとして（「Ｔｈｅ Ｃ

ＣＰ４　Ｓｕｉｔｅ：Ｐｒｏｇｒａｍｓ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ」（１９９４）Ａｃｔａ．Ｃｒｙｓｔ．Ｄ５０：７６０～７６３）、入手自由であるかライセンス可能である（Ｓｅｃｒｅｔａｒｙ　ｔｏ　ＣＣＰ４，Ｄａｒｅｓｂｕｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＷＡ４　４ＡＤ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ，Ｆａｘ：（＋４４）１９２５　６０３８２５、または以下のインターネットによって：ｗｗｗ．ｃｃｐ４．ａｃ．ｕｋ／ｄｉｓｔ／ｈｔｍｌ／ＩＮＤＥＸ．ｈｔｍｌ）。Ｂ．ＬｅｅおよびＦ．Ｍ．Ｒｉｃｈａｒｄｓ（１９７１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５５：３７９～４００のアルゴリズムに基づいて、表面アクセス可能性の算出を実行する２つの例示的なソフトウェアモジュールは、「ＡＲＥＡＩＭＯＬ」および「ＳＵＲＦＡＣＥ」である。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、タンパク質のファンデルワールス表面を転がるので、プローブ球（溶媒分子を表す）の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、各原子の周りの拡がった球上（原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離）に表面ポイントを作製すること、および周囲の原子と関連する等価球内にあるものを除くことによって、溶媒にアクセス可能な表面積を算出する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、ＰＤＢ座標ファイルに原子の溶媒にアクセス可能な領域を見つけ、残基により、鎖により、および全分子についてアクセス可能な領域をまとめる。個々の原子がアクセス可能な領域（または、領域の相違）は、偽ＰＤＢ出力ファイルに書き込むことが可能である。ＡＲＥＡＩＭＯＬは各エレメントについて単一の半径を仮定し、限られた数の異なるエレメントを認識するのみである。

【０５１０】

ＡＲＥＡＩＭＯＬおよびＳＵＲＦＡＣＥは、絶対的なアクセス可能性、すなわち正方形のオングストローム（Å）の数を報告する。断片的な表面アクセス可能性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関する標準の状態を参照することで算出される。基準状態はトリペプチドＧｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙであり、ここでＸは目的のアミノ酸であり、基準状態は「伸展した」高次構造、すなわちβ鎖内の高次構造様でなければならない。伸展した高次構造は、Ｘのアクセス可能性を最大にする。算出したアクセス可能な領域をＧｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙトリペプチド基準状態のアクセス可能な領域で割って、断片的なアクセス可能性である比率の解を示す。アクセス可能性の割合は、１００を乗じた断片的アクセス可能性である。表面アクセス可能性を算出するための別の例示的なアルゴリズムは、ポリペプチドのＸ線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基の断片的アクセス可能性を算出するプログラムｘｓａｅ（Ｂｒｏｇｅｒ，Ｃ．，Ｆ．Ｈｏｆｆｍａｎ－ＬａＲｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ）のＳＯＬＶモジュールに基づく。抗体のあらゆるアミノ酸の断片的な表面アクセス可能性は、利用できる結晶構造情報を用いて算出してもよい（Ｅｉｇｅｎｂｒｏｔら、（１９９３）Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．２２９：９６９～９９５）。

【０５１１】

システイン操作抗体をコードするＤＮＡを容易に単離し、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの供与源として役立つ。一旦、単離すれば、ＤＮＡを発現ベクターに入れてもよく、ついでそれを、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルのＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または他の哺乳動物の宿主細胞、例えばそれ以外では抗体タンパク質を産生しない骨髄腫細胞（米国特許第５８０７７１５号；米国公開特許第２００５／００４８５７２号；米国公開特許第２００４／０２２９３１０）などの宿主細胞中にトランスフェクトして、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

【０５１２】

設計および選別の後、操作された、非常に反応性のある対になっていないＣｙｓ残基を有するシステイン操作抗体、例えばＴｈｉｏＦａｂは、（ｉ）細菌、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉの系（Ｓｋｅｒｒａら、（１９９３）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．５：２５６～２６２；Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（１９９２）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．１３０：１５１～１８８）または哺乳類の細胞培養システム（国際公開第０１／００２４

５号）、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）における発現；および（ｉｉ）一般的なタンパク質精製技術を用いた精製（Ｌｏｗｍａｎら、（１９９１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６（１７）：１０９８２～１０９８８）によって産生されてもよい。

【０５１３】

操作されたＣｙｓチオール基は、求電子性リンカー試薬および薬物－リンカー中間生成物と反応して、システイン操作抗体薬物コンジュゲートおよび他の標識したシステイン操作抗体を形成する。親抗体に存在し、対になって鎖内および鎖間のジスルフィド結合を形成するシステイン操作抗体Ｃｙｓ残基は、反応性チオール基を全く持っておらず（還元剤で処理されない限り）、求電子性のリンカー試薬または薬物－リンカー中間生成物と反応しない。新規に操作されたＣｙｓ残基は対形成しないままで、反応することが可能で、すなわち求電子性のリンカー試薬または薬物－マレイミドなどの薬物－リンカー中間生成物にコンジュゲートすることができる。例示的な薬物－リンカー中間生成物としては以下が挙げられる：ＭＣ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥおよびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ。重鎖および軽鎖の操作されたＣｙｓ残基の構造位置は、連続するナンバリングシステムに従ってナンバリングする。この連続するナンバリングシステムは、Ｎ末端から始まるＫａｂａｔナンバリングシステム（Ｋａｂａｔら、（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）に関連しており、ａ、ｂ、ｃで示される挿入がＫａｂａｔナンバリングスキーム（下列）とは異なる。Ｋａｂａｔナンバリングシステムを用いれば、実際の直鎖のアミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲもしくはＣＤＲが短くなっているアミノ酸か、またはＦＲもしくはＣＤＲの短縮またはそこへの挿入に対応する、少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含んでもよい。システイン操作重鎖改変体部位は、連続するナンバリングおよびＫａｂａｔナンバリングスキームによって同定される。

【０５１４】

一実施形態では、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、以下：

（ａ）システインによって親抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のアミノ酸残基を置換する工程と；

（ｂ）チオール反応性の試薬とシステイン操作抗体とを反応させることによって、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体のチオール反応性を決定する工程と、

を包含するプロセスによって調製される。

【０５１５】

システイン操作抗体は、親抗体よりチオール反応性の試薬との反応性が高くてもよい。

【０５１６】

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖もしくは軽鎖、または定常ドメインもしくは可変ドメインに位置してもよい。また、抗体フラグメント、例えば、Ｆａｂを、抗体フラグメントのアミノ酸を置換する１つ以上のシステインアミノ酸によって操作して、システイン操作抗体フラグメントを形成してもよい。

【０５１７】

本発明の他の実施形態は、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体を調製する（作製する）方法を提供し、この方法は：

（ａ）１つ以上のシステインアミノ酸を親の抗ＣＤ７９ｂ抗体に導入して、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体を生成する工程と、

（ｂ）チオール反応性の試薬によりシステイン操作抗体のチオール反応性を決定する工程と、

を包含し

ここでシステイン操作抗体は親抗体よりもチオール反応性の試薬と反応性が高い。

システイン操作抗体を調製する方法の工程（ａ）は：

（ｉ）システイン操作抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する工程と、

（ｉｉ）システイン操作抗体を発現させる工程と、
（ｉｉｉ）システイン操作抗体を単離して、精製する工程と、
を包含し得る。
【０５１８】
システイン操作抗体を調製する方法の工程（ｂ）は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン操作抗体を発現させる工程を包含してもよい。
【０５１９】
システイン操作抗体を調製する方法の工程（ｂ）は：
（ｉ）システイン操作抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン操作抗体を生成する工程；および
（ｉｉ）親和性標識したシステイン操作抗体の捕獲培地への結合を測定する工程とを包含してもよい。
【０５２０】
本発明の別の実施形態は、チオール反応のために、高い反応性を有し対形成をしないシステインアミノ酸を有する、システイン操作抗体をスクリーニングする方法であって、この方法は：
（ａ）親抗体に１つ以上のシステインアミノ酸を導入して、システイン操作抗体を作製する工程と；
（ｂ）システイン操作抗体とチオール反応性の親和性試薬とを反応させ、親和性標識した、システイン操作抗体を作製する工程と；
（ｃ）親和性標識したシステイン操作抗体の捕獲培地への結合を測定する工程と；
（ｄ）チオール反応性の試薬によりシステイン操作抗体のチオール反応性を決定する工程と；
を包含する。
【０５２１】
システイン操作抗体をスクリーニングする方法の工程（ａ）は：
（ｉ）システイン操作抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する工程と；
（ｉｉ）システイン操作抗体を発現させる工程と；
（ｉｉｉ）システイン操作抗体を単離して、精製する工程と；を包含する。
【０５２２】
システイン操作抗体をスクリーニングする方法の工程（ｂ）は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン操作抗体を発現させる工程を包含してもよい。
【０５２３】
システイン操作抗体をスクリーニングする方法の工程（ｂ）は：
（ｉ）システイン操作抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン操作抗体を生成させる工程と；
（ｉｉ）親和性標識したシステイン操作抗体の捕獲培地への結合を測定する工程と、を包含してもよい。
【０５２４】
ｂ．抗ＣＤ７９ｂ　ＩｇＧ改変体のシステイン操作
本明細書中に記載のシステイン操作方法によって、全長キメラ親モノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体へ、重鎖１１８（ＥＵナンバリング）（連続するナンバリングで言うと重鎖位置１１８に相当）部位に、または全長キメラ親モノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体へ、軽鎖２０５（Ｋａｂａｔナンバリング）（連続するナンバリングで言うと軽鎖位置２１０に相当）部位にシステインを導入した。
【０５２５】
作製された重鎖１１８（ＥＵナンバリング）にシステインを有するシステイン操作抗体は以下であった：（ａ）重鎖配列（配列番号８５）および軽鎖配列（配列番号８６）を有

するチオ－ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）、図１７。

【０５２６】

作製された軽鎖２０５（ＥＵナンバリング）にシステインを有するシステイン操作抗体は以下であった：（ａ）重鎖配列（配列番号８７）および軽鎖配列（配列番号８８）を有するチオ－ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＬＣ（Ａ２０５Ｃ）、図１８。

【０５２７】

これらのシステイン操作されたモノクローナル抗体は、１ｍＭのシステインを含有する培地中で一時的なファーメンテーションによってＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）細胞で発現された。

【０５２８】

一実施形態によれば、ヒト化２Ｆ２システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、遊離のシステインアミノ酸を有する以下の重鎖配列のうちの１つ以上を含む（配列番号９１～９９、表２）。

【０５２９】

【表２】

表2:ヒト化2F2システイン操作抗CD79b抗体改変体について重鎖の連続、KabatおよびEUナンバリングの比較

配列	連続ナンバリング	Kabat ナンバリング	EUナンバリング	配列番号
EVQLCESGGG	V5C	V5C		91
LRLSCCASGYT	A23C	A23C		92
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C		93
TLVTVCSASTK	S112C	S112C		94
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	95
VSSASCKGPSV	T116C	T116C	T120C	96
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	97
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	98
PPVLDCDGSFF	S396C	S396C	S400C	99

一実施形態によれば、キメラ２Ｆ２システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、遊離のシステインアミノ酸を有する以下の重鎖配列のうちの１つ以上を含む（配列番号１００～１０８、表３）。

【０５３０】

【表３】

表3：ch2F2システイン操作抗CD79b抗体改変体について重鎖の連続、KabatおよびEUナンバリングの比較

配列	連続ナンバリング	Kabat ナンバリング	EUナンバリング	配列番号
QVQLCQPGAE	Q5C	Q5C		100
VKLSCCASGYT	K23C	K23C		101
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		102
TSVTVCLASTK	S112C	S112C		103
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	104
VSSASCKGPSV	T116C	T116C	T120C	105
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	106
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	107
PPVLDCDGSFF	S396C	S396C	S400C	108

一実施形態によれば、ヒト化２Ｆ２システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、遊離のシステインアミノ酸を有する以下の軽鎖配列のうちの１つ以上を含む（配列番号１０９～１１５、表４）。

【０５３１】

【表４】

表4：ヒト化2F2システイン操作抗CD79b抗体改変体について軽鎖の連続およびKabatナンバリングの比較

配列	連続ナンバリング	Kabat ナンバリング	配列番号
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	109
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	110
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	111
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	112
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	113
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	114
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	115

一実施形態によれば、キメラ２Ｆ２システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体は、遊離のシステインアミノ酸を有する以下の軽鎖配列のうちの１つ以上を含む（配列番号１１６～１２２、表５）。

【０５３２】

【表５】

表5：キメラ2F2システイン操作抗CD79b抗体改変体について軽鎖の連続およびKabatのナンバリングの比較

配列	連続ナンバリング	Kabat ナンバリング	配列番号
TLSVTCGQPAS	I15C	I15C	116
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	117
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	118
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	119
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	120
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	121
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	122

ｃ．標識された、システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体

システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は部位特異的であり、かつチオール反応性の試薬と効率よくカップリングし得る。チオール反応性の試薬は、多機能性リンカー試薬、捕獲、すなわち親和性、標識試薬（例えばビオチン－リンカー試薬）、検出標識（例えば蛍光体試薬）、固相固定化試薬（例えばＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）、ポリスチレンまたはガラス）、または薬物－リンカー中間生成物であってもよい。チオール反応性試薬の一例は、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）である。ある例示的な実施形態では、ビオチン－リンカー試薬とのＴｈｉｏＦａｂの反応によりビオチン化されたＴｈｉｏＦａｂが生じ、これによって操作されたシステイン残基の存在および反応性が検出され、かつ測定され得る。多機能リンカー試薬とのＴｈｉｏＦａｂの反応により、薬物部分試薬または他の標識とさらに反応し得る官能化されたリンカーを有するＴｈｉｏＦａｂが生じる。薬物－リンカー中間生成物とのＴｈｉｏＦａｂの反応により、ＴｈｉｏＦａｂ薬物コンジュゲートが得られる。

【０５３３】

本明細書中で記述される例示的な方法は一般に、抗体の同定および産生、さらに一般的には、本明細書中に記載の設計およびスクリーニング工程の適用を通じて、他のタンパク質に応用されてもよい。

【０５３４】

このようなアプローチは、反応基が、例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、または他のチオール反応性のコンジュゲーションのパートナーである他のチオール反応性試薬のコンジュゲーションに応用されてもよい（Ｈａｕｇｌａｎｄ，２００３，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｂｒｉｎｋｌｅｙ，１９９２，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ

ａｔｅ Ｃｈｅｍ．３：２；Ｇａｒｍａｎ，１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ；Ｍｅａｎｓ（１９９０）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１：２；Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．ｉｎ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９６）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ｐｐ．４０～５５，６４３～６７１）。チオール反応性の試薬は、薬物部分、フルオロフォア、例えば、フルオレセインまたはローダミンのような蛍光色素、イメージングまたは放射性治療用金属のためのキレート剤、ペプチジルまたは非ペプチジル標識もしくは検出用タグ、またはポリエチレングリコールの種々のアイソフォームなどのクリアランス－改変剤、第三成分に結合するペプチド、または別の炭水化物または親油性剤であってもよい。

【０５３５】

ｄ．システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体の使用

システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体およびそのコンジュゲートは、治療用および／または診断用の薬剤としての使用が明らかになり得る。本発明はさらに、Ｂ細胞関連疾患と関係する１つ以上の症状を予防するか、管理するか、治療するかまたは、寛解する方法を提供する。特に、本発明は、癌、例えば、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫などの細胞増殖性障害と関連する１つ以上の症状を予防するか、管理するか、治療するか、または寛解する方法を提供する。本発明はまたさらに、ＣＤ７９ｂ関連の障害またはこのような障害を発達させる素因を診断するための方法、ならびに好ましくはＢ細胞関連のＣＤ７９ｂポリペプチドを結合する抗体、および抗体の抗原結合フラグメントを特定するための方法を提供する。

【０５３６】

本発明の別の実施形態は、Ｂ細胞関連の障害に応答する状態の処置において有用な医薬の調製のためのシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体の使用に関する。

【０５３７】

ｅ．システイン操作された抗体薬物コンジュゲート（チオ－抗体薬物コンジュゲート（ＴＤＣ））

本発明の別の局面は、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体（Ａｂ）と、アウリスタチン薬物部分（Ｄ）を含んでいる抗体－薬物コンジュゲート化合物であって、ここでシステイン操作抗体はリンカー成分（Ｌ）によって１つ以上の遊離したシステインアミノ酸を通じてＤに結合され；この化合物は式Ｉを有するものであり：

【０５３８】

【化２１】

$$Ab-(L-D)_p \qquad \mathbf{I}$$

この式中、ｐは１、２、３または４であり；システイン操作抗体は、親抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のアミノ酸残基を、１つ以上の遊離したシステインアミノ酸に置換することを包含するプロセスによって調製される。

【０５３９】

本発明の別の局面は、式Ｉの抗体－薬物化合物の混合物を含んでいる組成物であり、ここで１抗体あたりの平均の薬物ローディングは約２～約５、または約３～約４である。

【０５４０】

図１７～１８は、アウリスタチン薬物部分が、軽鎖（ＬＣ－ＡＤＣ）、または重鎖（ＨＣ－ＡＤＣ）内において、操作されたシステイン基に結合している、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の実施形態を示す。

【０５４１】

システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲートの考えられる利点としては、ＰＫ

パラメータの改善である安全性の改善（より大きい治療係数）が挙げられ、コンジュゲートを安定化し、かつその活性な結合高次構造を保持し得る抗体鎖間ジスルフィド結合が保たれており、薬物コンジュゲートの部位が決定され、そして、システイン操作抗体の薬物－リンカー試薬へのコンジュゲートからシステイン操作抗体薬物コンジュゲートを調製することでより均一な産物が得られる。

【０５４２】

リンカー

「リンカー」、「リンカーユニット」または「連結」とは、共有結合を含んでいる化学部分、または抗体を薬物部分に共有結合させる原子の鎖を意味する。種々の実施形態では、リンカーはＬと表される。「リンカー」（Ｌ）は、１つ以上の薬物部分（Ｄ）と抗体ユニット（Ａｂ）を連結させて、式Ｉの抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を形成させるために用いられ得る、二官能性成分または多機能性成分である。抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、薬物および抗体への結合について反応性機能を有するリンカーを用いて都合良く調製され得る。システイン操作抗体（Ａｂ）のシステインチオールは、リンカー試薬、薬物部分または薬物－リンカー中間生成物の求電子性の官能基と結合することができる。

【０５４３】

一局面では、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに反応することができる求電子性基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子性基と反応性であって、リンカーに共有結合を形成する。有用な求電子性の基としては、限定するものではないが、マレイミドおよびハロアセトアミド基が挙げられる。

【０５４４】

リンカーとしては、二価の基、例えば、アルキルジイル、アリーレン、ヘテロアリーレン、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、Ｊｅｆｆａｍｉｎｅ（商標））の繰り返しユニットである－（CR_2）$_n$Ｏ（CR_2）$_n$－などの成分；ならびに、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネートおよびカプロアミドを含む二酸エステルおよびアミドが挙げられる。

【０５４５】

システイン操作抗体は、Ｋｌｕｓｓｍａｎら、（２００４），Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１５（４）：７６５～７７３の７６６ページのコンジュゲーション法に従って、および実施例６のプロトコールに従って、マレイミドまたはα－ハロカルボニルなどの求電子性の官能基を有するリンカー試薬または薬物－リンカー中間生成物と反応する。

【０５４６】

リンカーは１つ以上のリンカー成分から構成されてもよい。例示的なリンカー成分としては、６－マレイミドカプロイル（「ＭＣ」）、マレイミドプロパノイル（「ＭＰ」）、バリン－シトルリン（「ｖａｌ－ｃｉｔ」または「ｖｃ」）、アラニン－フェニルアラニン（「ａｌａ－ｐｈｅ」または「ａｆ」）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「ＰＡＢ」）、Ｎ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（「ＳＰＰ」）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（「ＳＭＣＣ」）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノ安息香酸（「ＳＩＡＢ」）、１つ以上の反復性ユニットとしてのエチレンオキシ－CH_2CH_2O－（「ＥＯ」または「ＰＥＯ」）が挙げられる。さらなるリンカー成分は当該分野において公知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

【０５４７】

一実施形態では、ＡＤＣのリンカーＬは以下の式を有する：

【０５４８】

【化２２】

式中：
－Ａ－は、抗体（Ａｂ）のシステインチオールに共有結合にて付着したストレッチャーユニットであり；
ａは０または１であり；
各々の－Ｗ－は、独立したアミノ酸ユニットであり；
ｗは独立して、０から１２まで変動する整数であり；
－Ｙ－は、薬物部分に共有結合にて付着したスペーサーユニットであり；かつ
ｙは０、１または２である。

【０５４９】

ストレッチャーユニット

ストレッチャユニット（－Ａ－）は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット（－Ｗ－）に連結することができる。この点に関しては、抗体（Ａｂ）は、ストレッチャーの官能基と結合することができる官能基を有する。天然もしくは化学的操作のいずれにかによって抗体に存在することができる有用な官能基としては限定するものではないが、スルフヒドリル（－ＳＨ）、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマー水酸基およびカルボキシルが挙げられる。一局面では、抗体官能基はスルフヒドリルまたはアミノである。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成され得る。あるいは、２－イミノチオラン（トラウトの試薬）または別のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリジン成分のアミノ基を反応させることによって、スルフヒドリル基を生成することができる。一実施形態では、抗体（Ａｂ）は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離したシステインチオール基を有する。式Ｉのコンジュゲートの例示的なストレッチャーユニットは、式ＩＩおよび式ＩＩＩで示すものであり、ここでＡｂ、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは上記に定義したとおりであり、R^{17}は、$(CH_2)_r$、C_3－C_8カルボシクリル、Ｏ－$(CH_2)_r$、アリーレン、$(CH_2)_r$－アリーレン、－アリーレン－$(CH_2)_r$－、$(CH_2)_r$－（C_3－C_8カルボシクリル）、（C_3－C_8カルボシクリル）－$(CH_2)_r$、C_3－C_8ヘテロシクリル、$(CH_2)_r$－（C_3－C_8ヘテロシクリル）、－（C_3－C_8ヘテロシクリル）－$(CH_2)_r$－、－$(CH_2)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_r$－$CH_2$－、－$(CH_2)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$－$CH_2$－、－$(CH_2CH_2O)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$－$CH_2$－、および－$(CH_2CH_2O)_r$C（Ｏ）$NR^b$$(CH_2)_r$－から選択される二価の基であり、$R^b$はＨ、$C_1$－$C_6$アルキル、フェニルまたはベンジルであり、そして、ｒは独立して、１から１０の範囲の整数である。

【０５５０】

アリーレンとしては、芳香族環系から２つの水素原子を除去して得られる６～２０の炭素原子の二価の芳香族炭化水素基が挙げられる。代表的なアリーレン基としては、限定するものではないが、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどに由来する基が挙げられる。

【０５５１】

ヘテロシクリル基としては、１つ以上の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素およびイオウである環式の系が挙げられる。複素環基は、１～２０個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３のヘテロ原子を含む。複素環は、３～７員環を有する単環系（２～６の炭素原子とＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３のヘテロ原子）または７～１０員環を有する二環系（４～９の炭素原子とＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択さ

れる１～３のヘテロ原子）、例えばビシクロ［４，５］系、［５，５］系、［５，６］系、または［６，６］系であってもよい。複素環は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ，Ｌｅｏ Ａ．；「Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」（Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６８）、特に第１，３，４，６，７および９章」；「Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ」（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９５０～現在まで）、特に１３，１４，１６，１９および２８巻；および、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９６０）８２：５５６６に記載される。

【０５５２】

複素環の例としては、例示のためであって限定するものではないが、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、イオウ酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス－テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス－テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、６Ｈ－１，２，５－チアジアジニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、４Ａｈ－カルバゾリル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、およびイサチノイルが挙げられる。

【０５５３】

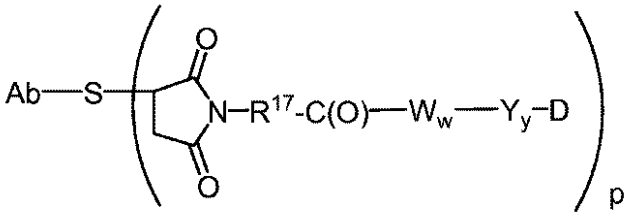
カルボシクリル基（Ｃａｒｂｏｃｙｃｌｙｌ）としては、単環として３～７個の炭素原子、または二環として７～１２個の炭素原子を有する飽和もしくは不飽和の環が挙げられる。単環の炭素環は３～６の環状原子、より一般的には５または６の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ［４，５］系、［５，５］系、［５，６］系または［６，６］系として配置された７～１２個の環原子、またはビシクロ［５，６］系または［６，６］系として配置された９個または１０個の環原子を有する。単環の炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキス－１－エニル、１－シクロヘキス－２－エニル、１－シクロヘキス－３－エニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

【０５５４】

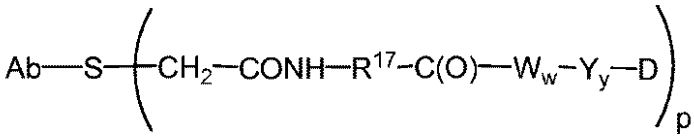
ＩＩからＶＩなどの式ＩのＡＤＣの全ての例示的な実施形態から、明確に示していない場合であっても、操作されたシステイン残基の数に応じて、１から４の薬物部分が抗体に連結されている（ｐ＝１～４）ことが理解される。

【０５５５】

【化２３】



II

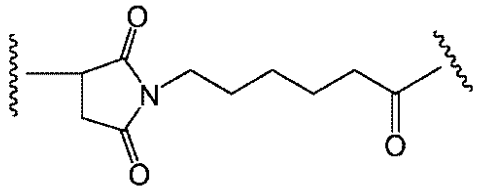


III

式ＩＩの例示的なストレッチャーユニットは、マレイミドーカプロイル（ＭＣ）に由来し、ここでＲ１７は－（ＣＨ２）５－である：

【０５５６】

【化２４】

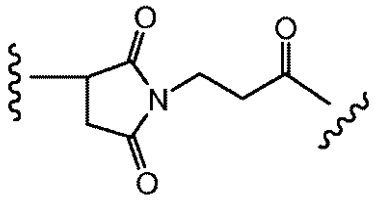


MC

式ＩＩの例示的なストレッチャーユニットは、マレイミドープロパノイル（ＭＰ）に由来し、ここでＲ１７が－（ＣＨ２）２－である：

【０５５７】

【化２５】

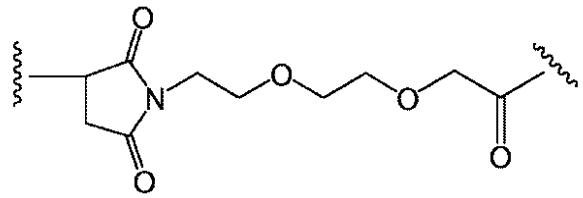


MP

式ＩＩの別の例示的なストレッチャーユニットは、Ｒ１７が－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－であり、ｒが２である：

【０５５８】

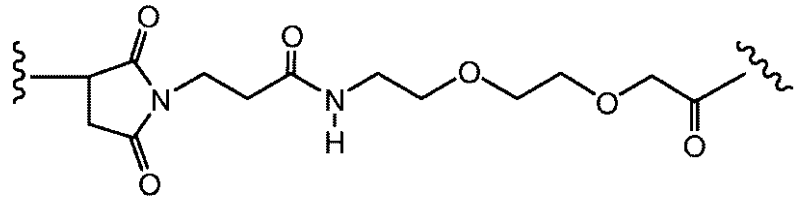
【化２６】



式ＩＩの別の例示的なストレッチャーユニットは、Ｒ１７が－（ＣＨ２）ｒＣ（Ｏ）ＮＲｂ（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－であり、ＲｂがＨであり、各々のｒが２である：

【０５５９】

【化２７】

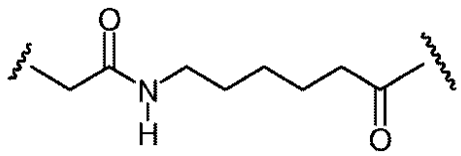


MPEG

式ＩＩＩの例示的なストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が－（ＣＨ$_2$）$_5$－である：

【０５６０】

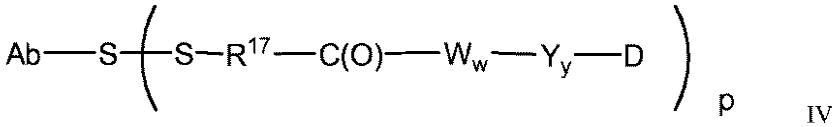
【化２８】



別の実施形態では、ストレッチャーユニットは、抗体の操作されたシステインのイオウ原子とストレッチャーユニットのイオウ原子との間のジスルフィド結合を介して、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体に連結される。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは、式ＩＶで表され、Ｒ^{17}、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは前記に定義するとおりである。

【０５６１】

【化２９】

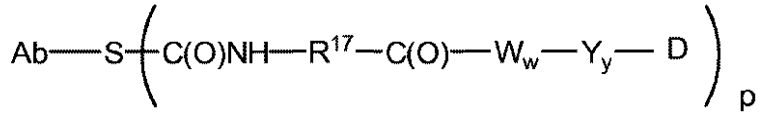


IV

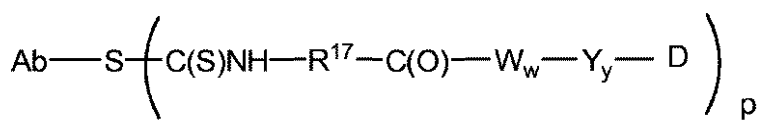
さらに別の実施形態では、ストレッチャーの反応基は、抗体の遊離したシステインチオールと結合することができるチオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例としては、限定するものではないが、マレイミド、α－ハロアセチル、活性化エステル、例えば、スクシンイミドエステル、４－ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられる。この実施形態の代表的なストレッチャーユニットは、式ＶａおよびＶｂに表され、このとき、－Ｒ^{17}－、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは上記に定義したとおりである；

【０５６２】

【化３０】



Va



Vb

別の実施形態では、リンカーは、分岐した多機能性リンカー部分を通じて２個以上の薬物部分を抗体へ共有結合的に付着させるために樹状型リンカーであってもよい（Ｓｕｎら、（２００２）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ

Ｌｅｔｔｅｒｓ １２：２２１３～２２１５；Ｓｕｎら、（２００３）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １１：１７６１～１７６８；Ｋｉｎｇ（２００２）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ４３：１９８７～１９９０）。樹状のリンカーはＡＤＣの力価に関連がある抗体に対する薬物のモル比、すなわちローディングを増やすことができる。従って、システイン操作抗体が１つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、複数の薬物部分が樹状のリンカーを介して結合され得る。

【０５６３】

アミノ酸ユニット

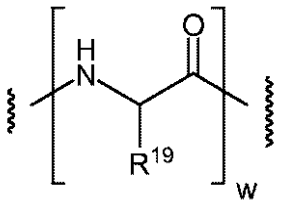
リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット（－W_w－）は、存在する場合には、抗体（Ａｂ）を本発明のシステイン操作抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の薬物部分（Ｄ）に連結する。

【０５６４】

－W_w－は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドのユニットである。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基としては、天然に存在するもの、ならびにシトルリンなどのマイナーなアミノ酸および天然には存在しないアミノ酸アナログが挙げられる。各々の－Ｗ－ユニットは独立して、以下の角括弧で示される式を有しており、ｗは、０から１２の範囲の整数である：

【０５６５】

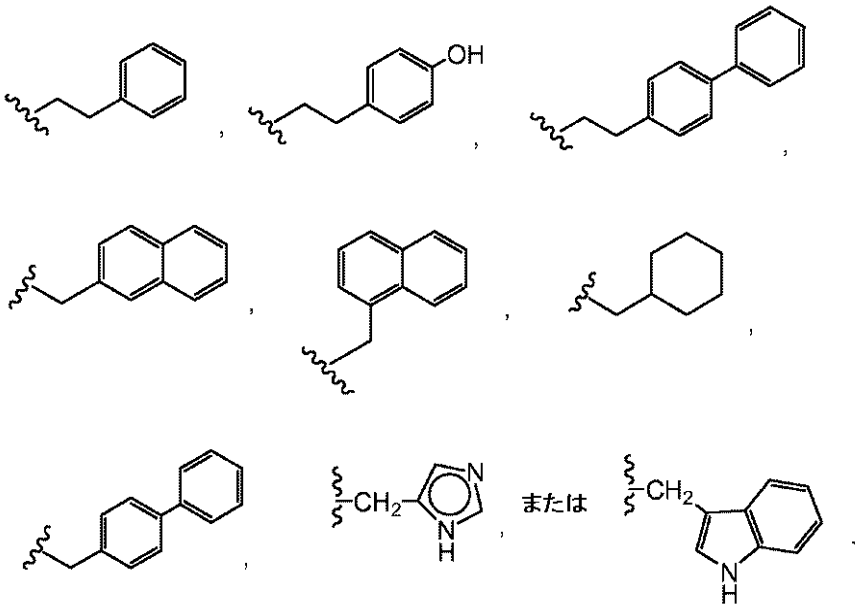
【化３１】



式中、R^{19}は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ベンジル、ｐ－ヒドロキシベンジル、－CH_2OH、－$CH(OH)CH_3$、－$CH_2CH_2SCH_3$、－CH_2CONH_2、－CH_2COOH、－$CH_2CH_2CONH_2$、－CH_2CH_2COOH、－$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、－$(CH_2)_3NH_2$、－$(CH_2)_3NHCOCH_3$、－$(CH_2)_3NHCHO$、－$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、－$(CH_2)_4NH_2$、－$(CH_2)_4NHCOCH_3$、－$(CH_2)_4NHCHO$、－$(CH_2)_3NHCONH_2$、－$(CH_2)_4NHCONH_2$、－$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、２－ピリジルメチル－、３－ピリジルメチル－、４－ピリジルメチル－、フェニル、シクロヘキシル、

【０５６６】

【化３２】



である。

【０５６７】

Ｒ１９が水素以外である場合に、Ｒ１９が付着される炭素原子はキラルである。Ｒ１９が付着される各々の炭素原子は、独立して（Ｓ）もしくは（Ｒ）配位にあるか、またはラセミ混合物である。したがって、アミノ酸ユニットは、鏡像異性的に純粋であっても、ラセミ性であっても、またはジアステレオ異性であってもよい。

【０５６８】

例示的な－Ｗｗ－アミノ酸ユニットとしては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）が挙げられる。アミノ酸リンカー成分を含むアミノ酸残基としては、天然に存在するもの、ならびにシトルリンなどの微量アミノ酸および天然に存在しないアミノ酸アナログが挙げられる。

【０５６９】

アミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含んでいる１つ以上の酵素によって酵素切断され、薬物部分（－Ｄ）を遊離し、この薬物部分は、一実施形態では、薬剤（Ｄ）を提供するために、放出時にインビボでプロトン化される。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、ＣおよびＤ、またはプラスミンプロテアーゼによって酵素的に切断されるように設計され、その選択性が最適化され得る。

【０５７０】

スペーサーユニット

スペーサユニット（－Ｙｙ－）は、存在する場合（ｙ＝１または２）には、アミノ酸ユニットが存在する（ｗ＝１～１２）ときに、アミノ酸ユニット（－Ｗｗ－）を薬剤部分（Ｄ）に連結する。あるいは、アミノ酸ユニットがない場合には、スペーサーユニットはストレッチャーユニットを薬物部分に連結する。アミノ酸ユニットおよびストレッチャーユニットが両方ともない（ｗ、ｙ＝０）場合には、スペーサーユニットも薬物部分を抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、自己犠牲型および非自己犠牲型の２つの一般的なタイプである。非自己犠牲的なスペーサーユニットとは、抗体－薬物コンジュゲートまたは薬物部分－リンカーからアミノ酸ユニットが切断、特に酵素的に切断された後に、

スペーサーユニットの一部もしくは全てが薬物部分に結合したままとなるものである。グリシン－グリシンスペーサーユニットまたはグリシンスペーサーユニットを含んでいるＡＤＣが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼまたはリンパ球関連プロテアーゼによって酵素切断される場合、グリシン－グリシン－薬物部分またはグリシン－薬物部分が$Ab-A_a-Ww-$から切断される。一実施形態では、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン－薬物部分の結合が切断され、薬剤が遊離される。

【０５７１】

別の実施形態では、$-Y_y-$は、フェニレン部分がQ_mで置換されているｐ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）ユニットであり、このときＱは$-C_1-C_8$アルキル、$-O-(C_1-C_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり；そして、ｍは０～４の範囲の整数である。

【０５７２】

非自己犠牲型スペーサーユニット（－Ｙ－）の例示的な実施形態は、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－；－Ｇｌｙ－；－Ａｌａ－Ｐｈｅ－；－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－である。

【０５７３】

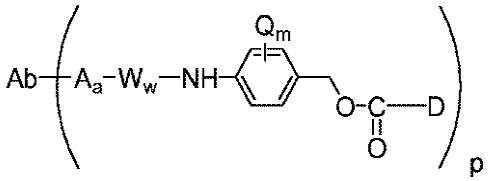
一実施形態では、スペーサーユニットがない（ｙ＝０）、または薬学的に許容可能な塩もしくはその溶媒和化合物である、薬物部分－リンカーまたはＡＤＣが提供される。

【０５７４】

あるいは、自己犠牲的なスペーサーユニットを含んでいるＡＤＣは－Ｄを放出し得る。一実施形態では、－Ｙ－はＰＡＢ基であって、ＰＡＢ基のアミノ窒素原子を介して$-W_w-$に連結されており、カルボナート、カルバメートまたはエーテル基を介して－Ｄに直接連結しており、ここでＡＤＣは以下のような例示的な構造を有する：

【０５７５】

【化３３】



この式中、Ｑは、$-C_1-C_8$アルキル、$-O-(C_1-C_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり、そして、ｐは１から４の範囲である。

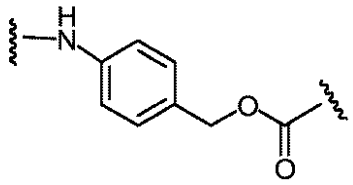
【０５７６】

自己犠牲的なスペーサーの他の例としては、ＰＡＢ基に電子的に類似している芳香族化合物、例えば、２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体（Ｈａｙら、（１９９９）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．９：２２３７）、複素環式のＰＡＢアナログ（米国特許出願公開第２００５／０２５６０３０号）、β－グルクロニド（国際公開第２００７／０１１９６８号）、およびオルトもしくはパラ－アミノベンジルアセタールが挙げられるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化を受けるスペーサー、例えば、置換および、非置換の４－アミノ酪酸アミド（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓら、（１９９５）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２：２２３）、適切に置換されたビシクロ［２．２．１］、および、ビシクロ［２．２．２］環系（Ｓｔｏｒｍら、（１９７２）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．９４：５８１５）、および２－アミノフェニルプロピオン酸アミド（Ａｍｓｂｅｒｒｙら、（１９９０）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５５：５８６７）などを用いてもよい。また、グリシンで置換されるアミン含有薬物の除去（Ｋｉｎｇｓｂｕｒｙら、（１９８４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２７：１４４７）も、ＡＤＣに有用な自己犠牲的スペーサーの例である。

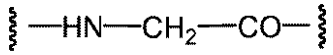
【０５７７】

例示的なスペーサーユニット（$-Y_y-$）を式Ｘ～ＸＩＩに示す：

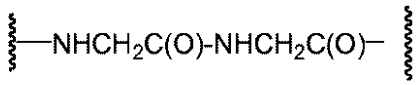
【０５７８】
【化３４】



X



XI



XII

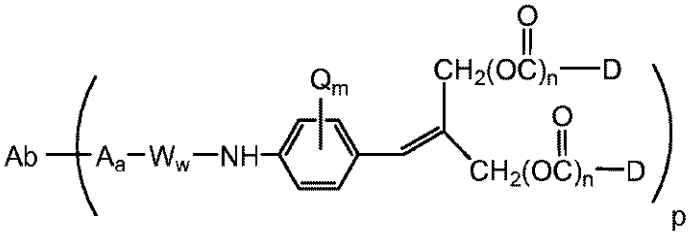
樹状リンカー

別の実施形態では、リンカーＬは、分岐状の、多機能リンカー成分により２つ以上の薬物部分が抗体に共有結合するために樹状型のリンカーであってもよい（Ｓｕｎら、（２００２）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　１２：２２１３～２２１５；Ｓｕｎら、（２００３）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１１：１７６１～１７６８）。樹状のリンカーは、ＡＤＣの力価に関連がある、抗体に対する薬剤のモル比、すなわちローディングを増大することができる。従って、システイン操作抗体が反応性のシステインチオール基を１つだけ有する場合、複数の薬物部分が樹状のリンカーを通じて結合され得る。分岐状の、樹状リンカーの例示的な実施形態としては、２，６－ビス（ヒドロキシメチル）－ｐ－クレゾールおよび２，４，６－トリス（ヒドロキシメチル）－フェノールデンドリマーユニット（国際公開第２００４／０１９９３号；Ｓｚａｌａｉら、（２００３）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２５：１５６８８～１５６８９；Ｓｈａｍｉｓら、（２００４）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２６：１７２６～１７３１；Ａｍｉｒら、（２００３）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．４２：４４９４～４４９９）が挙げられる。

【０５７９】

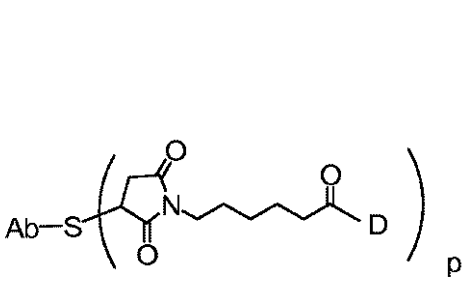
一実施形態では、スペーサーユニットは、これを用いることで複数の薬剤を取り込み、放出することができる分岐状ビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）であり、以下の構造：

【０５８０】
【化３５】

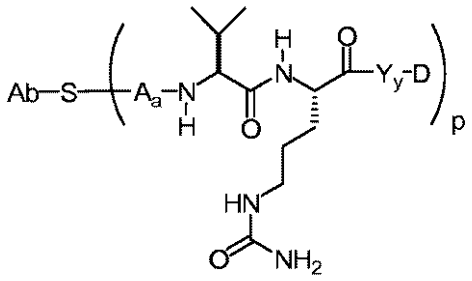


を有し、
これは、２－（４－アミノベンジリデン）プロパン１，３－ジオールデンドリマーユニット（国際公開第２００４／０４３４９３号；ｄｅ　Ｇｒｏｏｔら、（２００３）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．４２：４４９０～４４９４）を含み、ここでＱは、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；ｎは０または１であり；そして、ｐは１から４の範囲である。

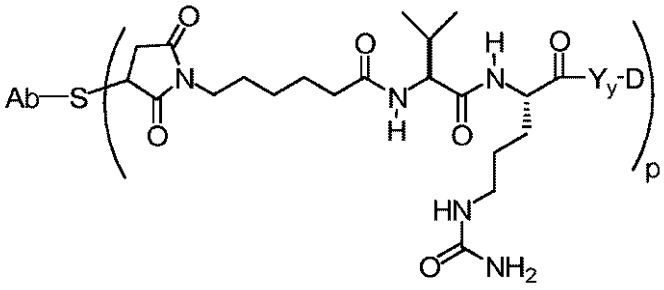
【０５８１】
式Ｉの抗体－薬物コンジュゲート化合物の例示的な実施形態としては：ＸＩＩＩａ（ＭＣ）、ＸＩＩＩｂ（ｖａｌ－ｃｉｔ）、ＸＩＩＩｃ（ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ）、およびＸＩＩＩｄ（ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ）：
【０５８２】
【化３６】



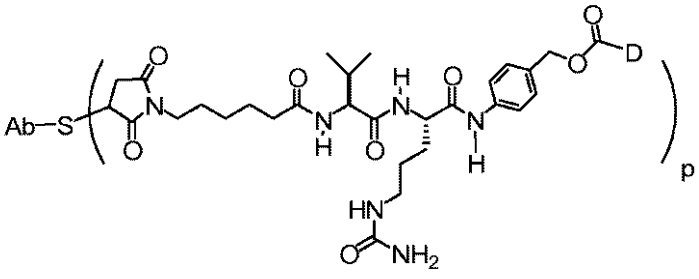
XIIIa



XIIIb



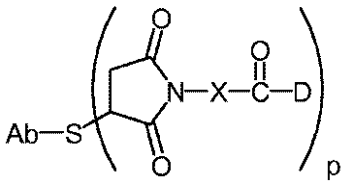
XIIIc



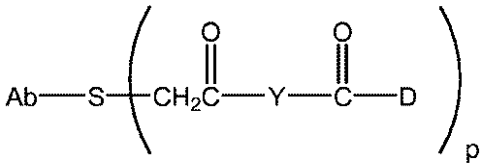
XIIId

が挙げられる。
【０５８３】
式Ｉａの抗体－薬物コンジュゲート化合物の他の例示的な実施形態としては、ＸＩＶａ－ｅ：
【０５８４】

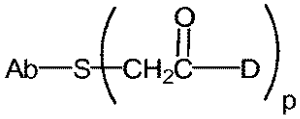
【化３７－１】



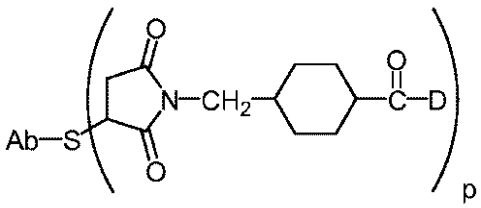
XIVa



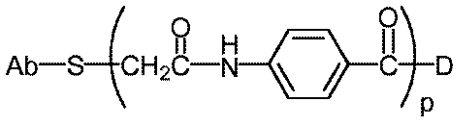
XIVb



XIVc

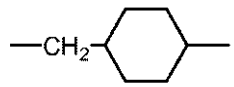
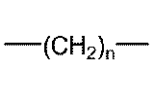
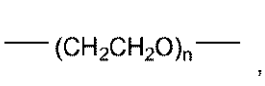


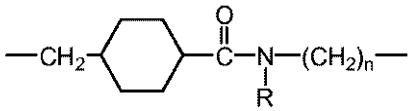
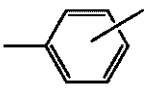
XIVd

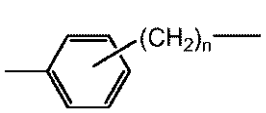
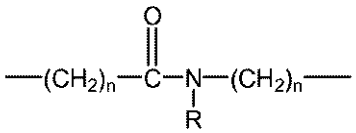


XIVe

が挙げられ、
式中、Ｘは以下：
【０５８５】
【化３７－２】

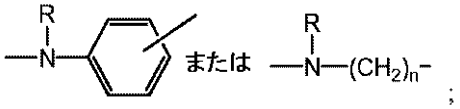

、

、

、


、

、


、または

；

であり；
Ｙは：
【０５８６】

【化３７－３】



；

であり；
かつＲは独立して、ＨまたはＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり；かつｎは１～１２である。

【０５８７】

別の実施形態では、リンカーは、抗体に存在する求電子性の基に反応性である求核基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性の基としては、限定するものではないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられる。リンカーの求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性の基と反応して、抗体ユニットに共有結合を形成し得る。リンカーの有用な求核基としては、限定するものではないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジドが挙げられる。抗体の求電子性の基は、リンカーへの付着に都合の良い部位を提供する。

【０５８８】

代表的には、ペプチド－タイプのリンカーは、２つ以上のアミノ酸および／またはペプチドフラグメントの間でペプチド結合を形成することによって調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成方法（Ｅ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒ ａｎｄ Ｋ．Ｌｕｂｋｅ（１９６５）「Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」，第１巻，７６～１３６頁，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）に従って調製され得る。リンカー中間生成物は、スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸ユニットを含んでいる反応の任意の組合せまたは順序によってアセンブリされてもよい。スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸ユニットは、天然で求電子性、求核性、または遊離の基である反応性官能基を使用し得る。反応性官能基としては、限定するものではないが、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ－ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネート、およびＯ－メシル、Ｏ－トシル、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉなどの脱離基；またはマレイミドが挙げられる。

【０５８９】

例えば、ＡＤＣを調製するために使用される合成経路に応じて、スルホン酸（－ＳＯ$_{3}^{-}$）またはアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、リンカー試薬と抗体または薬物部分とのカップリング反応を容易にする場合もあるし、またはＡｂ－Ｌ（抗体－リンカー中間生成物）とＤとのカップリング反応、またはＤ－Ｌ（薬物－リンカー中間生成物）とＡｂとのカップリング反応を容易にする場合もある。

【０５９０】

リンカー試薬

抗体とアウリスタチンとのコンジュゲートは、種々の二官能性リンカー試薬、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル類の二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ）、活性エステル類（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン－２，６－ジイソシアネート）、およ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）を用いて作製することができる。

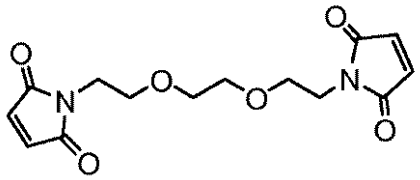
【０５９１】

抗体薬物コンジュゲートはまた、以下のリンカー試薬を用いて調製してもよい：ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢ

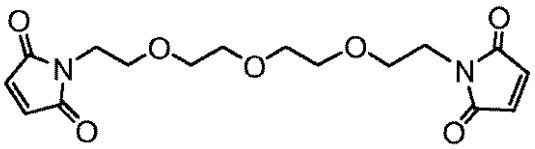
Ｓ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、およびスルホ－ＳＭＰＢ、およびＳＶＳＢ（スクシンイミジル－（４－ビニルスルホン）ベンゾアート）、および、例としては、ビス－マレイミド試薬：ＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、１，８－ビス－マレイミドジエチレングリコール（ＢＭ（ＰＥＯ）$_2$）、および１，１１－ビス－マレイミドトリエチレングリコール（ＢＭ（ＰＥＯ）$_3$）（これらは、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．，ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ、および他の試薬の業者から市販されている）。ビスマレイミド試薬により、連続した様式または同時の様式で、チオール含有薬物部分、標識またはリンカー中間生成物にシステイン操作抗体のチオール基を結合させることができる。システイン操作抗体、薬物部分、標識またはリンカー中間生成物のチオール基と反応性である、マレイミド以外の他の官能基としては、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられる。

【０５９２】

【化３８】



BM(PEO)$_2$



BM(PEO)$_3$

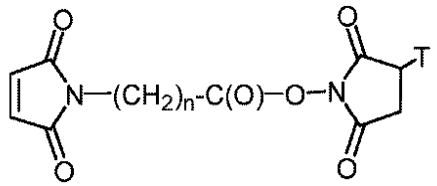
有用なリンカー試薬はまた、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．（Ｂｏｕｌｄｅｒ，ＣＯ）などの他の商業的供給源から入手してもよいし、またはＴｏｋｉら（２００２）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６７：１８６６～１８７２；Ｗａｌｋｅｒ，Ｍ．Ａ．（１９９５）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６０：５３５２～５３５５；Ｆｒｉｓｃｈら、（１９９６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．７：１８０～１８６；米国特許第６２１４３４５号；国際公開第０２／０８８１７２号；米国特許出願公開第２００３１３０１８９号；米国特許出願公開第２００３０９６７４３号；国際公開第０３／０２６５７７号；国際公開第０３／０４３５８３号；および国際公開第０４／０３２８２８号に記載の手段に従って合成してもよい。

【０５９３】

式（ＩＩＩａ）のストレッチャーは、以下のリンカー試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによって、リンカーに導入することができる。

【０５９４】

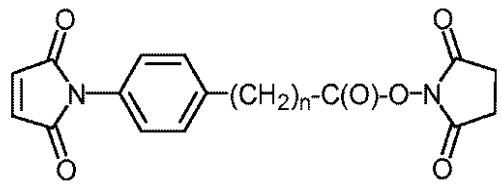
【化３９】



式中、ｎは１～１０の範囲の整数であり、Ｔは－Ｈまたは－ＳＯ$_3$Ｎａであり；

【０５９５】

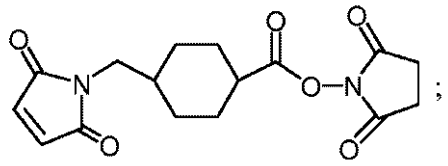
【化４０】

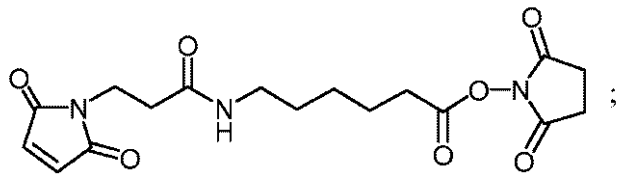


式中、ｎは０～３の範囲の整数である；

【０５９６】

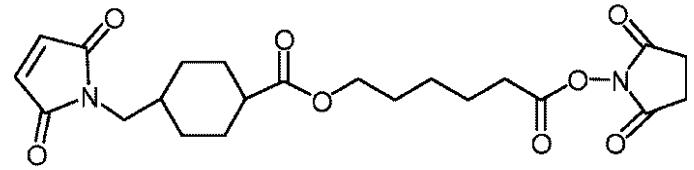
【化４１】

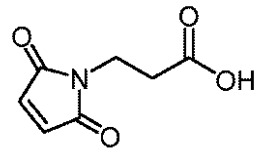

;


;

【０５９７】

【化４２】

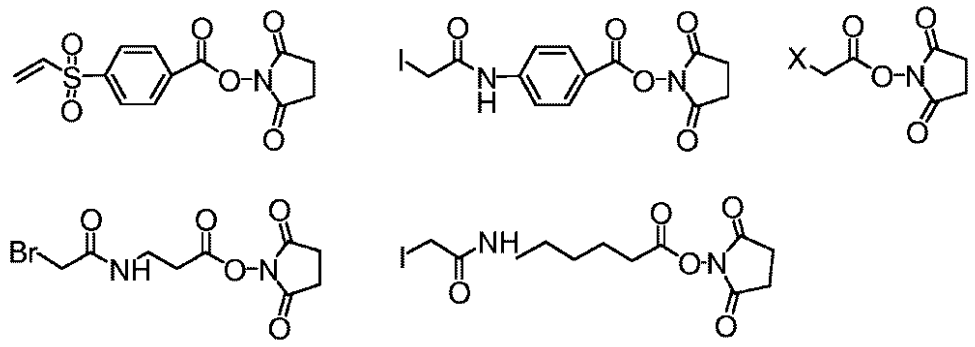

;および


.

ストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬とアミノ酸ユニットのＮ末端とを反応させることによってリンカーに導入することが可能で：

【０５９８】

【化４３】



式中、ＸはＢｒまたはＩである。

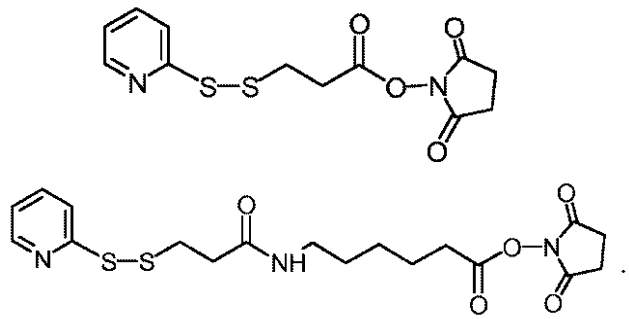
【０５９９】

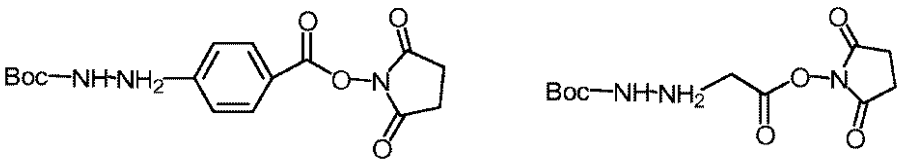
式のストレッチャーユニットはまた、以下の二官能試薬とアミノ酸ユニットのＮ末端と

を反応させることによってリンカーに導入することができる：

【０６００】

【化４４】

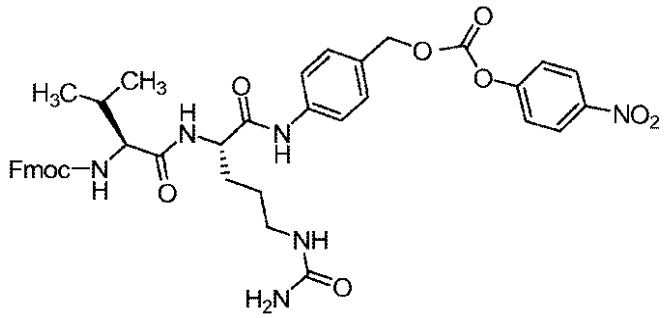




マレイミドストレッチャーとパラ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）自己犠牲的スペーサーとを有する例示的なバリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔまたはｖｃ）ジペプチドリンカー試薬は、以下の構造を有する：

【０６０１】

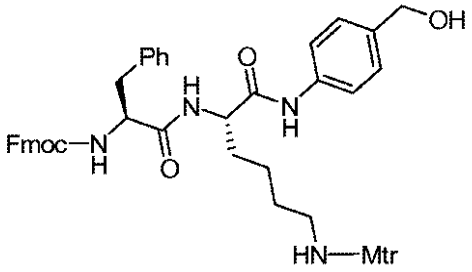
【化４５】



マレイミドストレッチャーユニットとＰＡＢ自己－犠牲的スペーサーユニットとを有する例示的なｐｈｅ－ｌｙｓ（Ｍｔｒ、モノ－４－メトキシトリチル）ジペプチドリンカー試薬は、Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら、（１９９７）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，３８：５２５７～６０に従って調製されてもよく、以下の構造を有する：

【０６０２】

【化４６】



システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬物コンジュゲートの調製

式ＩのＡＤＣは、当業者に公知の有機化学的反応、条件および試薬を使用して、いくつかの経路によって、例えば、（１）システイン操作抗体のシステイン基とリンカー試薬と

の反応によって、共有結合を介した抗体－リンカー中間生成物Ａｂ－Ｌを形成させ、それに続く活性な薬物部分Ｄとの反応；および（２）薬物部分の求核基とリンカー試薬との反応によって、共有結合を介して薬物－リンカー中間生成物Ｄ－Ｌを形成させ、それに続くシステイン操作抗体のシステイン基との反応、などによって調製されてもよい。コンジュゲート方法（１）および（２）は、種々のシステイン操作抗体、薬物部分およびリンカーを使用して行い、式Ｉの抗体－薬物コンジュゲートを調製してもよい。

【０６０３】

抗体システインチオール基は求核基であり、反応して、リンカー試薬および薬物－リンカー中間生成物の求電子基と共有結合することが可能で、このリンカー試薬および薬物－リンカー中間生成物としては：（ｉ）活性エステル類、例えばＮＨＳエステル類、ＨＯＢｔエステル類、ハロギ酸類および酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類、（ｉｉｉ）アルデヒド類、ケトン類、カルボキシルおよびマレイミド基；ならびに（ｉｖ）スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドが挙げられる。薬物部分の求核基としては限定するものではないが、以下が挙げられる：リンカー成分およびリンカー試薬の求電子基と共有結合するように反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸およびアリールヒドラジド基。

【０６０４】

システイン操作抗体は、ＤＴＴ（クリーランド試薬、ジチオスレイトール）またはＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンヒドロクロライド；Ｇｅｔｚら、（１９９９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｖｏｌ　２７３：７３～８０；Ｓｏｌｔｅｃ　Ｖｅｎｔｕｒｅｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）などの還元剤にて処理した後に、鎖間および鎖内のジスルフィド結合を再形成させるように再酸化させることによって、リンカー試薬とのコンジュゲーションに対して反応性にしてもよい（実施例５）。例えば、ＣＨＯ細胞で発現される全長のシステイン操作モノクローナル抗体（ＴｈｉｏＭａｂ）を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成し得る、システイン付加物のジスルフィド結合を還元するために、およそ５０倍の過剰なＴＣＥＰにて３７℃で３時間かけて還元する。還元されたＴｈｉｏＭａｂを希釈して、１０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ５にてＨｉＴｒａｐ　Ｓカラムにロードして、０．３Ｍの塩化ナトリウムを含むＰＢＳにて溶出する。希釈（２００ｎＭ）硫酸銅水（$CuSO_4$）を用いて、室温に一晩置くことにより親Ｍａｂに存在するシステイン残基間にジスルフィド結合が再構築された。あるいは、デヒドロアスコルビン酸（ＤＨＡＡ）は、システイン付加物の還元分解反応の後にシステイン操作抗体の鎖内ジスルフィド基を再構築させるための有効な酸化体である。当該分野で公知の他の酸化体、すなわち酸化剤および酸化条件が用いられてもよい。外気酸化も有効である。この温和な部分的な再酸化工程により、高品位の鎖内ジスルフィドが効率よく形成され、新たに導入されたシステイン残基のチオール基が維持される。およそ１０倍過剰な薬物－リンカー中間生成物、例えばＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを添加し、混合して、室温におよそ１時間置いて、コンジュゲーションに作用させて、抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬物コンジュゲートを形成させた。コンジュゲーション混合物をゲル濾過し、ＨｉＴｒａｐ　Ｓカラムにロードして溶出させ、過剰な薬物－リンカー中間生成物および他の不純物を除去した。

【０６０５】

図１６は、コンジュゲーションのために細胞培養物から発現されるシステイン操作抗体を調製するための一般的な方法を示す。細胞培養培地にシステインを含む場合、新たに導入されたシステインアミノ酸と培地のシステインとの間にジスルフィド付加物が形成し得る。これらのシステイン付加物（図１６の例示的なＴｈｉｏＭａｂ（左）に丸で示す）は、コンジュゲーションに反応性であるシステイン操作抗体を生成するために還元されなければならない。システイン付加物は、おそらく種々の鎖間ジスルフィド結合とともに、ＴＣＥＰなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、ＤＨＡＡまたは周囲酸

素への曝露による不完全酸化条件下で再形成される。新たに導入され、改変され、対形成しないシステイン残基は、リンカー試薬または薬物－リンカー中間生成物と反応して本発明の抗体コンジュゲートを形成するために利用できる状態のままである。哺乳類の細胞株において発現されるＴｈｉｏＭａｂは、－Ｓ－Ｓ－結合形成によって外部からコンジュゲートされた改変ＣｙｓへのＣｙｓ付加物となる。したがって、精製されたＴｈｉｏＭａｂを、実施例５に記載の還元および再酸化の手順にて処理して、反応性のＴｈｉｏＭａｂｓを作製する。これらのＴｈｉｏＭａｂを用いて、細胞毒性薬、発蛍光団および他の標識を含んでいるマレイミドとコンジュゲートさせる。

【０６０６】

１０．免疫リポソーム

本明細書中に開示された抗ＣＤ７９ｂ抗体はまた、免疫リポソームとして処方されてもよい。「リポソーム」は種々のタイプの脂質、リン脂質および／またはサーファクタントから構成される小胞であって、哺乳動物への薬物の送達に有用である。リポソームの成分は通常は、生物学的な膜の脂質配置と同様の二重層形式で配置される。抗体を含んでいるリポソームは、例えば、Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８２；３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：４０３０（１９８０）；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；ならびに１９９７年１０月２３日公開の国際公開第９７／３８７３１号に記載されるような当該分野で公知の方法によって調製される。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示される。

【０６０７】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含んでいる脂質組成物を用いる逆相エバポレーション法によって作成され得る。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを得るために、規定の細孔のサイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のＦａｂフラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Ｍａｒｔｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：２８６～２８８（１９８２）に記載されるように、リポソームに結合体化され得る。化学治療剤は、必要に応じて、リポソーム内に含まれる。Ｇａｂｉｚｏｎら、Ｊ．Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８１（１９）１４８４（１９８９）を参照のこと。

【０６０８】

Ｂ．抗体を作製する特定の方法

１．所望の特性を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体のスクリーニング

ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合する抗体を作製するための技術は上記されている。さらに、必要に応じて、特定の生物学的特徴を有する抗体を選択することができる。

【０６０９】

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体の増殖阻害効果を、例えば、内因性にまたはＣＤ７９ｂ遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでＣＤ７９ｂ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、適切な腫瘍細胞株およびＣＤ７９ｂでトランスフェクトした細胞は、数日間（例えば、２～７）日、種々の濃度の本発明の抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体で処理し、クリスタルバイオレットもしくはＭＴＴで染色するか、または幾つかの他の比色アッセイによって分析してもよい。増殖を測定する別の方法は、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体の存在または非存在下で処理した細胞による ^{3}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の量をシンチレーションカウンターで定量化する。適切なポジティブコントロールは、細胞株の成長を阻害することが公知である増殖阻害抗体でその選択した細胞株の処理を包含する。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害は、当該分野で公知である種々の方法で確かめることができる。腫瘍細胞は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを過剰発現するものであり得る。抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ある実施形態では、約０．５から３０μｇ／ｍｌの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約２５～１００％、より好ましくは約３０～

１００％、そしてさらにより好ましくは約５０～１００％または７０～１００％までＣＤ７９ｂ発現腫瘍細胞の細胞増殖をインビトロまたはインビボで阻害する。増殖阻害は、細胞培養中で、約０．５～３０μｇ／ｍｌまたは約０．５ｎＭ～２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、その増殖阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後１～１０日で確かめられる。体重１ｋｇあたり約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇでの抗ＣＤ７９ｂ抗体の投与が、抗体の最初の投与から約５日から３ヶ月、好ましくは約５から３０日以内に腫瘍の大きさの減少または腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで増殖阻害性である。

【０６１０】

細胞死を誘発する抗ＣＤ７９ｂ抗体を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルーまたは７ＡＡＤの取り込みにより示される膜の完全性の損失度合いをコントロールに対して評価してもよい。ＰＩ取り込みアッセイは、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で行われ得る。ＣＤ７９ｂポリペプチド発現腫瘍細胞を、培地のみ、または適切な抗ＣＤ７９ｂ抗体（例えば約１０μｇ／ｍｌ）を含有する培地でインキュベートする。細胞を３日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために３５ｍｍのストレーナキャップ付き１２×７５試験管（試験管あたり１ｍｌ、処理グループあたり３試験管）にアリコートする。次いで、試験管へＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を入れる。サンプルは、ＦＡＣＳＣＡＮ（登録商標）フローサイトメータおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（登録商標）セルクエスト（ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ）ソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を用いて分析してもよい。ＰＩ取り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ＣＤ７９ｂ抗体を、細胞死誘発性抗ＣＤ７９ｂ抗体として選択してもよい。

【０６１１】

目的の抗体が結合したＣＤ７９ｂポリペプチド上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，編集ＨａｒｌｏｗおよびＤａｖｉｄ　Ｌａｎｅ（１９８８）に記載されているような慣用的な交差ブロッキングアッセイを行ってもよい。このアッセイを用いて、試験抗体が公知の抗ＣＤ７９ｂ抗体と同じ部位またはエピトープと結合するか否かを確定することができる。あるいは、または追加的に、エピトープマッピングを、当該分野で公知の方法によって行ってもよい。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、ＣＤ７９ｂポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群を用いるか、または試験抗体および特徴付けられるかもしく公知のエピトープを有する抗体を用いる競合アッセイで用いてもよい。

【０６１２】

２．特定のライブラリスクリーニング法

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、所望の活性（単数または複数）を有する抗体についてスクリーニングするためにコンビナトリアルライブラリーを用いて作製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製して、所望の結合特徴を保有する抗体についてこのようなライブラリーをスクリーニングするためには、当該分野で種々の方法が公知である。このような方法は、一般にＭｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１７８：１～３７（Ｏ’Ｂｒｉｅｎら、編集，Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）のＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、（２００１）に、特定の実施形態では、Ｌｅｅら、（２００４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４０：１０７３～１０９３に記載されている。

【０６１３】

原則的に、合成の抗体クローンは、ファージのコートタンパク質と融合した抗体可変領域（Ｆｖ）の種々のフラグメントを提示するファージを含んでいるファージライブラリー

をスクリーニングすることによって選択する。このようなファージライブラリーは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィによって選別される。所望される抗原と結合することができるＦｖフラグメントを発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリーの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンを、抗原から溶出させ、抗原吸収／溶出の追加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、目的のファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手順を設計し、続いて、目的のファージクローンからのＦｖ配列、およびＫａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１～３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），１～３巻に記載の適切な定常領域（Ｆｃ）配列を用いる全長抗ＣＤ７９ｂ抗体クローンの構築によって得ることができる。

【０６１４】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合ドメインは、約１１０アミノ酸の２つの可変（Ｖ）領域である各々が軽（ＶＬ）および重（ＶＨ）鎖由来の領域で形成され、その双方には、３つの超可変ループ（ＨＶＲ）または相補鎖決定領域（ＣＤＲ）が存在する。可変ドメインは、Ｗｉｎｔｅｒら、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３～４５５（１９９４）に記載のように、ＶＨおよびＶＬが短くて可塑性のペプチドを通じて共有結合している一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）フラグメントとして、または各々が定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているＦａｂフラグメントとしてファージ上に機能的に提示することができる。本明細書において用いる場合、ｓｃＦｖをコードするファージクローン、およびＦａｂをコードするファージクローンは、総称して「Ｆｖファージクローン」または「Ｆｖクローン」と呼ばれる。

【０６１５】

ＶＨおよびＶＬ遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって分離してクローニングし、ファージライブラリーにおいてランダムに組み換えることが可能であり、次いでこれを、Ｗｉｎｔｅｒら、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３～４５５（１９９４）に記載のように抗原－結合クローンについて探索することが可能である。免疫した供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然のレパートリーをクローニングして、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら、ＥＭＢＯ Ｊ，１２：７２５～７３４（１９９３）に記載のようになんら免疫化することなく、広範な非自己およびまた自己抗原に対するヒト抗体の単一の供給源を得ることが可能である。最終的には、天然ライブラリーは、また、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１～３８８（１９９２）に記載のように、幹細胞からの再配列されていないＶ遺伝子セグメントをクローニングすること、およびランダム配列を有するＰＣＲプライマーを用いて高度に可変のＣＤＲ３領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって、合成的に作製することができる。

【０６１６】

ある実施形態では、繊維状ファージは、マイナーなコートタンパク質ｐＩＩＩへの融合によって、抗体フラグメントを提示するのに用いられる。この抗体フラグメントは、一本鎖Ｆｖフラグメントとして提示することが可能であり、そのＶＨおよびＶＬドメインは、例えば、Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１～５９７（１９９１）に記載のように、または、Ｆａｂフラグメントとして、可塑性のポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されており、ここでは例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．，１９：４１３３～４１３７（１９９１）に記載のように一方の鎖はｐＩＩＩと融合し、他方の鎖は、いくつかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に提示されるようになるＦａｂコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞の周辺質へ分泌される。

【０６１７】

一般的に、抗体遺伝子フラグメントをコードする核酸は、ヒトまたは動物から収集した

免疫細胞から得られる。抗ＣＤ７９ｂクローンに有利になるように偏ったライブラリーが望ましい場合には、被験体をＣＤ７９ｂで免疫化して抗体応答を生じさせ、そして、脾臓細胞および／または他の末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である循環Ｂ細胞を、ライブラリー構築のために回収する。好ましい実施形態では、ＣＤ７９ｂ免疫化により、ＣＤ７９ｂに対するヒト抗体を産生するＢ細胞が生じるように、抗ＣＤ７９ｂクローンに有利に偏ったヒト抗体遺伝子フラグメントライブラリーを、機能的なヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを担持している（そして、機能的な内因性抗体産生系を欠いている）トランスジェニックマウスにおいて抗ＣＤ７９ｂ抗体応答を生じさせることによって得る。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【０６１８】

抗ＣＤ７９ｂ反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手順を用いてＣＤ７９ｂ特異的膜結合抗体を発現するＢ細胞を単離すること、例えば、ＣＤ７９ｂアフィニティクロマトグラフィによる細胞分離、または蛍光色素標識ＣＤ７９ｂへの細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器（ＦＡＣＳ）によって得ることができる。

【０６１９】

あるいは、非免疫化ドナー由来の脾臓細胞および／またはＢ細胞または他のＰＢＬの利用によって、可能性のある抗体レパートリーのより良い代表が得られ、またＣＤ７９ｂが抗原性ではない任意の動物（ヒトまたは非ヒト）種を用いた抗体ライブラリーの構築も可能となる。インビトロの抗体遺伝子構築物を取り込むライブラリーに関しては、幹細胞を被験体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。目的の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、および鳥類などから得ることができる。

【０６２０】

抗体可変遺伝子セグメント（ＶＨおよびＶＬセグメントを含む）をコードする核酸を、目的の細胞から回収して増幅した。再配列したＶＨおよびＶＬ遺伝子ライブラリーの場合には、その所望のＤＮＡは、Ｏｒｌａｎｄｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），８６：３８３３～３８３７（１９８９）に記載されているように、リンパ球からゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡを単離すること、続いて、再配列したＶＨおよびＶＬ遺伝子の５’および３’末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行うことによって得ることが可能であり、これによって発現のための多様なＶ遺伝子レパートリーが作製される。このＶ遺伝子は、Ｏｒｌａｎｄｉら、（１９８９）およびＷａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ，３４１：５４４～５４６（１９８９）に記載のように、成熟Ｖドメインをコードするエクソンの５’末端のバックプライマーとＪセグメントに基づいたフォワードプライマーにより、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡから増幅することが可能である。しかしながら、ｃＤＮＡからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Ｊｏｎｅｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９：８８～８９（１９９１）に記載のようにリーダーエクソンに、フォワードプライマーは、Ｓａｓｔｒｙら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８６：５７２８～５７３２（１９８９）に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Ｏｒｌａｎｄｉら、（１９８９）またはＳａｓｔｒｙら、（１９８９）に記載のように、縮重をプライマーに組み込むことが可能である。特定の実施形態では、例えば、Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１～５９７（１９９１）の方法に記載のように、またはＯｒｕｍら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１：４４９１～４４９８（１９９３）の方法に記載のように、免疫細胞の核酸サンプルに存在する全ての入手可能なＶＨおよびＶＬ配列を増幅するために、各Ｖ遺伝子ファミリーを標的にしたＰＣＲプライマーを用いて、そのライブラリーの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅ＤＮＡのクローニングに関しては、希な制限部位を、Ｏｒｌａｎｄｉら、（１９８９）に記載のように、またはＣｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８（１９９１）に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるＰＣＲ増幅によって、ＰＣＲプライマー内の１つの末端へタグとして導入することができる。

【０６２１】
合成的に再配列したＶ遺伝子のレパートリーは、Ｖ遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。ほとんどのヒトＶＨ遺伝子セグメントはクローニングおよび配列決定（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６～７９８（１９９２）に報告）されており、そしてマッピングされている（Ｍａｔｓｕｄａら，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．，３：８８～９４（１９９３）に報告）；これらクローニングされたセグメント（Ｈ１およびＨ２ループの全ての主要な高次構造を含む）は、ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１～３８８（１９９２）に記載のように、多様な配列および長さのＨ３ループをコードするＰＣＲプライマーを用いて多様なＶＨ遺伝子レパートリーを作製するのに用いられ得る。ＶＨレパートリーは、また、Ｂａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４４５７～４４６１（１９９２）に記載されているように、単一の長さの長いＨ３ループに焦点を合わせた全ての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトのＶκおよびＶλセグメントは、クローニングおよび配列決定がなされており（ＷｉｌｌｉａｍｓおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２３：１４５６～１４６１（１９９３）に報告されている）、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。ＶＨおよびＶＬフォールドの範囲ならびにＬ３およびＨ３の長さに基づく合成的Ｖ遺伝子レパートリーは、かなりの構造的多様性を有する抗体をコードするであろう。ＤＮＡをコードするＶ遺伝子の増幅に続いて、生殖系のＶ遺伝子セグメントは、ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１～３８８（１９９２）の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

【０６２２】
抗体フラグメントのレパートリーは、いくつかの方法でＶＨおよびＶＬ遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各々のレパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えば、Ｈｏｇｒｅｆｅら、Ｇｅｎｅ，１２８：１１９～１２６（１９９３）に記載のようにインビトロで、またはコンビナトリアルインフェクション、例えばＷａｔｅｒｈｏｕｓｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１：２２６５～２２６６（１９９３）に記載のｌｏｘＰ系によってインビボで組み換え作製することが可能である。このインビボの組み換えアプローチでは、Ｅ．ｃｏｌｉ．の形質転換効率によって強いられるライブラリーの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のＦａｂフラグメントが利用される。ナイーブなＶＨおよびＶＬレパートリーは、１つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この２つのライブラリーは、その後、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられ、その結果、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリーの大きさは、存在する細胞の数（約10^{12}クローン）によってのみ制限される。双方のベクターは、ＶＨおよびＶＬ遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ一緒にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを含む。これら巨大なライブラリーは、良好な親和性（約10^{-8}ＭのK_d^{-1}）である多数の多様な抗体を提供する。

【０６２３】
別法として、このレパートリーは、例えばＢａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：７９７８～７９８２（１９９１）に記載のように同じベクターへ連続してクローニングされてもよいし、または、Ｃｌａｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８（１９９１）に記載のようにＰＣＲとその後クローニングすることによって一緒にアセンブリされてもよい。ＰＣＲアセンブリはまた、ＶＨおよびＶＬのＤＮＡと、可塑性のペプチドスペーサーをコードしているＤＮＡとを連結させて、単鎖のＦｖ（ｓｃＦｖ）レパートリーを形成することに用いてもよい。さらに別の技術では、「細胞内でのＰＣＲアセンブリ」は、Ｅｍｂｌｅｔｏｎら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２０：３８３１～３８３７（１９９２）に記載のように、ＰＣＲによってリンパ球内でＶＨおよびＶＬ遺伝子を組み合わせて、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに用いられる。

【０６２４】
ナイーブなライブラリー（天然または合成のいずれか）によって産生された抗体は、中度の親和性（約10^6～$10^7 M^{-1}$のK_d^{-1}）である可能性があるが、Ｗｉｎｔｅｒら（１９９４）（上掲）に記載のように二次的なライブラリーから構築して再選択することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Ｈａｗｋｉｎｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９～８９６（１９９２）の方法、またはＧｒａｍら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，８９：３５７６～３５８０（１９９２）の方法においてエラープローンポリメラーゼ（Ｌｅｕｎｇら、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，１：１１～１５（１９８９）で報告されている）を用いることによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、１つ以上のＣＤＲをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のＦｖクローンにおいて、目的のＣＤＲまでおよぶランダムな配列を担持しているプライマーによるＰＣＲを用いて、およびより高い親和性クローンをスクリーニングすることによって親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第９６０７７５４号（１９９６年3月１４日に公開）は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリーを作製する方法を記載している。別の有効なアプローチは、Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１０：７７９～７８３（１９９２）に記載のように、非免疫化ドナーから得られた天然に存在するＶドメイン改変体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたＶＨまたはＶＬドメインを組み換えること、および数回のチェーンシャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術によって、約10^{-9}Ｍ以下という親和性の抗体および抗体フラグメントの産生が可能になる。

【０６２５】
ライブラリーのスクリーニングは、当該分野で公知の種々の技術によって達成できる。例えば、ＣＤ７９ｂを用いて、吸収プレートのウェルをコーティングしてもよいし、吸収プレートへ固定させた宿主細胞上で発現させてもよいし、もしくはセルソーティングで用いてもよいし、またはストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートしてもよいし、またはファージディスプレイライブラリーをパニングするための任意の他の方法において用いてもよい。

【０６２６】
吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適切な条件下で、ファージライブラリーのサンプルを固定したＣＤ７９ｂと接触させる。通常は、ｐＨ、イオン強度、温度などを含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばＢａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：７９７８～７９８２（１９９１）に記載されているように酸で、または例えばＭａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１～５９７（１９９１）に記載にされているようにアルカリで、または例えばＣｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４～６２８（１９９１）の抗原競合法に類似の手順においてＣＤ７９ｂ抗原競合によって溶出する。ファージは、１回目の選択で２０～１０００倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で増殖させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

【０６２７】
選択の効率は多くの要因に依存し、それの要因としては、洗浄の間の解離の反応速度論、そして単一のファージ上の複数の抗体フラグメントが同時に抗原と関われるか否かということが挙げられる。速い解離定数（および弱い結合親和性）を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイおよび固相の抗原の高いコーティング密度を用いることによって保持することが可能である。高密度は、多価相互作用を通じてファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学（および良好な結合親和性）を有する抗体の選択は、Ｂａｓｓら、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９～３１４（１９９０）および国際公開第９２／０９６９０号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてＭａｒｋｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１

０：７７９～７８３（１９９２）に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【０６２８】

ＣＤ７９ｂに対する異なる親和性のファージ抗体の間で選択することは、親和性に僅かな違いさえあれば可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異（例えば、いくつかの親和性成熟の技術で行われているような）は、多くの変異を生じやすく、そのほとんどが抗原と結合し、より高い親和性なのはわずかである。ＣＤ７９ｂを限定すると、希な高い親和性のファージを競合して除くことが可能であろう。全てのより高い親和性の変異体を保持するために、ファージは、過度のビオチン化ＣＤ７９ｂとインキュベートしてもよいが、ＣＤ７９ｂに対する標的モル親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化ＣＤ７９ｂとインキュベートしてもよい。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」によって、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、わずかに２倍程度高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することが可能になる。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数に基づいて識別することも可能である。

【０６２９】

抗ＣＤ７９ｂクローンは、活性に基づいて選択可能である。特定の実施形態では、本発明は、ＣＤ７９ｂを天然に発現する生きている細胞に結合する抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、ＣＤ７９ｂリガンドとＣＤ７９ｂとの間の結合をブロックするが、ＣＤ７９ｂリガンドと第二のタンパク質との間の結合をブロックしない抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。このような抗ＣＤ７９ｂ抗体に対応するＦｖクローンは、（１）上記のようなファージライブラリーから抗ＣＤ７９ｂクローンを単離し、必要に応じて、適切な細菌宿主で個体集団を成長させることによって、ファージクローンの単離した母集団を増幅する工程；（２）それぞれブロック活性および非ブロック活性のいずれが望まれるかについてＣＤ７９ｂおよび第二タンパク質を選択する工程；（３）固定されたＣＤ７９ｂに抗ＣＤ７９ｂファージクローンを吸着する工程；（４）過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と重複するかまたは共有されるＣＤ７９ｂ－結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する工程；ならびに（５）工程（４）の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する工程、によって選別できる。必要に応じて、所望のブロック／非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を１つ以上回繰り返すことによって、さらに濃縮してもよい。

【０６３０】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡまたは本発明のファージディスプレイＦｖクローンは、従来の手順を用いて（例えば、ハイブリドーマまたはファージＤＮＡテンプレートから目的の領域をコードする重鎖および軽鎖を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより）容易に単離されて、配列決定される。一旦、単離されれば、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Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞における所望の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総説文献としては、Ｓｋｅｒｒａら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６（１９９３）およびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．１３０：１５１（１９９２）が挙げられる。

【０６３１】

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖および／または軽鎖定常領域をコードする公知のＤＮＡ配列（例えば、適切なＤＮＡ配列は上掲のＫａｂａｔら、から得ることができる）と組み合わせて、全長もしくは一部の重鎖および／または軽鎖をコードするクローンを形成できる。この目的のために、任意のアイソタイプの定常領域、例えばＩｇ

Ｇ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥ定常領域を用いることができること、ならびにこのような定常領域は任意のヒトまたは動物種から得ることができるということが理解されるであろう。ある動物（例えばヒト）種の可変ドメインＤＮＡに由来し、次いで「ハイブリッド」である全長の重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成するために別の動物種の定常領域ＤＮＡに融合されたＦｖクローンは、本明細書で用いられる「キメラ」および「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。特定の実施形態では、ヒト可変ＤＮＡから得たＦｖクローンをヒト定常領域ＤＮＡに融合して、全長もしくは部分長のヒト重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成する。

【０６３２】

ハイブリドーマ由来の抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード化配列を置換すること（例えばＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１～６８５５（１９８４）の方法）によって修飾することができる。ハイブリドーマまたはＦｖクローン由来の抗体もしくは抗体フラグメントをコードするＤＮＡ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のコード配列の全てまたは一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのような方法で、「キメラ」または「ハイブリッド」抗体は、本発明のＦｖクローンまたはハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

【０６３３】

Ｃ．抗体依存性の酵素媒介性プロドラッグ療法（ＡＤＥＰＴ）

本発明の抗体はまた、プロドラッグ（例えばペプチジル化学療法剤、国際公開第８１／０１１４５号を参照のこと）を活性な抗癌剤に変換するプロドラッグ活性化酵素に対してこの抗体をコンジュゲートさせることにより、ＡＤＥＰＴにおいて用いることもできる。例えば国際公開第８８／０７３７８号および米国特許第４，９７５，２７８号を参照のこと。

【０６３４】

ＡＤＥＰＴに対して有用なイムノコンジュゲートの酵素成分としては、プロドラッグをそのより活性な細胞毒性型に変換するような方法でプロドラッグに作用しうる任意の酵素を包含する。

【０６３５】

本発明の方法に有用である酵素としては、限定するものではないが、リン酸含有プロドラッグを遊離ドラッグに変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；イオウ含有プロドラッグを遊離ドラッグに変換するのに有用なアリルスルファターゼ；非毒性５－フルオロシトシンを抗ガン薬、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、ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用である、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン（ｔｈｅｍｏｌｙｓｉｎ）、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（カテプシンＢおよびＬなど）；Ｄアミノ酸置換体を含むプロドラッグを変換するのに有用な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ドラッグに変換するのに有用なβ－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ；β－ラクタムを用いて誘導化されたドラッグを遊離ドラッグに変換するのに有用なβ－ラクタマーゼ；ならびに、ペニシリンアミダーゼ、例えば、そのアミン窒素でそれぞれフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基を用いて誘導化された薬物を遊離の薬物に変換するのに有用なペニシリンＶアミダーゼまたはペニシリンＧアミダーゼが挙げられる。あるいは、当該分野で「アブザイム」として公知の酵素学的活性を持つ抗体を、本発明のプロドラッグを遊離活性ドラッグに変換するために用いてもよい（例えばＭａｓｓｅｙ，Ｎａｔｕｒｅ ３２８：４５７～４５８（１９８７）を参照のこと）。抗体－アブザイムコンジュゲートは、腫瘍細胞集団へアブザイムの送達のために本明細書で記載されているように調製してもよい。

【０６３６】

本発明の酵素は、上記で考察されているヘテロ二官能架橋試薬の使用のような当該分野

で周知の技術によって抗ＣＤ７９ｂ抗体に共有結合されてもよい。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を、当該分野で周知の組換えＤＮＡ法を用いて構築してもよい（例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３１２：６０４～６０８（１９８４）を参照のこと）。

【０６３７】

Ｄ．抗ＣＤ７９ｂ抗体

本明細書に記載される抗ＣＤ７９ｂ抗体に加えて、抗ＣＤ７９ｂ抗体改変体も調製できると考えられる。抗ＣＤ７９ｂ抗体改変体は、コードするＤＮＡに適切なヌクレオチド変化を導入することによって、および／または所望の抗体もしく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、グリコシル化部位の数または位置を変化すること、あるいは膜固着特性を変更することなどのアミノ酸変化が抗ＣＤ７９ｂ抗体の翻訳後プロセシングを変化し得るということを理解するであろう。

【０６３８】

本明細書に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体のバリエーションは、例えば、米国特許第５，３６４，９３４号に記載されている保存的変異および非保存的変異についての任意の技術およびガイドラインを例えば用いて作製することができる。バリエーションは、天然配列の抗体またはポリペプチドと比較してアミノ酸配列に変化を生じる、この抗体またはポリペプチドをコードする１つ以上のコドンの置換、欠失または挿入であってよい。必要に応じて、このバリエーションは少なくとも１つのアミノ酸を抗ＣＤ７９ｂ抗体の１つ以上のドメインの任意の他のアミノ酸で置換することによる。いずれ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、置換または欠失されるかを決定する指針は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされる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得る。アミノ酸置換は、１つのアミノ酸を類似した構造および／または化学特性を有する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、すなわち保存的アミノ酸置換の結果である場合がある。挿入および欠失は、場合によっては約１から５個のアミノ酸の範囲内であってもよい。許容されるバリエーションは、配列においてアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的に作成すること、得られた改変体を全長または成熟した天然の配列によって示される活性について試験することにより確認され得る。

【０６３９】

抗ＣＤ７９ｂ抗体フラグメントが本明細書において提供される。このようなフラグメントは、例えば、全長の天然の抗体またはタンパク質と比較した場合に、Ｎ－末端もしくはＣ－末端で短縮されてもよいし、または内部残基を欠いていてもよい。ある種のフラグメントは、抗ＣＤ７９ｂ抗体の所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

【０６４０】

抗ＣＤ７９ｂ抗体フラグメントは、任意の多くの従来技術によって調製することができる。所望のペプチドフラグメントは化学合成してもよい。代替的なアプローチは、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが公知の酵素でタンパク質を処理することによって、または適切な制限酵素でＤＮＡを消化して所望のフラグメントを単離することによって、抗体またはポリペプチドのフラグメントを作製する工程を包含する。さらに別の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、所望の抗体またはポリペプチドのフラグメントをコードするＤＮＡフラグメントを単離し増幅する工程を包含する。ＤＮＡフラグメントの所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲの５’および３’プライマーで使用される。好ましくは、抗ＣＤ７９ｂ抗体フラグメントは、本明細書に開示された天然の抗ＣＤ７９ｂ抗体と少なくとも１つの生物学的および／または免疫学的活性を共有する。

【０６４１】

特別の実施形態では、目的の保存的置換を、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ならば、表６に例示的置換と名前を付けるか、また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て、生成物がスクリーニングされる。

【０６４２】

【表６】

表6

もとの残基	例示的な置換	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

抗ＣＤ７９ｂ抗体の機能または免疫学的同一性の実質的な修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシートもしくはらせん高次構造、（ｂ）標的部位の分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のおおきさ（バルク）を維持することに、それらの効果が実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に存在する残基は共通の側鎖特性に基づいて以下のグループに分けられる：

（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；および

（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０６４３】

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

【０６４４】

バリエーションは、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、およびＰＣＲ突然変異誘発などの当該分野で公知の方法を用いて作製できる。部位特異的な突然変異［Ｃａｒｔｅｒら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１３：４３３１（１９８６）；Ｚｏｌｌｅｒら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１０：６４８７（１９８７）］、カセット突然変異誘発［Ｗｅｌｌｓら，Ｇｅｎｅ，３４：３１５（１９８５）］、制限的選択突然変異誘発［Ｗｅｌｌｓら，Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄｏｎ ＳｅｒＡ，３１７：４１５（１９８６）］または他の公知の技

術をクローニングしたＤＮＡに実施して、抗ＣＤ７９ｂ抗体改変体ＤＮＡを作製することができる。

【０６４５】

スキャンニングアミノ酸分析を使用して隣接配列に沿って１つ以上のアミノ酸を同定することができる。とりわけ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としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し改変体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で代表的に好ましいスキャンニングアミノ酸である［ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１～１０８５（１９８９）］。アラニンはまた、最も一般的なアミノ酸であるため代表的には好ましい。さらに、それは埋もれたおよ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改変体を生じない場合は、アイソテリック（ｉｓｏｔｅｒｉｃ）アミノ酸を用いてもよい。

【０６４６】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の適切な高次構造の維持に関与しない任意のシステイン残基はまた、一般にセリンで置換されて、その分子の酸化に対する安定性を改善し得、そして異常な架橋を妨害し得る。逆に、システイン結合（単数または複数）は、抗ＣＤ７９ｂ抗体に付加されて、その安定性（特に、その抗体がＦｖフラグメントのような抗体フラグメントである場合）を改善し得る。

【０６４７】

特に好ましい型の置換改変体は、親の抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の１つ以上の超可変領域残基を置換する工程に関与する。一般に、さらなる開発のために選択された得られた改変体（単数または複数）は、それらが生成される親の抗体に比較して改善された生物学的特性を有する。そのような置換改変体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟を包含する。要するに、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７個の部位）を変異させて全ての可能なアミノ置換を各部位に生成する。このように生成された抗体改変体は、糸状ファージ粒子から一価の様式で、各粒子内にパッケージングされたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物に対する融合物として提示される。次いで、ファージディスプレイされた改変体は、本明細書において開示されるように、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。改変について候補となる超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定してもよい。あるいはまたはさらに、抗原－抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とＣＤ７９ｂポリペプチドとの間の接触点を同定することも有利であり得る。そのような接触残基および隣接する残基は、本明細書において説明される技術に従う置換のための候補である。一旦そのような改変体が生成されれば、改変体のパネルが、本明細書において記載されるスクリーニングに供され、そして１つ以上の関連するアッセイにおいて優越した特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択することができる。

【０６４８】

抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ酸配列改変体をコードする核酸分子は、当該分野で公知の種々の方法によって調製される。これらの方法としては、天然の供給源（天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合）からの単離、または抗ＣＤ７９ｂ抗体の初期調製の改変体もしくは非改変体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介性（または部位指向性）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、およびカセット変異誘発による調製が挙げられるが、それらに限定されない。

【０６４９】

Ｅ．抗ＣＤ７９ｂ抗体の修飾

抗ＣＤ７９ｂ抗体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

１つの型は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の標的とするアミノ酸残基と、抗ＣＤ７９ｂ抗体の選択された側鎖またはＮ末端もしくはＣ末端残基と反応できる有機誘導体化剤とを反応させる工程を包含する。二官能性剤での誘導体化は、例えば抗ＣＤ７９ｂ抗体を、抗ＣＤ７９ｂ抗体の精製方法で用いるための水不溶性支持体マトリクスもしくは表面に架橋させるのにも、またはその逆にも有用である。通常用いられる架橋剤としては、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類、例えば４－アジドサリチル酸とのエステル類、３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）などのジスクシンイミジルエステル類を含むホモ二官能性イミドエステル類、ビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンなどの二官能性マレイミド類、およびメチル－３－［（ｐ－アジドフェニル）－ジチオ］プロピオイミダートなどの剤が挙げられる。

【０６５０】

他の修飾としては、グルタミニルおよびアスパラギニル残基の各々対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまた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、およびヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化［Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ｐｐ．７９～８６（１９８３）］、Ｎ末端アミンのアセチル化、および任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０６５１】

本発明の範囲内に含まれる抗ＣＤ７９ｂ抗体の共有結合的修飾の別の型は、抗体また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。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、本明細書の目的については、天然配列抗ＣＤ７９ｂ抗体に見られる１つ以上の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去または化学的および／もしくは酵素的手段によるグリコシル化の欠失のいずれかによる）、および／または天然配列の抗ＣＤ７９ｂ抗体に存在しない１つ以上のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質およ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変化を包含する。

【０６５２】

抗体および他のポリペプチドのグリコシル化は、代表的には、Ｎ連結またはＯ連結のいずれかである。Ｎ連結とは、アスパラギン残基の側鎖に対する炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニン（ここで、Ｘは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に炭水化物部分を酵素的に結合するための認識配列である。従って、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作成する。Ｏ連結のグリコシル化とは、Ｎ－アセチルガラクトサミン（Ｎ－ａｃｅｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ）、ガラクトースまたはキシロースの糖の１つを、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンに対して結合することを指すが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリジンもまた用いられてもよい。

【０６５３】

抗ＣＤ７９ｂ抗体へのグリコシル化部位の付加は、好都合なことに、上記記載の１つ以上のトリペプチド配列を含むように、アミノ酸配列を変化させることにより達成される（Ｎ連結グリコシル化部位について）。この変化はまた、元の抗ＣＤ７９ｂ抗体の配列に、１つ以上のセリンまたはトレオニン残基を加えることによるか、または置換することによって、行なわれてもよい（Ｏ連結グリコシル化部位について）。抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ酸配列は、必要に応じて、ＤＮＡレベルでの変化、特に、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡを予め選択された塩基において変異させ、それによって所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通じて変更されてもよい。

【０６５４】

抗ＣＤ７９ｂ抗体上に炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的または酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、１９８７年9月１１日に発行された国際公開第８７／０５３３０号、ならびにＡｐｌｉｎおよびＷｒｉｓｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，ｐｐ．２５９～３０６（１９８１）に記載されている。

【０６５５】

抗ＣＤ７９ｂ抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグルコシル化の標的として役立つ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達成できる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で公知であり、例えば、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎら，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，２５９：５２（１９８７）により、およびＥｄｇｅら，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１１８：１３１（１９８１）により記載されている。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、種々のエンドおよびエキソグリコシダーゼを用いることにより達成され得る。

【０６５６】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の共有結合的修飾の別の型は、種々の非タンパク質様ポリマー、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、またはポリオキシアルキレンのうちの１つへの、米国特許第４，６４０，８３５号；同第４，４９６，６８９号；同第４，３０１，１４４号；同第４，６７０，４１７号；同第４，７９１，１９２号または同第４，１７９，３３７号に記載された方法で抗体の結合を含む。この抗体はまた、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ェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中か、またはマクロエマルジョン中に、例えば、コアセルベーション技術によるかまたは界面のポリマー化（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ－（メチルメタキシレート）マイクロカプセル）によって調製されたマイクロカプセル中に捕捉されてもよい。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１６版、Ｏｓｌｏ，Ａ．編（１９８０）において開示される。

【０６５７】

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体はまた、別の異種のポリペプチドまたはアミノ酸配列に対して融合された抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでいるキメラ分子を形成するように改変されてもよい。

【０６５８】

一実施形態では、このようなキメラ分子は、抗ＣＤ７９ｂ抗体と、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の融合を含む。エピトープタグは一般的には、抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノまたはカルボキシル末端に位置する。このような抗ＣＤ７９ｂ抗体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、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別の型の親和性マトリクスを用いた親和性精製によって抗ＣＤ７９ｂ抗体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およびそれら各々の抗体は、この分野で周知である。例としては、ポリ－ヒスチジン（ポリ－ｈｉｓ）またはポリ－ヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ ＨＡタグポリペプチドおよびその抗体１２ＣＡ５［Ｆｉｅｌｄら，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，８：２１５９～２１６５（１９８８）］；ｃ－ｍｙｃタグおよびそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７および９Ｅ１０抗体［Ｅｖａｎら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，５：３６１０～３６１６（１９８５）］；および単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグおよびその抗体［Ｐａｂｏｒｓｋｙら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，３（６）：５４７～５５３（１９９０）］が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、フラッグペプチド［Ｈｏｐｐら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６：１２０４－１２１０（１９８８）］；ＫＴ３エピトープペプチド［Ｍａｒｔｉｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５５：１９２～１９４（１９９２）］；α－チューブ

リンエピトープペプチド［Ｓｋｉｎｎｅｒら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６６：１５１６３～１５１６６（１９９１）］；およびＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Ｌｕｔｚ－Ｆｒｅｙｅｒｍｕｔｈら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：６３９３～６３９７（１９９０）］が挙げられる。

【０６５９】

代替的な実施形態では、キメラ分子は抗ＣＤ７９ｂ抗体と、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域との融合物を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体は、ＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも１つの可変領域に換えて抗ＣＤ７９ｂ抗体の可溶化（膜貫通ドメイン欠失または不活性化）形態の置換を包含する。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合物は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、CH_2およびCH_3、またはヒンジ、CH_1、CH_2およびCH_3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号も参照のこと。

【０６６０】

Ｆ．抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製

以下の記載は主に、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養することによる抗ＣＤ７９ｂ抗体の産生に関する。当然ながら、当分野に周知の別の方法を使用して、抗ＣＤ７９ｂ抗体を調製してもよいと考えられる。例えば、固相技術を用いる直接ペプチド合成によって適切なアミノ酸配列またはその一部を産生してもよい（Ｓｔｅｗａｒｔら、Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ（１９６９）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８５：２１４９～２１５４（１９６３）を参照のこと）。インビトロのタンパク質合成は、手動の技術を用いるか、あるいは自動操作により行うことができる。自動化合成は、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を用い、製造元の使用説明に従って行うことができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体の種々の部分を別々に化学合成し、化学的または酵素的方法を用いて組み合わせ、所望の抗ＣＤ７９ｂ抗体を産生してもよい。

【０６６１】

１．抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡの単離

抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡは、抗ＣＤ７９ｂ抗体のｍＲＮＡを保有し、それを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリーから得ることができる。従って、ヒト抗ＣＤ７９ｂ抗体のＤＮＡはヒト組織から調製されたｃＤＮＡライブラリーから簡単に得ることができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから得てもよいし、または合成手順（例えば、自動化核酸合成）によって得てもよい。

【０６６２】

ライブラリーは、目的の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質を特定するように設計されたプローブ（例えば、少なくとも約２０～８０塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングできる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９）に記載のような標準的手法を用い、選択されたプローブでｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードする遺伝子を単離する別の方法は、ＰＣＲ法を用いることである（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、上掲；Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈら、ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９５））。

【０６６３】

ｃＤＮＡライブラリーのスクリーニング技術は当該分野で周知である。プローブとして

選択されたオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性を最小化するのに十分な長さでかつ十分明確なものでなければならない。スクリーニングされるライブラリー中のＤＮＡとのハイブリダイゼーションの際に検出可能であるように、オリゴヌクレオチドを標識するのが好ましい。標識化の方法は当該分野で周知であり、これには、^{32}Ｐ標識したＡＴＰなどの放射性方式、ビオチニル化または酵素標識の使用が挙げられる。中ストリンジェンシーおよび高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、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（上掲）中に提供される。

【０６６４】

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を、ＧｅｎＢａｎｋのような公的なデータベースまたは他の私的配列データベースにおいて寄託されて、入手可能な他の既知の配列と比較し、アラインメントすることができる。分子の規定の領域内または全長配列にわたる（アミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で公知および本明細書で記載されるような方法を用いて決定できる。

【０６６５】

タンパク質コード配列を有する核酸は、最初、本明細書中に開示される、推論されたアミノ酸配列を用いて選択されたｃＤＮＡまたはゲノムのライブラリーをスクリーニングし、必要であれば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（上掲）に記載の慣用のプライマー伸張手順を用いて、ｃＤＮＡに逆転写されなかった場合もあるｍＲＮＡの前駆体およびプロセッシング中間生成物を検出することによって、得ることができる。

【０６６６】

２．宿主細胞の選択および形質転換

抗ＣＤ７９ｂ抗体生産用の本明細書中に記載の発現ベクターまたはクローニングベクターで宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅用に適当なように修飾された従来の栄養培地中で培養する。当業者であれば、過度に実験することなしに、培地、温度、ｐＨなどのような培養条件を選択することができる。一般に、細胞培養物の生産性を最大にするための原理、プロトコルおよび実施技術は、Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｍ．Ｂｕｔｌｅｒ，編集（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９９１）および Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上掲）中に見出すことができる。

【０６６７】

真核生物細胞のトランスフェクション法、および原核生物細胞の形質転換法とは、染色体外として、または染色体成分としてのいずれかでＤＮＡが複製可能であるような宿主へのＤＮＡの導入を意味しており、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介性のポリエリレングリコールＤＭＳＯおよびエレクトロポレーションが、当業者に公知である。用いる宿主細胞に応じ、このような細胞に適当な標準的技術を用いて形質転換を行う。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（上掲）に記載の塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションが一般に、原核生物に用いられる。Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓを用いる感染は、Ｓｈａｗら、Ｇｅｎｅ、２３：３１５（１９８３）および国際公開第８９／０５８５９号（１９８９年６月２９日公開）により記載されるように、特定の植物細胞の形質転換のために用いられる。そのような細胞壁を有さない哺乳動物細胞については、ＧｒａｈａｍおよびＶａｎ ｄｅｒ Ｅｂ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６～４５７（１９７８）のリン酸カルシウム沈殿法が使用され得る。哺乳動物宿主系のトランスフェクションの一般的な局面は、米国特許第４，３９９，２１６号に記載されている。酵母への形質転換は、代表的には、Ｖａｎ Ｓｏｌｉｎｇｅｎら、Ｊ．Ｂａｃｔ．、１３０：９４６（１９７７）およびＨｓｉａｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）、７６：３８２９（１９７９）の方法に従って実施される。しかし、細胞へとＤＮＡを導入するための他の方法、例えば、核のマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞と細菌のプロトプラストとの融合、またはポリカチオン（例えば、ポリブレン、ポリオルニチンなど）による方法もまた

用いられてもよい。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）およびＭａｎｓｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３３６：３４８～３５２（１９８８）を参照のこと。

【０６６８】

本明細書のベクターにおいてＤＮＡをクローニングまたは発現するための適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母、または高等な真核生物の細胞が挙げられる。

【０６６９】

ａ．原核生物宿主細胞

適当な原核生物としては、限定するものではないが、古細菌および真正細菌、例えば、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉが挙げられる。Ｅ．ｃｏｌｉのＫ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ ３１，４４６）；Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）；Ｅ．ｃｏｌｉ株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ ２７，３２５）およびＫ５ ７７２（ＡＴＣＣ ５３，６３５）などの種々のＥ．ｃｏｌｉ株が公的に利用可能である。他の適切な原核生物宿主細胞としては、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ、例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ（例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ）およびＳｈｉｇｅｌｌａ、ならびにＢａｃｉｌｌｉ、例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（例えば、１９８９年４月１２日に公開されたＤＤ２６６，７１０に開示されているＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ ４１Ｐ）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｒｈｉｚｏｂｉａ、Ｖｉｔｒｅｏｓｃｉｌｌａ，ＰａｒａｃｏｃｃｕｓおよびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓが挙げられる。これらの例は、限定的ではなく例示的である。Ｗ３１１０株は、組換えＤＮＡ産物の発酵に対する一般的な宿主株であるので、このＷ３１１０株は、１つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくはこの宿主細胞は、最少量のタンパク分解性酵素を分泌する。例えば、Ｗ３１１０株（Ｂａｃｈｍａｎｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第２巻（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９８７），１１９０～１２１９頁；ＡＴＣＣ寄託番号２７，３２５）を改変して、宿主に対して内因性のタンパク質をコードする遺伝子中の遺伝子変異をもたらしてもよく、このような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有するＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３を有するＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｋａｎ^{r}を有するＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ５５，２４４）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｒｂｓ７ ｉｌｖＧ ｋａｎ^{r}を有するＥ．ｃｏｌｉのＷ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を有する３７Ｄ６株であるＥ．ｃｏｌｉのＷ３１１０株４０Ｂ４；遺伝子型Ｗ３１１０ ΔｆｈｕＡ（ΔｔｏｎＡ）ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ΔｏｍｐＴΔ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ｄｅｇＰ４１ ｋａｎ^{R}を有するＥ．ｃｏｌｉのＷ３１１０株３３Ｄ３（米国特許第５，６３９，６３５号）、および１９９０年８月７日発行の米国特許第４，９４６，７８３号に開示される変異体周辺質プロテアーゼを有するＥ．ｃｏｌｉ株が挙げられる。他の株およびその誘導体、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ２９４（ＡＴＣＣ ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉＢ、Ｅ．ｃｏｌｉ$_{\lambda}$ １７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）およびＥ．ｃｏｌｉＲＶ３０８（ＡＴＣＣ ３１，６０８）も適切である。これらの例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上述のいずれかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例えば、Ｂａｓｓら、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９～３１４（１９９０）に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適切な細菌を選択することが

必要である。ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、またはｐＫＮ４１０のような周知のプラスミドを用いてレプリコンを供給する場合、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、セラシア属、またはサルモネラ種を宿主として適切に用いることができる。代表的には、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくはさらなるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に組み込んでもよい。あるいは、クローニングのインビトロ方法、例えば、ＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

【０６７０】

全長抗体、抗体フラグメント、および抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞毒性剤（例えば、毒素）にコンジュゲートし、そのイムノ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、特にグリコシル化およびＦｃエフェクター機能が必要ない場合には、細菌で産生することができる。全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。Ｅ．ｃｏｌｉでの産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第５，６４８，２３７号（Ｃａｒｔｅｒら）、米国特許第５，７８９，１９９号（Ｊｏｌｙら）、および米国特許第５，８４０，５２３号（Ｓｉｍｍｏｎｓら）（翻訳開始領域（ＴＩＲ）ならびに発現および分泌を最適化するシグナル配列を記載している）を参照のこと。これらの特許は、本明細書において出典明記によって援用されている。発現の後、抗体は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞ペーストから可溶性分画へ分離され、例えば、アイソタイプに依存してプロテインＡまたはＧカラムを通じて精製することができる。最終精製は、例えば、ＣＨＯ細胞で発現させた抗体を精製するためのプロセスと同様に行うことができる。

【０６７１】

ｂ．真核生物宿主細胞

原核生物に加えて、糸状菌または酵母菌のような真核微生物は、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他には、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ（Ｂｅａｃｈ ａｎｄ Ｎｕｒｓｅ，Ｎａｔｕｒｅ，２９０：１４０［１９８１］；１９８５年5月2日公開の欧州特許第１３９，３８３号）；Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ属宿主（米国特許第４，９４３，５２９号；Ｆｌｅｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９：９６８～９７５（１９９１））（例えば、Ｋ．ｌａｃｔｉｓ（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４；Ｌｏｕｖｅｎｃｏｕｒｔら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５４（２）：７３７～７４２［１９８３］）、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ１２，４２４）、Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ１６，０４５）、Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ（ＡＴＣＣ２４，１７８）、Ｋ．ｗａｌｔｉｉ（ＡＴＣＣ５６，５００）、Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ（ＡＴＣＣ３６，９０６；Ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，８：１３５（１９９０））、Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓおよびＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ）；ｙａｒｒｏｗｉａ属（欧州特許第４０２，２２６号）；Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ（欧州特許第１８３，０７０号；Ｓｒｅｅｋｒｉｓｈｎａら、Ｊ．Ｂａｓｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，２８：２６５～２７８［１９８８］）；Ｃａｎｄｉｄａ属；Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ（欧州特許第２４４，２３４号）；Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ（Ｃａｓｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７６：５２５９～５２６３［１９７９］）；Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ属（例えば、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ（１９９０年１０月３１日公開の欧州特許第３９４，５３８号））；および糸状菌、例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ属、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ属、Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ属（１９９１年1月１０日公開の国際公開第９１／００３５７号）およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ属宿主（例えば、Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ（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］）およびＡ．ｎｉｇｅｒ（

Ｋｅｌｌｙ ａｎｄ Ｈｙｎｅｓ，ＥＭＢＯ Ｊ．，４：４７５～４７９［１９８５］））などが挙げられる。メチロトローフ（Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｉｃ）酵母が、本発明において適しており、これらとしては、限定するものではないが、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ属、Ｃａｎｄｉｄａ属、Ｋｌｏｅｃｋｅｒａ属、Ｐｉｃｈｉａ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ属およびＲｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ属からなる属から選択される、メタノールで生育できる酵母が挙げられる。このクラスの酵母の例となる特定の種のリストは、Ｃ．Ａｎｔｈｏｎｙ，Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｓ，２６９（１９８２）に見出すことができる。

【０６７２】

グリコシル化された抗ＣＤ７９ｂ抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物由来である。無脊椎動物の細胞の例としては、昆虫細胞、例えば、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９、ならびに植物細胞、例えば、ワタ、コーン、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの細胞培養物が挙げられる。多くのバキュロウイルス株および改変体、ならびに対応する許容可能な昆虫宿主細胞が、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（イモ虫）、Ａｅｄｅｓ ａｅｇｙｐｔｉ（蚊）、Ａｅｄｅｓ ａｌｂｏｐｉｃｔｕｓ（蚊）、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ、（ショウジョウバエ）およびＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ等の宿主から同定されている。例えばＡｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ＮＰＶのＬ－１改変体およびＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ ＮＰＶのＢｍ－５株などのトランスフェクションのための多くのウイルス株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは本発明におけるウイルスとして特にＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために用いられ得る。

【０６７３】

しかしながら、最大の目的は脊椎動物細胞であり、培養物（組織培養物）中での脊椎動物細胞の増殖は慣用的な手順である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７，ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚腎細胞株（２９３または懸濁培養中の生育についてサブクローニングされた２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；仔ハムスター腎細胞（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）；ヒト頸部腫瘍細胞（ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ ３Ａ，ＡＴＣＣ ＣＲＬ １４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２，ＨＢ ８０６５）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒら、Ａｎｎａｌ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４～６８（１９８２））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；ならびにヒト肝癌系（Ｈｅｐ Ｇ２）である。

【０６７４】

宿主細胞は、抗ＣＤ７９ｂ抗体産生のための上述した発現ベクターまたはクローニングベクターにより形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修飾された慣用の栄養媒体中で培養される。

【０６７５】

３．複製可能なベクターの選択および使用

本発明の抗体の組み換え産生のために、この抗体をコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）を、さらなるクローニング（ＤＮＡの増幅）または発現のために、単離して、複製可能なベクター内に挿入する。この抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオ

リゴヌクレオチドプローブを用いることによって）容易に単離されて、配列決定される。多くのベクターが入手可能である。ベクターの選択は、用いられるべき宿主細胞に一部は依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物（一般には哺乳動物）のいずれかに由来する。

【０６７６】

このベクターは例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であってもよい。この適切な核酸配列は、種々の手順によってベクターに挿入され得る。一般には、ＤＮＡは、当該分野で公知の技術を用いて適切なエンドヌクレアーゼ部位（単数または複数）に挿入される。ベクター成分としては一般には、限定するものではないが、シグナル配列、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終止配列のうちの１つ以上を含む。これらの成分のうちの１つ以上を含んでいる適切なベクターの構築物は、当業者に公知である標準的なライゲーション技術を使用する。

【０６７７】

ＣＤ７９ｂは、組換え的に直接に産生されてよいし、それだけではなく、シグナル配列であっても、または成熟タンパク質もしくはポリペプチドの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ってもよい異種的ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても産生されてもよい。一般的に、シグナル配列は、ベクターの成分であってよいし、またあるいはベクターに挿入される抗ＣＤ７９ｂ抗体コードＤＮＡの一部であってもよい。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐ、または熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーからなる群から選択される原核細胞性シグナル配列であってもよい。酵母分泌のためには、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー（ＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓおよびＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　α－因子リーダーを含む、後者は米国特許第５，０１０，１８２号に記載されている）、または酸ホスファターゼリーダー、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３６２，１７９号）または１９９０年１１月１５日発行の国際公開第９０／１３６４６号に記載されるシグナルであってもよい。哺乳動物細胞の発現において、哺乳動物シグナル配列を用いて、タンパク質、例えば、同種または関連の種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、およびウイルスの分泌リーダーの分泌を指示してもよい。

【０６７８】

ａ．原核生物宿主細胞

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な組み換え技術を用いて得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列を抗体産生細胞例えばハイブリドーマ細胞から単離して配列決定してもよい。あるいはポリヌクレオチドは、ヌクレオチドシンセサイザーまたはＰＣＲ技術を用いて合成してもよい。一旦得られれば、ポリペプチドをコードする配列を、原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製かつ発現できる組み換えベクターに挿入する。利用可能であってかつ当該分野で公知の多くのベクターを本発明の目的に用いることができる。適切なベクターの選択は主に、ベクターに挿入されるべき核酸のサイズおよびこのベクターで形質転換されるべき特定の宿主細胞に依存するであろう。各々のベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはその両方）およびそのベクターが存在する特定の宿主細胞との適合性次第で、種々の成分を含む。

【０６７９】

一般には、宿主細胞と適合する種に由来するレプリコンおよび制御配列を含んでいるプラスミドベクターをこれらの宿主と関連して用いる。発現ベクターおよびクローニングベクターは共に１つ以上の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列、および形質転換された細胞において表現型選択をもたらし得るマーキング配列を含む。このような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスについて周知である。アンピシリン耐性をコードする遺伝子（Ａｍｐ）、およびテトラサイクリン耐性をコードする遺伝子（

Ｔｅｔ）を含んでおり、これによって形質転換細胞を特定する容易な手段をもたらすプラスミドｐＢＲ３２２に由来する複製起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、そして種々のウイルス開始点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶまたは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。ｐＢＲ３２２、その誘導体、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージはまた、内因性のタンパク質の発現のための微生物によって用いられ得るプロモーターを含んでもよいし、含むように改変されてもよい。特定の抗体の発現のために用いられるｐＢＲ３２２誘導体の例は、米国特許第５，６４８，２３７号に詳細に記載される。

【０６８０】

さらに、宿主微生物と適合性であるレプリコンおよび制御配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主と関連して形質転換ベクターとして用いてもよい。例えば、λＧＥＭ．ＴＭ．－１１のようなバクテリオファージを、Ｅ．ｃｏｌｉのＬＥ３９２のような感受性の宿主細胞を形質転換するために用いることができる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

【０６８１】

本発明の発現ベクターは各々のポリペプチド成分をコードしている２つ以上のプロモーターシストロン対を含んでもよい。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流（５’）に位置している非翻訳調節配列である。原核生物のプロモーターは代表的には誘導性と構成的の二つのクラスのものにおさまる。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養分の有無または温度の変化に応答してその制御下でシストロンの転写レベルを増大させるように開始するプロモーターである。

【０６８２】

種々の潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択したプロモーターを、制限酵素消化を介して供給源のＤＮＡからプロモーターを除去すること、および本発明のベクター内に単離したプロモーターを挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作動可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を用いて、標的遺伝子の増幅および／または発現を指示させてもよい。ある実施形態では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、異種プロモーターは一般的に、発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので有用である。

【０６８３】

種々の原核生物宿主によって認識されるプロモーターが周知である。原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、ＰｈｏＡプロモーター、βガラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系［Ｃｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ，２７５：６１５（１９７８）；および［Ｇｏｅｄｄｅｌら、Ｎａｔｕｒｅ，２８１：５４４（１９７９）］、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系［Ｇｏｅｄｄｅｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ ＡｃｉｄｓＲｅｓ．，８：４０５７（１９８０）、および欧州特許第３６，７７６号］、および、ｔａｃプロモーターなどのハイブリッドプロモーター［ｄｅＢｏｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２１～２５（１９８３）］またはｔｒｃプロモーターが挙げられる。細菌の系で用いるためのプロモーターはまた、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードしているＤＮＡに作動可能に連結されているシャイン－ダルガーノ（Ｓ．Ｄ．）配列も含むであろう。しかし、細菌で機能的である他のプロモーター（例えば、他の公知の細菌またはファージのプロモーター）も適切である。それらのヌクレオチド配列は、公開されているので、当業者は任意の必要な制限酵素部位をもたらすためのリンカーまたはアダプターを用いて、標的の軽鎖および重鎖をコードするシストロンにこれらの配列を作動可能に連結させることができる（Ｓｉｅｂｅｎｌｉｓｔら、（１９８０）Ｃｅｌｌ ２０：２６９）。

【０６８４】

本発明の一局面において、組換えベクター内の各シストロンは、発現ポリペプチドの膜

を横断する移行を指示する分泌シグナル配列成分を含む。一般的に、シグナル配列は、ベクターの一成分であってもよいし、またはそのシグナル配列は、ベクターに挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であってもよい。本発明の目的のために選択されるシグナル配列とは、宿主細胞により認識されプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）配列であるべきである。異種ポリペプチドに固有のシグナル配列を認識せず、プロセシングしない原核宿主細胞のために、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐまたは耐熱性エンテロトキシンＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡおよびＭＢＰからなる群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。本発明の一実施形態において、発現系の両シストロンに用いられるシグナル配列は、ＳＴＩＩシグナル配列またはそれらの改変体である。

【０６８５】

別の局面において、本発明による免疫グロブリンの産生は宿主細胞の細胞質で起きることが可能であり、従って、各シストロン内の分泌シグナル配列の存在を必要としない。この点において、免疫グロブリンの軽鎖と重鎖が、発現され、折り畳まれ、組み合されて、機能的な免疫グロブリンが細胞質内に形成される。ある種の宿主株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのｔｒｘＢ株）は、ジスルフィド結合形成に有利な細胞質条件を提供することにより、発現タンパク質サブユニットの適切な折り畳みと構築を可能とする（ＰｒｏｂａおよびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ　Ｇｅｎｅ，１５９：２０３（１９９５））。

【０６８６】

本発明は、分泌され適切にアセンブリされた本発明の抗体の収率を最大化するために、発現されるポリペプチド成分の量的な比が調節され得る発現系を提供する。そのような調節は、少なくとも部分的には、ポリペプチド成分についての翻訳強度を同時に調節することにより達成される。

【０６８７】

翻訳強度を調節するための一つの技術は、Ｓｉｍｍｏｎｓらの米国特許第５，８４０，５２３号に開示されている。それは、シストロン内の翻訳開始領域（ＴＩＲ）の改変体を利用する。所与のＴＩＲに関して、一連のアミノ酸配列改変体または核酸配列改変体を、種々の翻訳強度で産生することにより、特定の鎖の望ましい発現量のためにこの因子を調節する便利な手段が提供できる。ＴＩＲ改変体は、アミノ酸配列を変えることのできるコドン変化をもたらす従来の変異誘発技術により産生することができるが、ヌクレオチド配列においてはサイレントな変化が好ましい。ＴＩＲの変化として、例えば、シグナル配列の変化とともにシャイン・ダルガーノ配列の数またはスペーシングの変化を挙げることができる。変異体シグナル配列を産生するための１つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変化させない（すなわち、この変化はサイレントである）コード配列の初めに「コドンバンク（ｃｏｄｏｎ　ｂａｎｋ）」を産生することである。これは、各コドンの第３ヌクレオチド位置を変えることにより達成することができる；さらに、ロイシン、セリンおよびアルギニンなどのいくつかのアミノ酸は、複数の第１位置および第２位置を有しており、これによってこのバンクを作製するのに複雑性を加えることができる。この変異誘発の方法は、Ｙａｎｓｕｒａら（１９９２）ＭＥＴＨＯＤＳ：Ａ　Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．４：１５１～１５８に詳細に説明されている。

【０６８８】

好ましくは、１セットのベクターを、そこでの各シストロンに対して、ある範囲のＴＩＲ強度により生成する。この制限されたセットによって、種々のＴＩＲ強度の組合せにおいて各鎖の発現量ならびに所望の抗体産物の収率の比較が提供される。ＴＩＲ強度は、Ｓｉｍｍｏｎｓらの米国特許第５，８４０，５２３号に詳細に記載されているように、レポーター遺伝子の発現レベルを定量することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づき、所望の個々のＴＩＲを選択して、本発明の発現ベクター構築物中に組み合わせる。

【０６８９】
ｂ．真核生物宿主細胞
ベクター成分としては一般には、限定するものではないが、以下のうちの１つ以上が挙げられる：シグナル配列、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーターおよび転写終結配列。
【０６９０】
（１）シグナル配列成分
真核宿主細胞に使用されるベクターはまた、目的の成熟タンパク質またはポリペプチドのＮ末端に、特異的切断部位を有しているシグナル配列または他のポリペプチドを含んでもよい。選択された異種シグナル配列は好ましくは、宿主細胞により認識およびプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）配列である。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスのｇＤシグナルを利用することができる。
【０６９１】
そのような前駆体領域のＤＮＡを、抗体をコードするＤＮＡとリーディングフレーム内で連結する。
【０６９２】
（２）複製起点
一般的に、複製起点成分は、哺乳類の発現ベクターには必要とされない。例えば、ＳＶ４０起点は代表的には、初期プロモーターを含むという理由だけで用いられ得る。
【０６９３】
（３）選択遺伝子成分
発現ベクターおよびクローニングベクターは代表的に、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むだろう。代表的な選択遺伝子は、以下をコードする（ａ）抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、（ｂ）栄養要求欠損を補うタンパク質、または（ｃ）複合培地からは利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質（例えば、Ｂａｃｉｌｌｉに関してはＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。
【０６９４】
選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止する薬物を利用する。異種遺伝子により首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生するので、選択レジメンを生残する。そのような優性選択の例は、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸およびハイグロマイシンを用いる。
【０６９５】
哺乳類細胞の適切な選択マーカーの例は、ＤＨＦＲまたはチミジンキナーゼ、メタロチオネインＩおよびメタロチオネインＩＩ、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどの、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード核酸を取り込むのに適格な細胞の同定を可能とするマーカーである。適切な宿主細胞は、野性型のＤＨＦＲを使用する場合、Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４２１６（１９８０）によって記載されるように調製され増殖される、ＤＨＦＲ活性を欠くＣＨＯ細胞株（例えば、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－９０９６）である。例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子により形質転換された細胞は、ＤＨＦＲの競合的アンタゴニストであるメトトレキセート（Ｍｔｘ）を含む培養培地で全ての形質転換体を培養することによって、最初に同定される。あるいは、抗体をコードするＤＮＡ配列、野生型ＤＨＦＲタンパク質をコードするＤＮＡ配列、および他の選択マーカー（例えばアミノグリコシド３’－ホスホトランスフェラーゼ（ＡＰＨ））をコードするＤＮＡ配列で形質転換または同時形質転換された宿主細胞（特に内因性ＤＨＦＲを含む野生型宿主）は、アミノグリコシド抗生物質（例えば、カナマイシン、ネオマイシンまたはＧ４１８）などの選択マーカーに関する選択物質を含んでいる培地中での細胞成長により選択することができる。米国特許第４，９６５，１９９号を参照のこと。

【０６９６】
酵母で用いるのに適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である［Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂら、Ｎａｔｕｒｅ，２８２：３９（１９７９）；Ｋｉｎｇｓｍａｎら、Ｇｅｎｅ，７：１４１（１９７９）；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒら、Ｇｅｎｅ，１０：１５７（１９８０）］。Ｔｈｅ　ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファンで増殖する能力を欠いている酵母の変異体株の選択マーカー、例えば、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．４４０７６またはＰＥＰ４－１［Ｊｏｎｅｓ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，８５：１２（１９７７）］を提供する。

【０６９７】
（４）プロモーター成分
発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、ｍＲＮＡ合成を指示するために抗ＣＤ７９ｂ抗体コード核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞によって認識されるプロモーターが周知である。

【０６９８】
事実上全ての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位から約２５～３０塩基上流に位置するＡＴが豊富な領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から７０～８０塩基上流に見られる別の配列は、ＣＮＣＡＡＴ領域（ここで、Ｎはいずれのヌクレオチドであってもよい）である。ほとんどの真核生物遺伝子の３’末端は、コード配列の３’末端へのポリＡテールの付加のためのシグナルであってよいＡＡＴＡＡＡ配列である。これらの配列の全てを、真核生物発現ベクターに適切に挿入する。

【０６９９】
酵母宿主において使用するための適切なプロモーター配列の例としては、３－ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター（Ｈｉｔｚｅｍａｎら、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．，２５５：２０７３（１９８０））；または他の解糖酵素［Ｈｅｓｓら、Ｊ．Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｅ　Ｒｅｇ．７：１４９（１９６８）；Ｈｏｌｌａｎｄ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１７：４９００（１９７８）］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルビル酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼが挙げられる。

【０７００】
増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導性のプロモーターである、他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸ホスファターゼ、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、ならびにマルトースおよびガラクトースの利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母発現における使用のために適するベクターおよびプロモーターは、さらに欧州特許第７３，６５７号に記載される。

【０７０１】
哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗ＣＤ７９ｂ抗体転写は、例えば、ウイルスのゲノムから得られたプロモーターによって制御され、これらのウイルスの例は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（１９８９年７月５日に公開された英国特許第２，２１１，５０４号）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２型）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）であり、これらは異種の哺乳動物プロモーター（例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター）由来、および熱ショックプロモーター由来であり、ただしこのようなプロモーターは、宿主細胞系と適合性である。

【０７０２】
ＳＶ４０ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルス複製起点も含んでいる、ＳＶ４０制限フラグメントとして都合よく得られる。ヒトサイトメ

ガロウイルスの最初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限フラグメントとして都合よく得られる。ウシパピローマウイルスをベクターとして用いる哺乳動物宿主細胞においてＤＮＡを発現するための系は、米国特許第４，４１９，４４６号において開示される。この系の改変は、米国特許第４，６０１，９７８号に記載される。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下のマウス細胞におけるヒトβインターフェロンｃＤＮＡの発現に関してはＲｅｙｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，２９７：５９８～６０１（１９８２）を参照のこと。あるいは、Ｒｏｕｓ肉腫ウイルスの長末端反復をプロモーターとして用いてもよい。

【０７０３】

（５）エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡの転写は、ベクター中へエンハンサー配列を挿入することによって増強してもよい。エンハンサーは、ＤＮＡのシス作用性エレメントであり、通常約１０～３００ｂｐであり、その転写を増強するようにプロモーターに作用する。現在哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、αフェトプロテインおよびインシュリン）由来の多くのエンハンサー配列が公知である。しかし、代表的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。例としては、複製起点（１００～２７０ｂｐ）の後期側面（ｌａｔｅ　ｓｉｄｅ）上のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側面上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。Ｙａｎｉｖ，Ｎａｔｕｒｅ，２９７：１７～１８（１９８２）（真核生物プロモーターの活性化のための促進エレメントに関する）を参照のこと。このエンハンサーは、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード配列の５’位または３’位においてベクターにスプライシングされてもよいが、好ましくは、プロモーターから５’の部位に位置する。

【０７０４】

（６）転写終止成分

真核生物宿主細胞（酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞）において用いられる発現ベクターはまた、転写の終結のため、およびｍＲＮＡの安定化のために必要な配列を含む。このような配列は、一般に、真核生物またはウイルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの非翻訳領域の５’から、そして場合によって３’から入手可能である。これらの領域は、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分においてポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。１つの有用な転写終止成分は、ウシ増殖ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第９４／１１０２６号およびそこに開示される発現ベクターを参照のこと。

【０７０５】

組換え脊椎動物細胞培養物において抗ＣＤ７９ｂ抗体の合成への適用のために適切なさらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Ｇｅｔｈｉｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ，２９３：６２０～６２５（１９８１）；Ｍａｎｔｅｉら、Ｎａｔｕｒｅ，２８１：４０～４６（１９７９）；欧州特許第１１７，０６０号；および欧州特許第１１７，０５８号に記載される。

【０７０６】

４．宿主細胞を培養する工程

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体を産生するために用いられる宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。

【０７０７】

ａ．原核生物宿主細胞

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は、当該分野で公知であって、かつ選ばれた宿主細胞の培養に適切な培地において育成される。好適な培地の例としては、必須栄養添加物を加えたルリアブロス（ＬＢ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地はまた、発現ベクターを含んでいる原核細胞の増殖を選択的に可能とするために、発現ベクターの構築に基づいて選ばれる選択剤を含む。例えば、アンピシリン耐

性遺伝子を発現する細胞の増殖のために、培地にアンピシリンが加えられる。

【０７０８】

炭素、窒素、および無機リン酸供給源の外に、任意の必須の補充物が、単独で、または、別の補充物との混合物として、または、窒素複合供給源などの培地として、導かれた適切な濃度で含まれてもよい。必要に応じて培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール、およびジチオスレイトールからなる群より選ばれる一つ以上の還元剤を含んでもよい。

【０７０９】

原核宿主細胞は、適切な温度で培養される。Ｅ．ｃｏｌｉ増殖のためには、例えば、好ましい温度は、約２０℃から約３９℃の範囲、より好ましくは約２５℃から約３７℃の範囲、さらに好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に、宿主生物に依存して、約５から約９の範囲内の任意のｐＨであってもよい。Ｅ．ｃｏｌｉの場合、ｐＨは、好ましくは約６．８から約７．４、より好ましくは約７．０である。

【０７１０】

本発明の発現ベクターにおいて誘導性プロモーターが使用される場合、タンパク発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一局面では、ポリペプチドの転写調節のために、ＰｈｏＡプロモーターが用いられる。従って、形質転換される宿主細胞は、誘導のために、リン酸塩制限培地において培養される。好ましくは、リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地である（例えば、Ｓｉｍｍｏｎｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（２００２），２６３：１３３～１４７を参照のこと）。当該分野で公知のとおり、使用されるベクター構築体にしたがって、他にも、種々の誘導因子を用いてもよい。

【０７１１】

一実施形態では、本発明の発現されたポリペプチドは、宿主細胞の周辺質に分泌され、周辺質から回収される。タンパク回収は代表的には、微生物を、一般には、浸透圧ショック、超音波処理、または溶菌などの手段によって破壊する工程を包含する。一旦細胞が破壊されたならば、細胞破片または全体細胞は、遠心またはろ過によって除去してもよい。タンパクはさらに、例えば、アフィニティー樹脂クロマトグラフィによって精製してもよい。あるいは、タンパクを培養培地に移し、その中で単離することも可能である。細胞を、培養物から取り出し、培養上清をろ過し、濃縮して、生産されたタンパクをさらに精製してもよい。この発現されたポリペプチドを、通常公知の方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）、およびウェスタンブロットアッセイを用いてさらに単離し、特定することも可能である。

【０７１２】

本発明の一局面では、抗体生産は、発酵プロセスによって大量に実行される。組み換えタンパクの生産のためには、種々の大規模フィード・バッチ・ファーメンテーション手順が利用可能である。大規模ファーメンテーションは、少なくとも１０００リットル容量、好ましくは約１，０００から１００，０００リットルという容量を有する。これらの発酵槽は、酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を拡散させるために攪拌インペラーを用いる。小規模ファーメンテーションとは、一般に、容積が約１００リットル以下の発酵槽におけるファーメンテーションを指し、約１リットルから約１００リットルの範囲にあってもよい。

【０７１３】

発酵プロセスでは、タンパク発現の誘導は、代表的には、細胞が、適切な条件下で所望の密度、例えば、OD_{550}が約１８０～２２０となるまで育成された後、すなわち、細胞が初期の静止期に達した段階で、起動される。当該分野で公知でありかつ、上記されるとおり、使用されるベクター構築体に応じて、各種の誘起因子を用いてもよい。細胞は、誘導前に、より短い期間育成してもよい。細胞は、通常、約１２～５０時間誘導されるが、それよりも長いか、または短い誘導時間を用いてもよい。

【０７１４】

本発明のポリペプチドの生産収率および品質を向上するために、様々の発酵条件を改変してもよい。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切なアセンブリおよび折り畳みを向上させるために、シャペロンタンパク、例えば、ＤｓｂタンパクＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｃＣ、ＤｓｂＤ、およびまたはＤｓｂＧ）、またはＦｋｐＡ（シャペロン活性を有する、ペプチジルプロリルシス、トランス－イソメラーゼ）を過剰発現する追加のベクターを用いて、宿主原核細胞を同時形質転換してもよい。このシャペロンタンパクは、細菌宿主細胞において生産される異種タンパクの適切な折り畳みおよび可溶性を促進することが示されている。Ｃｈｅｎ ら（１９９９）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１９６０１～１９６０５；Ｇｅｏｒｇｉｏｕら、米国特許第６，０８３，７１５号；Ｇｅｏｒｇｉｏｕら、米国特許第６，０２７，８８８号；Ｂｏｔｈｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１００～１７１０５；Ｒａｍｍ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１０６～１７１１３；Ａｒｉｅら（２００１）Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３９：１９９～２１０。

【０７１５】

発現される異種タンパク（特に、タンパク分解に感受性を持つもの）の分解を最小にするために、タンパク分解酵素を欠乏する、いくつかの宿主株を本発明のために用いることが可能である。例えば、公知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ、およびそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子突然変異（単数または複数）を実現するように、宿主細胞株を修飾してもよい。いくつかのＥ．ｃｏｌｉのプロテアーゼ欠損株が入手可能であって、例えば、Ｊｏｌｙら（１９９８）上掲；Ｇｅｏｒｇｉｏｕら、米国特許第５，２６４，３６５号；Ｇｅｏｒｇｉｏｕら、米国特許第５，５０８，１９２号；Ｈａｒａら、Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，２：６３～７２（１９９６）に記載される。

【０７１６】

一実施形態では、タンパク分解酵素を欠き、かつ、１つ以上のシャペロンタンパクを過剰発現するプラスミドによって形質転換されるＥ．ｃｏｌｉ株が、本発明の発現系における宿主細胞として用いられる。

【０７１７】

ｂ．真核生物宿主細胞

市販の培地（例えば、Ｈａｍ’ｓ Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（Ｍｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ）（（ＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、およびダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ））は、宿主細胞の培養に適する。さらに、Ｈａｍら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．、５８：４４（１９７９）、Ｂａｒｎｅｓら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１０２：２５５（１９８０）、米国特許第４，７６７，７０４号；同第４，６５７，８６６号；同第４，９２７，７６２号；同第４，５６０，６５５号または；同第５，１２２，４６９号；国際公開第９０／０３４３０号；国際公開第８７／００１９５号；あるいは米国再発行特許第３０，９８５号に記載される任意の培地が、宿主細胞のための培養培地として用いられ得る。任意のこれらの培地は、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびホスフェート）、緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ）、ヌクレオシド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬物）、微量元素（通常、μＭの範囲の最終濃度で存在する無機化合物として規定される）、そしてグルコースまたは等価なエネルギー供給源を補充されてもよい。任意の他の必要な補充物もまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれてもよい。培養条件（例えば、温度、ｐＨなど）は、発現について選択された宿主細胞に予め用いられる条件であり、当業者に明らかである。

【０７１８】

５．遺伝子増幅／発現を検出する工程

サンプル中の遺伝子増幅および／または遺伝子発現は、例えば、本明細書中に提供される配列に基づいて、適切に標識化されたプローブを用いて、従来のサザンブロッティング、ｍＲＮＡの転写を定量するためのノーザンブロッティング［Ｔｈｏｍａｓ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：５２０１～５２０５（１９８０）］、ドットブロッティング（ＤＮＡ分析）、またはインサイチュハイブリダイゼーションによって直接的に測定され得る。あるいは、ＤＮＡ二重鎖、ＲＮＡ二重鎖、およびＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二重鎖、またはＤＮＡ－タンパク質二重鎖を含む、特定の二重鎖を認識し得る抗体を使用してもよい。次いで、この抗体は、標識されてもよく、そしてどこでこの二重鎖が表面に結合しているかのアッセイが実施されてもよく、その結果、表面上での二重鎖の形成の際に、この二重鎖に結合している抗体の存在が検出され得る。

【０７１９】

あるいは、遺伝子発現は、免疫学的方法、例えば、遺伝子産物発現を直接的に定量するための細胞または組織切片の免疫組織化学染色および細胞培養物または体液のアッセイによって、測定され得る。免疫組織化学染色および／またはサンプル体液のアッセイのために有用な抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、任意の哺乳動物で調製され得る。都合よいことに、この抗体は、天然のＣＤ７９ｂポリペプチドに対して、または本明細書に提供されるＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して、またはＣＤ７９ｂのＤＮＡに融合されており特定の抗体エピトープをコードしている外因性配列に対して調製されてもよい。

【０７２０】

６．抗ＣＤ７９ｂ抗体の精製

抗ＣＤ７９ｂ抗体の型は培養培地から回収されても、または宿主細胞溶解物から回収されてもよい。膜結合する場合、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、適切な界面活性剤溶液（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００）を用いること、または酵素的切断によって、膜から放出されてもよい。抗ＣＤ７９ｂ抗体の発現に使用される細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破砕、または細胞溶解剤のような種々の物理的手段または化学的手段により破壊してもよい。

【０７２１】

組み換え細胞タンパク質またはポリペプチドから抗ＣＤ７９ｂ抗体を精製することが望ましい場合がある。以下の手順が、適切な精製手順の例である：イオン交換カラムによる分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカまたはＤＥＡＥのような陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィ；等電点電気泳動；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫安沈澱；例えばＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５を用いたゲル濾過；ＩｇＧのような混入物を除去するためのプロテインＡセファロースカラム；および抗ＣＤ７９ｂ抗体のエピトープタグ付け形態に結合する金属キレートカラム。タンパク質精製の種々の方法を使用してもよく、このような方法は当該技術分野において公知であり、例えば、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１８２（１９９０）；Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）に記載されている。選択された精製工程（単数または複数）は、例えば、使用する産生プロセスおよび産生される特定の抗ＣＤ７９ｂ抗体の性質に依存する。

【０７２２】

組み換え技術を用いる場合、この抗体は細胞内、細胞膜周辺腔で細胞内で生成されてもよいし、または培地に直接分泌されてもよい。このような抗体が細胞内で生成される場合、第一段階として、微粒子片、宿主細胞または溶解断片のいずれかが、例えば遠心分離または限外濾過により除去される。Ｃａｒｔｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３～１６７（１９９２）には、Ｅ．ｃｏｌｉ．の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離する手順が記載されている。要するに、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ、およびフッ化フェニルメチルスルフォニル（ＰＭＳＦ）の存在下で約３

０分間にわたって解凍する。細胞片は遠心分離により除去できる。抗体が培地に分泌される場合、このような発現系由来の上清は、一般に、例えばＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過装置などの市販のタンパク質濃縮フィルターを用いて最初に濃縮される。前述の工程のいずれかにＰＭＳＦのようなプロテアーゼ阻害剤を含んで、タンパク質分解を阻害してよく、抗生物質を含んで外来性の混入物の増殖を阻止してもよい。

【０７２３】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティクロマトグラフィを用いて精製してもよく、アフィニティクロマトグラフィが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインＡを用いて、ヒトγ１、γ２またはγ４Ｈ重鎖を基礎とする抗体を精製することができる（Ｌｉｎｄｍａｒｋら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１～１３（１９８３））。プロテインＧは、マウスのアイソタイプ全ておよびヒトγ３に推奨される（Ｇｕｓｓら、ＥＭＢＯ　Ｊ．５：１５６７～１５７５（１９８６））。アフィニティリガンドが結合するマトリクスは、ほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリクスも利用可能である。制御された多孔性ガラス（ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｐｏｒｅ　ｇｌａｓｓ）またはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンのような機械的に安定なマトリクスにより、アガロースにより達成し得るよりも、流速を早くかつ処理時間を短くすることが可能になる。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ、Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ、ＮＪ）が精製に有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカによるクロマトグラフィ、ヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）クロマトグラフィによる陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのクロマトグラフィ、等電点電気泳動、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび硫安沈澱のような他のタンパク質精製技術もまた、回収される抗体に応じて利用可能である。

【０７２４】

任意の予備的な精製工程（単数または複数）のあとに、目的の抗体と混入物とを含んでいる混合物を、ｐＨ約２．５～４．５の溶出緩衝液を用いる低ｐＨの疎水性相互作用クロマトグラフィに供し、好ましくは低塩濃度（例えば約０～０．２５Ｍの塩）にて行う。

【０７２５】

Ｇ．薬学的処方物

本発明の抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、処置されるべき状態に対して適切な任意の経路によって投与され得る。ＡＤＣは代表的には、非経口的に、すなわち、連続注入（インフュージョン）、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、くも膜下腔内および硬膜外に投与される。

【０７２６】

これらのガンを処置するためには、一実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートは、静脈内注入を介して投与される。注入を介して投与される投薬量は、１用量あたり約１μｇ／m^2～約１０，０００μｇ／m^2の範囲、一般には１、２、３または４用量の全部について１週あたり１用量である。あるいは、この投薬量の範囲は、約１μｇ／m^2～約１０００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約８００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約６００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約４００μｇ／m^2、約１０μｇ／m^2～約５００μｇ／m^2、約１０μｇ／m^2～約３００μｇ／m^2、約１０μｇ／m^2～約２００μｇ／m^2、および約１μｇ／m^2～約２００μｇ／m^2の範囲である。この用量は、疾患の症状を救済または緩和するため、１日１回、１週１回、１週に複数回ただし１日あたり１回未満、１カ月に複数回ただし１日あたり１回未満、１カ月あたり複数回ただし１週あたり１回未満、１カ月に１回または間欠的に投与されてもよい。投与は、腫瘍または処置されているリンパ腫、白血病の症状の寛解まで、任意の開示された間隔で続けられてもよい。投与は、このような症状の緩和または救済が達成された後まで続けられてもよく、ここでこのよう

な緩和または救済は、このような継続投与によって延長される。

【０７２７】

本発明はまた、自己免疫疾患を軽減する方法を提供し、この方法は、自己免疫疾患に罹患している患者に対して、前述の実施形態のいずれか１つの治療上有効な量のヒト化２Ｆ２抗体－薬物コンジュゲートを投与する工程を包含する。好ましい実施形態では、この抗体は静脈内にまたは皮下に投与される。この抗体－薬物コンジュゲートは１用量あたり約１μｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^{2}の範囲で静脈内投与され、特定の実施形態では、この投薬量は１μｇ／ｍ^2～約５００μｇ／ｍ^{2}である。この用量は、疾患の症状を救済または軽減するため、１日あたり１回投与されても、１週あたり１回投与されても、１週あたり複数回ただし１日あたり１回未満投与されても、１カ月あたり複数回ただし１日あたり１回未満投与されても、１カ月あたり複数回ただし１週あたり１回未満投与されても、１カ月に１回または間欠的に投与されてもよい。投与は、処置されている自己免疫疾患の症状の救済または軽減まで、任意の開示された間隔で続けられてもよい。投与は、このような症状からの救済または緩和が達成された後まで続けられてもよく、ここでこのような緩和または救済は、このような継続投与によって延長される。

【０７２８】

本発明はまた、Ｂ細胞障害を処置する方法を提供し、この方法は、Ｂ細胞障害、例えば、Ｂ細胞増殖性障害（限定するものではないがリンパ腫および白血病を含む）または自己免疫疾患に罹患している患者に対して、前述の実施形態のいずれか１つの治療上有効な量のヒト化２Ｆ２抗体（この抗体は、細胞毒性分子または検出可能な分子にコンジュゲートされていない）を投与する工程を包含する。この抗体は代表的には、約１μｇ／ｍ^2～約１０００μｇ／ｍ^{2}の範囲の投薬量で投与されるであろう。

【０７２９】

一局面では、本発明はさらに、本発明の少なくとも１つの抗ＣＤ７９ｂ抗体、および／またはその少なくとも１つのイムノコンジュゲートおよび／または本発明の少なくとも１つの抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬物コンジュゲートを含んでいる薬学的処方物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的処方物は、（１）本発明の抗体、および／またはそのイムノコンジュゲート、および（２）薬学的に受容可能なキャリアを含む。いくつかの実施形態では、薬学的処方物は、（１）本発明の抗体、および／またはそのイムノコンジュゲート、および必要に応じて（２）少なくとも１つの追加の治療剤を含む。追加の治療剤としては限定するものではないが、下に記載されるものが挙げられる。ＡＤＣは代表的には、非経口的に、すなわち、インフュージョン、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外に投与される。

【０７３０】

本発明に従って用いられる抗ＣＤ７９ｂ抗体またはＣＤ７９ｂイムノコンジュゲートを含んでいる治療用処方物は、所望の純度を有する抗体またはイムノコンジュゲートと、任意の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ第１６版 Ｏｓｏｌ，Ａ編集（１９８０））とを、凍結乾燥処方物、または水溶液の形態で混合することによって保存用に調製される。受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤は、使用される用量および濃度においてレシピエントに対して無毒であり、これには緩衝液、例えば、酢酸塩、Ｔｒｉｓ、リン酸塩、クエン酸、および他の有機酸；抗酸化剤、例として、アスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメソニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；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；およびｍ－クレゾール）；低分子量（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、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、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、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン；単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例として、グルコー

ス、マンノース、またはデキストランなど；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；等張化剤、例えば、トレハロースおよび塩化ナトリウム；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール；サーファクタント、例えば、ポリソルベート；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク複合体）；および／または非イオン性サーファクタント、例えば、ＴＷＥＥＮ（登録商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられる。インビトロの投与に用いられるべき薬学的処方物は一般には無菌である。これは無菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

【０７３１】

本明細書の処方物はまた、処置されている特定の適応症に必要な場合、２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な活性を持つ活性化合物を含んでもよい。例えば、抗ＣＤ７９ｂ抗体に加えて、追加の抗体、例えば、第二の抗ＣＤ７９ｂ抗体（ＣＤ７９ｂポリペプチド上の異なるエピトープに結合する）または特別なガンの増殖に影響する増殖因子などのいくつかの他の標的に対する抗体を、１つの処方物中に含むことが所望される場合がある。あるいは、またはさらに、この組成物は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤および／または心臓保護剤をさらに含んでもよい。このような分子は適切には、意図される目的に対して有効な量において組み合わされて存在する。

【０７３２】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される微小カプセル中に、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－微小カプセル、およびポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、または、マクロエマルジョン中に捕捉されてもよい。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ 第１６版，Ｏｓｏｌ，Ａ編（１９８０）に開示される。

【０７３３】

持続放出調製物を調製してもよい。持続放出調製物の適切な例としては、基質が成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形状である、抗体を含んでいる固体の疎水性ポリマーの半透性基質が挙げられる。持続放出基質の例としては、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）、またはポリ（ビニールアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタミン酸塩のコポリマー、非分解性エチレンビニールアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えば、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（登録商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注入可能なマイクロスフェア）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシル酪酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニルおよび乳酸－グリコール酸などのポリマーは、１００日以上にわたる分子の放出を可能とするが、ある種のヒドロゲルがタンパク質を放出する期間はそれより短い。カプセル封入された免疫グロブリンは、生体内に長期間留まると、３７℃で湿気に暴露されるために分解または凝集する場合があり、これによって生物活性が消失したり、免疫原性が変化する可能性がある。関与する機序に応じて、安定化のために合理的戦略を工夫することができる。例えば、凝集機序が、チオ－ジスルフィド交換による、分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出されたならば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性液から凍結乾燥すること、水分含量を調節すること、適切な添加物を用いること、および、特異的ポリマー基質組成物を開発することによって実現される場合がある。

【０７３４】

抗体は、標的の細胞／組織への送達のために任意の適切な形態で処方されてもよい。例えば、抗体は、免疫リポソームとして処方されてもよい。「リポソーム」とは、哺乳動物への薬物の送達に有用である種々のタイプの脂質、リン脂質および／またはサーファクタントから構成される小胞である。リポソームの成分は通常には、生物学的な膜の脂質配置

と同様の二層方式で配列される。抗体を含んでいるリポソームは、Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２；３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４０３０（１９８０）；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；ならびに１９９７年１０月２３日公開の国際公開第９７／３８７３１号に記載されるような当該分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増強されたリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示される。

【０７３５】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含んでいる脂質組成物を有する逆相エバポレーション法によって作成され得る。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを得るために、規定の細孔のサイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のＦａｂフラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Ｍａｒｔｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：２８６～２８８（１９８２）に記載されるように、リポソームに結合体化され得る。化学治療剤は、必要に応じて、リポソーム内に含まれる。Ｇａｂｉｚｏｎら、Ｊ．Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８１（１９）１４８４（１９８９）を参照のこと。

【０７３６】

インビトロの投与のために用いられるべき処方物は、無菌でなければならない。これは無菌ろ過膜を通じた濾過によって容易に達成される。

【０７３７】

Ｈ．抗ＣＤ７９ｂ抗体での処置

ガンにおけるＣＤ７９ｂ発現を測定するために、種々の検出アッセイが利用可能である。一実施形態では、ＣＤ７９ｂポリペプチド過剰発現は、免疫組織科学（ＩＨＣ）によって分析され得る。腫瘍生検に由来するパラフィン埋包した組織切片をＩＨＣアッセイに供して以下のようなＣＤ７９ｂタンパク質染色強度基準に一致させてもよい：

スコア０：染色は全く観察されないかまたは膜染色が、１０％未満の腫瘍細胞で観察される。

【０７３８】

スコア１＋：かすかな／かろうじて認知できる膜染色が、１０％を越える腫瘍細胞で検出される。その細胞は、それらの膜の一部のみが染色されている。

【０７３９】

スコア２＋：弱から中程度の完全な膜染色が、１０％を越える腫瘍細胞で観察される。

【０７４０】

スコア３＋：中程度から強い完全な膜染色が、１０％を越える腫瘍細胞で観察される。

【０７４１】

ＣＤ７９ｂポリペプチド発現についてスコア０または１＋を有するこれらの腫瘍は、ＣＤ７９ｂを過剰発現しないとして特徴付けられ得、これに対して、スコア２＋または３＋を有する腫瘍は、ＣＤ７９ｂを過剰発現するとして特徴付けられ得る。

【０７４２】

あるいは、またはさらに、ＩＮＦＯＲＭ（登録商標）（Ｖｅｎｔａｎａ，Ａｒｉｚｏｎａが販売）またはＰＡＴＨＶＩＳＩＯＮ（登録商標）（Ｖｙｓｉｓ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）のようなＦＩＳＨアッセイを、腫瘍におけるＣＤ７９ｂ過剰発現の程度（もしあれば）を決定するために、ホルマリン固定された、パラフィン埋包の腫瘍組織で実行してもよい。

【０７４３】

ＣＤ７９ｂの過剰発現または増幅は、インビボ検出アッセイを用いて、例えば、検出される分子に結合する分子（抗体など）を投与することで評価されてもよく、そして検出可能な標識（例えば、放射性同位体または蛍光標識）で標識され、そして標識の位置決定のために、患者を外部からスキャンする。

【０７４４】

上記のとおり、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現している癌の病期分類にとって有用である（例えば、放射性イメージングで）。この抗体はまた、細胞からＣＤ７９ｂポリペプチドの精製または免疫沈降のために、ＣＤ７９ｂポリペプチドの検出および定量のために、インビトロで、例えば、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロットにおいて、他の細胞の精製の工程として混合細胞の集団からＣＤ７９ｂ発現細胞を死滅させて除去するために、有用である。

【０７４５】

現在のところ、ガンの病期分類次第で、ガンの処置は、以下の治療のうちの１つまたは組み合わせを包含する：ガン性組織の除去のための外科手術、放射線治療、および化学療法。抗ＣＤ７９ｂ抗体による治療は、特に、化学治療において毒性および副作用に対する耐性が十分でない老年の患者、およ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得る。本発明の腫瘍標的化抗ＣＤ７９ｂ抗体は、疾患の初期診断時および再発中におけるＣＤ７９ｂ－発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、もしくは放射標識された化合物との併用療法で、または外科手術、寒冷療法、および／もしくは放射線治療との併用療法で用いてもよい。抗ＣＤ７９ｂ抗体による処置は、従来的治療の前または後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と組み合わせて実施することができる。化学療法薬物、例えばＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）（ドセタキセル）、ＴＡＸＯＬ（登録商標）（パリクタキセル）、エストラムスチンおよびミトキサントロンは、ガン、特に危険性の少ない患者のガン治療に用いられる。癌を処置または緩和するための本発明の方法において、上述した１つ以上の化学療法剤による処置と組合せて、癌患者に抗ＣＤ７９ｂ抗体を投与することができる。特に、パリクタキセルおよびその誘導体との併用療法が考えられる（例えば、欧州特許第０６００５１７号を参照のこと）。抗ＣＤ７９ｂ抗体は治療上有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。別の実施形態において、抗ＣＤ７９ｂ抗体は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性および効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ’Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ＰＤＲ）は、種々の癌の処置に用いられるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効なこれらの上述の化学療法剤の投薬レジメンおよび投薬量は、治療されている特定のガン、疾患の程度、および当該分野の医師によく知られている他の要因に依存し、医師が決定することができる。

【０７４６】

特定の一実施形態では、細胞毒性剤とコンジュゲートした抗ＣＤ７９ｂ抗体を含有するコンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、ＣＤ７９ｂタンパク質に結合したイムノコンジュゲートは細胞によって内部移行され、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性におけるイムノコンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施形態では、細胞毒性剤は、ガン細胞内の核酸を標的するか、またはこれと干渉する。このような細胞毒性剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼおよびＤＮＡエンドヌクレアーゼが挙げられる。

【０７４７】

抗ＣＤ７９ｂ抗体またはその毒素コンジュゲートは、静脈内投与などの公知の方法、例えばボーラス、もしくは一定時間にわたる連続注入によって、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、または吸入経路によって、ヒトの患者に投与される。抗体の静脈内または皮下投与が好ましい。

【０７４８】

他の治療レジメンを抗ＣＤ７９ｂ抗体の投与と組合せてもよい。組合せ投与としては、別々の処方物または単一の医薬製剤を用いる同時投与、および好ましくは両方（または全ての）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挙げられる。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。

【０７４９】
特定の癌に関連した別の腫瘍抗原に対する抗体の投与と共に、抗ＣＤ７９ｂ抗体（単数または複数）の投与を組合せることも望ましい場合がある。
【０７５０】
別の実施形態では、本発明の治療的な処置方法は、抗ＣＤ７９ｂ抗体（単数または複数）と１つ以上の化学療法剤または成長阻害剤との組合せ投与を包含し、この化学療法剤としては、異なる化学療法剤の混合物、または腫瘍増殖を阻害する他の細胞毒性剤（単数または複数）もしくは他の治療剤（単数または複数）の同時投与を包含する。化学療法剤としては、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、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン（ｈｙｄｒｏｘｙｕｒｅａｔａｘａｎｅｓ）（例えばパクリタキセルおよびドキセタキセル）および／またはアントラサイクリン抗生物質が挙げられる。このような化学療法剤の調製および投与スケジュールは製造者の説明書に従って用いられてもよいし、または熟練した実務者により経験的に決定されてもよい。このような化学療法の調製および投与スケジュールは、Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅ編　Ｍ．Ｃ．Ｐｅｒｒｙ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，　Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ（１９９２）にも記載されている。抗体は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェンなどの抗－エストロゲン化合物；オナプリストン（ｏｎａｐｒｉｓｔｏｎｅ）（欧州特許第６１６８１２号を参照）などの抗プロゲステロン；またはフルタミドなどの抗アンドロゲンを、このような分子に対して公知の用量で組合せてもよい。治療されるガンがアンドロゲン非依存性ガンである場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、疾患がアンドロゲン非依存性になった後、抗ＣＤ７９ｂ抗体（および場合によっては本明細書に記載した他の薬剤）をこの患者に投与してもよい。
【０７５１】
時には、心臓保護剤（治療に関連する心筋の機能不全を防止または低減するため）または１つ以上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場合がある。上述した治療計画に加えて、患者は、抗体療法の前に、同時にまたは後に、外科的にガン細胞を取り除くか、および／または放射線治療（例えば、外部のビーム放射線または放射性標識した薬剤、例えば抗体での治療）を施されてもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な投薬量が現在用いられており、この薬剤と抗ＣＤ７９ｂ抗体の併用作用（相乗作用）に応じて、より少なくてもよい。
【０７５２】
本発明の抗体組成物は、良好な医学的実施と一致する方式で処方、投薬および投与されるであろう。この状況の考慮のための要因としては、処置されるべき特定の障害、処置されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床条件、障害の経過、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医療従事者に公知の他の要因が挙げられる。抗体は、該当の障害を予防または処置するために現在用いられている１つ以上の薬剤と、必須ではないが、必要に応じて処方される。このような他の薬剤の有効量は、処方物に存在する本発明の抗体の量、障害または処置のタイプ、および上記で考察される他の要因に依存する。これらは一般には、本明細書において前記で用いられるのと同じ投薬量で投与経路で、または従来使用される投薬量の約１～９９％で用いられる。
【０７５３】
疾患の予防または治療のためには、投与の投薬量および方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体の適切な投薬量は、上記のような処置される疾患の種類、疾患の重症度および経過、抗体を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴および抗体への反応性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体は一度にまたは一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体は静脈注入または皮下注射により投与される。疾患の種類および重症度に応じて、例えば１つ以上の別個の投与または連続注入のいずれかであれ、体重１ｋｇあたり約１μｇ～約５０ｍｇ（例えば約０．１～１５ｍｇ／ｋｇ／用量）の抗体が患者への最初の投与

量の候補であってもよい。投薬レジメンは、約４ｍｇ／ｋｇの初期ローディング量、続いて１週間に約２ｍｇ／ｋｇの維持用量という抗ＣＤ７９ｂ抗体を投与する工程を含んでもよい。しかしながら、他の投薬計画も有用であろう。上述した因子に応じて、代表的な一日の投与量は約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、またはそれ以上の範囲であろう。数日間またはそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の症状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、従来の方法およびアッセイによって、ならびに医師または他の当業者に公知の基準に基づいて容易にモニターできる。

【０７５４】

患者への抗体タンパク質の投与の他に、本出願は遺伝子療法による抗体の投与を考慮する。抗体をコードする核酸の投与は「抗体を治療上有効な量で投与する」という表現で包含される。例えば、遺伝子療法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。

【０７５５】

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：インビボおよびエキソビボという２つの主要なアプローチがある。インビボ送達では、核酸は、通常抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処置では、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、また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（例えば、米国特許第４，８９２，５３８号および第５，２８３，１８７号を参照のこと）。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。この技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、または目的の宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を包含する。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。

【０７５６】

現在好まれているインビボ核酸移入技術としては、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスＩウイルス、またはアデノ関連ウイルス）、および脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、およびＤＣ－Ｃｈｏｌである）でのトランスフェクションが挙げられる。現在公知である遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコールの概説については、Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５６：８０８～８１３（１９９２）を参照のこと。また、国際公開第９３／２５６７３号およびそこに引用された参考文献も参照のこと。

【０７５７】

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体とは、本明細書における「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。したがって、抗体としては、全長またはインタクトな抗体、抗体フラグメント、天然配列の抗体またはアミノ酸改変体、ヒト化抗体、キメラ抗体または融合抗体、イムノコンジュゲート、およびそれらの機能的フラグメントが挙げられる。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されている。抗体のＦｃ領域を修飾して、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裸の抗体は、例えば抗体－依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を介してまたは補体依存性細胞傷害において補体を補充することにより、また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。あるいは、副作用または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または低減することが望ましい場合には、特定の他のＦｃ領域を用いてもよい。

【０７５８】

一実施形態では、抗体は、本発明の抗体類と同じエピトープとの結合に関して競合するか、またはこれに実質的に結合する。本発明のこの抗ＣＤ７９ｂ抗体の生物学的特徴を有する抗体類も考慮され、これらの特徴としては詳細には、インビボ腫瘍標的および任意の細胞増殖阻害または細胞毒性の特徴が挙げられる。

【０７５９】
上述した抗体の産生方法を本明細書で詳細に記載する。
【０７６０】
本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、哺乳動物におけるＣＤ７９ｂ発現ガンの治療またはそのガンの１つ以上の症状の緩和に有用である。このようなガンとしては限定するものではないが、造血系のガンまたは血液関連のガン、例えば、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ系悪性疾患だけでなく、脾臓の癌およびリンパ節の癌も挙げられる。このようなＢ細胞関連ガンのさらに特別な例としては、例えば、高悪性度、中悪性度および低悪性度のリンパ腫（例としては、例えば、粘膜内リンパ組織Ｂ細胞リンパ腫および非ホジキンリンパ腫などのＢ細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、周辺帯リンパ腫、拡散性大細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、およびホジキンリンパ腫およびＴ細胞リンパ腫）、および白血病（二次性白血病、慢性リンパ性白血病、例えば、Ｂ細胞白血病（ＣＤ５＋Ｂリンパ球）、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病および骨髄異形成症候群を含む）、ならびにその他の血液学的および／またはＢ細胞もしくはＴ細胞関連の癌が挙げられる。このガンは、前出の任意のガンのうち転移性のガンを包含する。抗体は、哺乳動物においてＣＤ７９ｂポリペプチドを発現しているガン細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施形態では、この抗体は、インビボまたはインビトロで細胞のＣＤ７９ｂポリペプチドに結合する際、ＣＤ７９ｂ発現腫瘍細胞を破壊もしくは死滅させるか、またはこのような腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効である。このような抗体としては、裸の抗ＣＤ７９ｂ抗体（いかなる薬剤にも結合していない）が挙げられる。細胞傷害性または細胞増殖阻害特性を有する裸の抗体はさらに、細胞毒性剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば抗体と細胞毒性剤とをコンジュゲートさせ、本明細書に記載されるようなイムノコンジュゲートを形成させることによって、細胞傷害特性を抗ＣＤ７９ｂ抗体に付与することができる。この細胞毒性剤または増殖阻害剤は、好ましくは低分子である。カリケアマイシンまたはメイタンシノイドなどの毒素、およびそれらのアナログまたは誘導体が好ましい。
【０７６１】
本発明は、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体とキャリアとを含有している組成物を提供する。ガンを処置する目的のために、組成物をこのような処置の必要な患者に投与してもよく、この組成物はイムノコンジュゲートとしてまたは裸の抗体として存在する１つ以上の抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでもよい。さらなる実施形態においては、この組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含んでいる細胞毒性剤または増殖阻害剤と組み合わせてこれらの抗体を含んでもよい。本発明はまた、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体、およびキャリアを含んでいる処方物も提供する。一実施形態において、この処方物は薬学的に許容可能なキャリアを含んでいる治療用処方物である。
【０７６２】
本発明の別の局面は、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードしている単離された核酸分子である。ＨおよびＬ鎖の両方および特に超可変領域残基、天然配列の抗体をコードする鎖、ならびにこの抗体の改変体、修飾バージョンおよびヒト化バージョンをコードしている核酸、が包含される。
【０７６３】
本発明はまた、哺乳動物におけるＣＤ７９ｂポリペプチド発現ガンの処置またはこのガンの１つ以上の症状を緩和するのに有用な方法を提供し、この方法は、治療上有効な量の抗ＣＤ７９ｂ抗体を哺乳動物に投与する工程を包含する。抗体治療組成物は、医師の指示どおりに、短い期間（急性）または慢性的に、または間欠的に投与することができる。また、ＣＤ７９ｂポリペプチド発現細胞の増殖を阻害し、この細胞を殺傷する方法も提供される。
【０７６４】
本発明はまた、少なくとも１つの抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでいるキットおよび製造品も

提供する。抗ＣＤ７９ｂ抗体を備えているキットは、例えば、ＣＤ７９ｂ細胞殺傷アッセイ、細胞からのＣＤ７９ｂポリペプチドの精製または免疫沈降における用途が見出されている。例えば、ＣＤ７９ｂの単離および精製のためには、キットはビーズ（例えばセファロースビース）に結合した抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでいもよい。インビトロ、例えば、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロットにおけるＣＤ７９ｂの検出および定量化のための抗体を含むキットを提供することができる。検出に有用なこのような抗体は、蛍光または放射標識などの標識が備えられてもよい。

【０７６５】

Ｉ．抗体－薬物コンジュゲート処理

本発明の抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を、腫瘍抗原の過剰発現によって例えば特徴付けられる、種々の疾患または障害を処置するために用いてもよいと考えられる。例示的な状態または過剰増殖性障害としては、良性または悪性の腫瘍；白血病およびリンパ系悪性疾患が挙げられる。他には、神経障害、グリアの障害、星状膠細胞障害、視床下部障害、腺性の障害、マクロファージの障害、上皮の障害、間質性障害、胞胚腔障害、炎症性障害、血管形成障害および免疫学的障害（自己免疫障害を含む）が挙げられる。

【０７６６】

動物モデルおよび細胞ベースのアッセイで特定されるＡＤＣ化合物は、腫瘍を保有する高等な霊長類およびヒトでの臨床試験でさらに試験されてもよい。ヒトの臨床試験は、Ｂ細胞増殖性障害を経験している患者において本発明の抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体またはイムノコンジュゲートの有効性を試験するように設計されてもよく、この障害としては限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。臨床試験は公知の治療レジメン、例えば、放射線および／または化学療法（公知の化学療法および／または細胞毒性剤を含む）と組み合わせてＡＤＣの有効性を評価するように設計してもよい。

【０７６７】

一般には、処置されるべき疾患または障害は、過剰増殖性の疾患、例えば、Ｂ細胞増殖障害および／またはＢ細胞ガンである。本明細書で処置されるべきガンの例としては限定するものではないが、Ｂ細胞増殖性障害が挙げられ、これは、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０７６８】

ガンは、ＣＤ７９ｂ発現細胞を含んでもよく、その結果本発明のＡＤＣは、ガン細胞に結合できる。ガンでのＣＤ７９ｂ発現を確認するために、種々の診断／予測アッセイが利用可能である。一実施形態では、ＣＤ７９ｂ過剰発現は、ＩＨＣによって分析され得る。腫瘍生検由来のパラフィン包埋組織切片をＩＨＣアッセイに供して、染色の程度および腫瘍細胞のどの程度の割合が検査されたかに関するＣＤ７９ｂタンパク質染色強度基準に一致させてもよい。

【０７６９】

疾病の予防または治療について、ＡＤＣの適切な投薬量は、上で定義したように、治療すべき疾病のタイプ、その疾病の重症度および経過、その分子を予防のために投与するのか、治療のために投与するのか、以前の治療法、その患者の臨床履歴および抗体への応答、ならびに担当医の自由裁量に依存するであろう。分子は、１回、または一連の治療にわたって、患者に適切に投与される。例えば、１回以上の別々の投与によろうと、連続注入によろうと、疾病のタイプおよび重症度に依存して、分子約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）が、患者への投与のための初期候補投薬量である

。代表的な１日用量は、上で述べた要因に依存して、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲におよぶであろう。患者に投与されるＡＤＣの例示的投薬量は、患者の体重あたり約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【０７７０】

状態に依存して数日以上にわたる反復投与に関しては、疾病症状の所望の抑制が生じるまで、その治療を継続する。例示的投薬レジメンは、抗ＥｒｂＢ２抗体の約４ｍｇ／ｋｇの初期負荷用量、続いて、約２ｍｇ／ｋｇの週間維持用量の投与を含む。他の投薬レジメンも有用であり得る。この療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易にモニターされる。

【０７７１】

Ｊ．併用療法

本発明の抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、薬学的な併用処方物中に組み合されてもよいし、または併用療法としての投薬レジメンで、抗癌特性を有する第二の化合物と併用してもよい。前記併用医薬処方物または投薬レジメンの第二化合物は好ましくは、その併用のＡＤＣに対して補完的な活性を有しており、そのためにそれらは互いに悪影響を及ぼさない。

【０７７２】

この第二の化合物は、化学療法薬、細胞障害剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン薬、および／または心臓保護薬であってもよい。このような分子は、所期の目的に有効な量で併用剤中に適切に存在する。本発明のＡＤＣを含有している医薬組成物はまた、治療上有効な量の化学療法剤、例えば、チューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビターまたはＤＮＡ結合剤も有する場合もある。

【０７７３】

一局面では、第一の化合物は、本発明の抗ＣＤ７９ｂＡＤＣであり、第二の化合物は抗ＣＤ２０抗体である（裸の抗体またはＡＤＣのいずれか）。一実施形態では、この第二の化合物は、抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））または２Ｈ７（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）である。本発明の抗ＣＤ７９ｂのＡＤＣとの組み合された免疫療法に有用な別の抗体としては、限定するものではないが、抗ＶＥＧＦ（例えば、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））が挙げられる。

【０７７４】

他の治療的レジメンは、放射線療法ならびに／または骨髄および末梢血液移植、および／または細胞障害性剤、化学療法剤または増殖阻害性剤を含むがこれらに限定されない本発明に従って同定される抗癌剤の投与と組み合わされてもよい。このような実施形態のうち１つでは、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン（Ｏｎｃｏｖｉｎ（商標））、プレドニゾロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰもしくはＣＯＰ、または免疫療法剤、例えば、抗ＣＤ２０（例えばリツキサン（登録商標））もしくは抗ＶＥＧＦ（例えば、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））などの薬剤または薬剤の組合せである。

【０７７５】

併用療法は同時または連続的な投薬レジメンとして投与されてもよい。連続して投与される場合、組合せは２以上の投与で投与されてもよい。併用投与としては、別々の製剤または単一の製薬的製剤を用いての同時投与、およびいずれかの順序での連続投与が包含され、このとき、両方（または全て）の活性剤が同時にその生物学的活性をおよぼす一定時間があるのが好ましい。

【０７７６】

一実施形態では、ＡＤＣによる治療は、本明細書において同定される抗癌剤、および異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む１つ以上の化学療法剤または増殖阻害性剤の併用投与を包含する。化学療法剤としては、タキサン（例えばパクリタキセルおよびドセタキセル）および／またはアントラサイクリン抗生物質が挙げられる。このような化学療法

剤のための調製や投薬計画は、製造業者の指示に従って用いられてもよいし、または熟練した専門家によって経験的に決定されてもよい。このような化学療法の調製や投薬計画はまた、「Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅ」，（１９９２）編集Ｍ．Ｃ．Ｐｅｒｒｙ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．にも記載される。

【０７７７】

任意の上記の同時投与される薬剤の適切な投薬量は現在用いられている量であり、新規に同定される薬剤と他の化学療法剤もしくは処置の併用作用（相乗作用）に応じて低くしてもよい。

【０７７８】

併用療法によって「相乗効果」が生じて、「相乗的」、すなわち、一緒に用いた活性成分がこの化合物を別々に用いて生じる効果の合計よりも多い場合に得られる効果が証明され得る。活性成分が、（１）組み合わせた単位用量処方物に同時に製剤化され投与されるか、または同時に送達される場合、（２）別々の製剤として交互にまたは並行して送達される場合、または、（３）いくつかの他のレジメンによってなされる場合に、相乗効果が達成され得る。交互治療で送達される場合、例えば、別々の注射器での異なる注入によって、化合物が投与されるかまたは順次送達される場合に、相乗効果が達成され得る。一般には、交互療法の間、各々の活性成分の有効用量は順次、すなわち連続的に投与されるのに対して、併用療法では、２つ以上の活性成分の有効用量が一緒に投与される。

【０７７９】

Ｋ．製品およびキット

本発明の別の実施形態は、ＣＤ７９ｂを発現するガンの処置、予防および／または診断に有用な材料を備えている製品である。この製品は、容器と、容器に付随するラベルまたは添付文書とを備える。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器はガラスまたはプラスチックなどの種々の物質から形成されてもよい。容器とは、癌の状態の処置、予防および／または診断に有効な組成物を保持するもので、無菌のアクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、静脈注射用の溶液の袋であっても、または皮下注射の針で穿孔可能なストッパーを有するバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも１つの活性剤は、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体である。ラベルまたは添付文書は、その組成物がガンの処置に用いられるものであることを示す。ラベルまたは添付文書はさらに、ガン患者への抗体組成物投与に関する指示を含むであろう。加えて、この製品は、薬学的に受容可能な緩衝液、例えば、注射用の静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などを収容する第２の容器をさらに備えてもよい。製品は、さらに、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料、例えば、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジなどを備えてもよい。

【０７８０】

種々の目的のため、例えば、ＣＤ７９ｂ発現細胞死滅アッセイのため、細胞からのＣＤ７９ｂポリペプチドの精製または免疫沈降のために有用なキットも提供される。ＣＤ７９ｂポリペプチドの単離および精製のために、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ＣＤ７９ｂ抗体を含んでもよい。インビトロ、例えば、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロットにおけるＣＤ７９ｂポリペプチドの検出および定量化のため抗体を含むキットが提供されてもよい。製品の場合と同じように、キットは、容器と、容器に付随するラベルまたは添付文書とを備える。容器は本発明の少なくとも１つの抗ＣＤ７９ｂ抗体を含んでいる組成物を保持する。例えば希釈剤と緩衝液、コントロールの抗体などを収容する追加の容器が備えられてもよい。ラベルまたは添付文書には、組成物の説明、ならびに意図されるインビトロでの使用または診断のための使用に関する指示を記載する場合がある。

【０７８１】

Ｌ．ＣＤ７９ｂポリペプチドの用途

本発明は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを模倣する（アゴニスト）またはＣＤ７９ｂポリペ

プチドの効果を妨げる（アンタゴニスト）化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、本明細書に同定した遺伝子にコードされるＣＤ７９ｂポリペプチドと結合または複合体形成する化合物、またはそうでなければコードされたポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を干渉する（例えば、細胞からＣＤ７９ｂポリペプチドの発現を阻害することを包含する）化合物を同定するように設計される。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ハイスループットスクリーニングに適用可能なアッセイを包含しており、それによってこのアッセイは特に低分子候補薬の同定に適したものになる。

【０７８２】

このアッセイは、当該分野で十分特徴づけられた、タンパク質－タンパク質の結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、および細胞ベースのアッセイを含んでいる種々の方式で実施されてもよい。

【０７８３】

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらのアッセイが、候補薬と本明細書で同定された核酸によってコードされるＣＤ７９ｂポリペプチドとを、これら２つの成分を相互作用させるのに十分な条件下および時間で接触させることを必要とするという点が共通である。

【０７８４】

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、または反応混合物中で検出される。特別な実施形態では、本明細書に同定された遺伝子にコードされるＣＤ７９ｂポリペプチドまたは候補薬が、共有また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ＣＤ７９ｂポリペプチドの溶液でコーティングすることおよび乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化される抗体、例えば、固定化されるべきＣＤ７９ｂポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を用いて、それを固体表面に固着させてもよい。アッセイは、固定化成分、例えば、固着成分を含んでいるコーティング表面に、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によって複合体形成が起こったことが示される。最初の非固定化成分が標識を担持しない場合は、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を用いることによって検出できる。

【０７８５】

候補化合物が相互作用するが本明細書において同定された遺伝子によってコードされる特定のＣＤ７９ｂポリペプチドに結合しない場合、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周知の方法によってアッセイすることができる。このようなアッセイは、例えば、架橋、同時免疫沈降、および勾配またはクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的なアプローチを包含する。さらに、タンパク質－タンパク質相互作用は、ＣｈｅｖｒａｙおよびＮａｔｈａｎｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９，５７８９～５７９３（１９９１）に開示されているようにして、（Ｆｉｅｌｄｓおよび共同研究者ら［Ｆｉｅｌｄｓおよび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モニターすることができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する、２つの物理的に別個のモジュラードメインからなる。前述の刊行物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使用し、このうち一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ４活性化プロモーターの制御

下でのＧＡＬ１－ｌａｃＺリポーター遺伝子の発現は、タンパク質－タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含んでいるコロニーは、β－ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。２－ハイブリッド技術を用いた２つの特定なタンパク質間のタンパク質－タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（ＭＡＴＣＨＭＡＫＥＲ（商標））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、なら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。

【０７８６】

本明細書で同定されたＣＤ７９ｂポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内または細胞外成分の相互作用を干渉する化合物は、以下のように試験できる：通常反応混合物は、遺伝子産物と細胞内または細胞外成分を、それら２つの生成物が相互作用および結合可能である条件下および時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在および存在下で実施される。さらに、プラシーボを第３の反応混合物に添加して陽性の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成分または細胞外成分との間の結合（複合体形成）は、上記のようにモニターされる。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の反応（単数または複数）における複合体の形成によって、その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干渉することが示される。

【０７８７】

アンタゴニストをアッセイするために、ＣＤ７９ｂポリペプチドを、特別な活性についてスクリーニングされるべき化合物とともに細胞に添加してもよく、ＣＤ７９ｂポリペプチドの存在下でこの化合物が目的の活性を阻害する能力によって、この化合物がＣＤ７９ｂポリペプチドのアンタゴニストであることが示される。あるいは、アンタゴニストは、ＣＤ７９ｂポリペプチドおよび膜結合ＣＤ７９ｂポリペプチドレセプターまたは組換えレセプターを持つ潜在的なアンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で組み合わせることにより検出してもよい。ＣＤ７９ｂポリペプチドは、放射活性等で標識可能であり、その結果レセプターに結合したＣＤ７９ｂポリペプチド分子の数を用いて潜在的アンタゴニストの有効性を決定することができる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に公知の多くの方法、例えばリガンドパンニングおよびＦＡＣＳソーティングにより同定できる。Ｃｏｌｉｇａｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎ．，１（２）：第５章（１９９１）。好ましくは、発現クローニングを使用して、ポリアデニル化ＲＮＡをＣＤ７９ｂポリペプチドに反応性の細胞から調製し、このＲＮＡから生成されたｃＤＮＡライブラリをプールに分配して、ＣＯＳ細胞またはＣＤ７９ｂポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に用いる。スライドガラス上で成長させたトランスフェクトされた細胞を、標識したＣＤ７９ｂポリペプチドに曝露する。ＣＤ７９ｂポリペプチドは、ヨウ素化また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。固定およびインキュベーションの後、スライドをオートラジオグラフィ分析に供する。陽性のプールを同定し、相互作用的サブプール化および再スクリーニングプロセスを用いてサブプールを調製して再トランスフェクトし、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【０７８８】

代替的なレセプター同定のアプローチとして、標識したＣＤ７９ｂポリペプチドを、レセプター分子を発現する細胞膜または抽出調製物と光親和性結合させることができる。架橋材料はＰＡＧＥに溶解させ、Ｘ線フィルムに曝露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチドフラグメントに分離し、タンパク質マイクロ配列決定に供してもよい。マイクロ配列から得たアミノ酸配列を用いて、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする１セットの分解性オリゴヌクレオチドプローブを設計する。

【０７８９】

アンタゴニストの別のアッセイでは、レセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物を、候補化合物の存在下で標識ＣＤ７９ｂポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力を測定してもよい。

【０７９０】

可能性のあるアンタゴニストのさらに特異的な例としては、ＣＤ７９ｂポリペプチドとの免疫グロブリン、詳細には、限定するものではないが、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびに抗体フラグメント、このような抗体またはフラグメントの単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラまたはヒト化バージョン、ならびにヒト抗体および抗体フラグメントの融合物に結合するオリゴヌクレオチドが挙げられる。あるいは、可能性のあるアンタゴニストは、密接に関連するタンパク質、例えば、レセプターを認識するが作用を及ぼさずそれによってＣＤ７９ｂポリペプチドの作用を競合的に阻害するＣＤ７９ｂポリペプチドの変異型であってもよい。

【０７９１】

本明細書に特定されるＣＤ７９ｂポリペプチドに特異的に結合する抗体、ならびに本明細書において前記に開示されるスクリーニングアッセイによって特定される他の分子は、ガンを含んでいる種々の障害の処置のために薬学的組成物の形態で投与され得る。

【０７９２】

ＣＤ７９ｂポリペプチドが細胞内であり、かつ抗体丸ごとがインヒビターとして用いられる場合、内部移行する抗体が好ましい。しかし、リポフェクションまたはリポソームも、抗体または抗体フラグメントを細胞内に送達するために用いられてよい。抗体フラグメントが用いられる場合、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の阻害性フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、ペプチド分子は、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するように設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成されてもよく、そして／または組換えＤＮＡ技術によって産生されてもよい。例えば、Ｍａｒａｓｃｏら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０，７８８９～７８９３［１９９３］を参照のこと。

【０７９３】

本明細書中の処方物はまた、処置されている特定の徴候に必要な２個以上の活性化合物（好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有する化合物）を含んでもよい。あるいは、またはさらに、この組成物は、例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖阻害剤などその機能を増強する因子を含んでもよい。このような分子は、意図される目的のために有効な量で、組み合わせて適切に存在する。

【０７９４】

Ｍ．抗体誘導体

本発明の抗体は、当該分野で公知であり容易に入手できる追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾してもよい。好ましくは、抗体の誘導体化に適切な部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定するものではないが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキソラン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）およびデキストランまたはポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレン（ｐｒｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ）オキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコールおよびこれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはそれが水中での安定性であるために製造において好都合であり得る。ポリマーは任意の分子量のものであってよく、そして分枝鎖であってもまたは未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、１つより多いポリマーが結合する場合は、それらは同じ分子であってもまたは異なる分子であってもよい。一般的に、誘導体化に用いるポリマーの数および／または種類は、

限定するものではないが、向上させるべき抗体の特定の特性または機能を含む考慮に基づいて、抗体誘導体を所定の条件下の治療に用いるか否かなどという考慮に基づいて決定することができる。

【０７９５】

Ｎ．スクリーニングの方法

本発明のさらに別の実施形態は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを含んでいる疑いのあるサンプル中のＣＤ７９ｂポリペプチドの存在を決定する方法に関しており、この方法は、このサンプルをＣＤ７９ｂポリペプチドに結合するその抗体薬物コンジュゲートに曝す工程と、そのサンプル中でのＣＤ７９ｂポリペプチドに対するその抗体薬物コンジュゲートの結合を決定する工程とを包含し、ここでこのような結合の存在は、サンプル中のＣＤ７９ｂポリペプチドの存在の指標である。必要に応じてこのサンプルは、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現すると疑われる細胞（ガン細胞であってもよい）を含み得る。この方法で使用されるその抗体薬物コンジュゲートは必要に応じて、検出可能に標識されて、固体支持体に結合されるなどしてもよい。

【０７９６】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、この方法は、（ａ）この哺乳動物から得られた組織細胞を含んでいる試験サンプルと、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合するその抗体薬物コンジュゲートとを接触させる工程、ならびに（ｂ）この試験サンプル中でのその抗体薬物コンジュゲートとＣＤ７９ｂポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程であって、複合体形成が哺乳動物中の腫瘍の存在の指標である工程を包含する。必要に応じてこの抗体薬物コンジュゲートは検出可能に標識されるか、固体支持体に結合されるなどであり、および／または組織細胞の試験サンプルは、癌性腫瘍を有していると疑われる個体から得られる。

【０７９７】

ＩＶ．抗ＣＤ７９ｂ抗体およびイムノコンジュゲートを用いるさらなる方法

Ａ．診断方法および検出の方法

一局面では、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体およびイムノコンジュゲートは、生物学的サンプル中のＣＤ７９ｂの存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」という用語は、定量的または定性的な検出を包含する。特定の実施形態では、生物学的サンプルは、細胞または組織を含む。特定の実施形態では、このような組織としては、他の組織、例えばＢ細胞および／またはＢ細胞関連組織に対して高いレベルでＣＤ７９ｂを発現する正常および／または癌性組織が挙げられる。

【０７９８】

一局面では、本発明は、生物学的サンプル中のＣＤ７９ｂの存在を検出する方法を提供する。特定の実施形態では、この方法は、ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合に許容される条件下で生物学的サンプルと抗ＣＤ７９ｂ抗体とを接触させる工程と、抗ＣＤ７９ｂ抗体とＣＤ７９ｂとの間に複合体が形成されるか否かを検出する工程とを包含する。

【０７９９】

一局面では、本発明は、ＣＤ７９ｂの発現増加と関係している障害を診断する方法を提供する。ある実施形態では、前記方法は、試験細胞と抗ＣＤ７９ｂ抗体とを接触させる工程と；ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出することによって試験細胞によるＣＤ７９ｂの発現レベル（量的にまたは質的に）を測定する工程と；試験細胞によるＣＤ７９ｂの発現レベルと、コントロール細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞、またはこのような正常細胞に匹敵するレベルでＣＤ７９ｂを発現する細胞）によるＣＤ７９ｂの発現レベルとを比較する工程とを包含し、ここでコントロール細胞と比べて試験細胞によるＣＤ７９ｂの発現レベルが高ければＣＤ７９ｂの発現の増加に関連する障害の存在が示される。特定の実施形態では、試験細胞は、ＣＤ７９ｂの発現の増大に関連する障害があると疑われる個体から得られる。特定の実施形態では、この障害は、癌または腫瘍などの細胞増殖性障害である。

【０８００】

本発明の抗体を用いて診断され得る例示的な細胞増殖性障害としては、Ｂ細胞障害および／またはＢ細胞増殖性障害が挙げられ、これには限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。

【０８０１】

特定の実施形態では、上記のような診断もしくは検出の方法は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を、細胞の表面上で発現されたＣＤ７９ｂに対して、または細胞の表面上にＣＤ７９ｂを発現している細胞から得た膜調製物中で検出する工程を包含する。特定の実施形態では、この方法は、ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合に許容される条件下で抗ＣＤ７９ｂ抗体と細胞を接触させる工程と、抗ＣＤ７９ｂ抗体と細胞表面上のＣＤ７９ｂとの間に複合体が形成されるか否かを検出する工程とを包含する。細胞の表面上に発現されたＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは、「ＦＡＣＳ」アッセイである。

【０８０２】

特定の他の方法を、ＣＤ７９ｂに対する抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出するために用いてもよい。このような方法としては、限定するものではないが、当分野で周知である抗原－結合アッセイ、例えばウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素連結免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイ、および免疫組織化学（ＩＨＣ）が挙げられる。

【０８０３】

特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は標識される。標識としては、限定するものではないが、直接検出される標識または分子（例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、および放射性標識）、ならびに、例えば酵素反応または分子相互作用によって間接的に検出される酵素もしくはリガンドなどの分子が挙げられる。例示的な標識としては、限定するものではないが、放射性同位体である^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈおよび^{131}Ｉ、フルオロフォア、例えば希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタルアジネジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｐｈｔｈａｌａｚｉｎｅｄｉｏｎｅｓ）、西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環のオキシダーゼ、例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ、ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼまたはマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために水素ペルオキシダーゼを使用する酵素とカップリングさせたもの、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離基などが挙げられる。

【０８０４】

特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかのＣＤ７９ｂから抗ＣＤ７９ｂ抗体を分離することを伴う。これは従来、水不溶性基質もしくは表面に対して吸着させる（Ｂｅｎｎｉｃｈら、米国特許第３，７２０，７６０号）または共有的にカップリングさせる（例えば、グルタルアルデヒド架橋結合を用いる）、などしてアッセイ手順の前に抗ＣＤ７９ｂ抗体を不溶化するか、あるいは抗ＣＤ７９ｂ抗体とＣＤ７９ｂとの間の複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によって抗ＣＤ７９ｂ抗体を不溶化することによって、達成される。

【０８０５】

診断もしくは検出の任意の上記の実施形態は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の代わりに、もしくは

抗ＣＤ７９ｂ抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行ってもよい。

【０８０６】

Ｂ．治療法

本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートは、例えば、インビトロ、エクスビボ、およびインビボの治療法で用いられてもよい。一局面では、本発明は、インビボまたはインビトロのいずれかでの細胞の成長もしくは増殖を阻害するための方法を提供し、この方法は、ＣＤ７９ｂへのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはそのイムノコンジュゲートに対して細胞を曝す工程を包含する。「細胞の成長または増殖を阻害する」ことは、細胞の成長もしくは増殖を少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または１００％低減することを意味し、細胞死を誘導することを包含する。特定の実施形態では、この細胞は腫瘍細胞である。特定の実施形態では、この細胞は、Ｂ細胞である。特定の実施形態では、この細胞は、例えば本明細書中に例示したような異種移植片である。

【０８０７】

一局面では、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートを用いて、Ｂ細胞増殖性障害を処置するかまたは予防する。特定の実施形態では、細胞増殖性障害は、ＣＤ７９ｂの発現および／または活性の増大と関係している。例えば、特定の実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は、Ｂ細胞の表面上のＣＤ７９ｂの発現増大と関連している。特定の実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は腫瘍またはガンである。本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートによって処置されるべきＢ細胞増殖性障害の例としては、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。

【０８０８】

一局面では、本発明は、抗ＣＤ７９ｂ抗体またはそのイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与する工程を包含するＢ細胞増殖性障害を処置するための方法を提供する。特定の実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害を治療するための方法は、抗ＣＤ７９ｂ抗体または抗ＣＤ７９ｂイムノコンジュゲートと、必要に応じて以下に挙げるような少なくとも１つの付加的治療剤とを含有している薬学的処方物の有効量を個体に投与する工程を包含する。特定の実施形態では、細胞増殖性障害を処置するための方法は、１）抗ＣＤ７９ｂ抗体と細胞毒性剤とを含むイムノコンジュゲートと；必要に応じて２）以下に挙げるような少なくとも１つの付加的治療剤とを含有する薬学的処方物の有効量を個体に投与する工程を包含する。

【０８０９】

一局面では、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートの少なくともいくつかは、ヒト以外の種のＣＤ７９ｂを結合し得る。従って、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートを用いて、例えば、ＣＤ７９ｂを含んでいる細胞培養物において、ヒトにおいて、または、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートが交差反応するＣＤ７９ｂを有する他の哺乳動物（例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよびアカゲザル、ブタまたはマウス）において、ＣＤ７９ｂを結合してもよい。一実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはイムノコンジュゲートは、抗体もしくはイムノコンジュゲートとＣＤ７９ｂとを接触させて抗体またはイムノコンジュゲート－抗原複合体を形成することによって、Ｂ細胞上でＣＤ７９ｂを標的するために用いてもよく、その結果イムノコンジュゲートのコンジュゲートされた細胞毒素が細胞の内部にアクセスする。一実施形態では、このＣＤ７９ｂはヒトＣＤ７９ｂである。

【０８１０】

一実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはイムノコンジュゲートはＣＤ７９ｂ発現および／または活性の増大と関係する障害に罹患している個体においてＣＤ７９ｂを結合させるための方法で用いられてもよく、この方法は、個体のＣＤ７９ｂが結合されるように

、抗体もしくはイムノコンジュゲートをこの個体に投与する工程を包含する。一実施形態では、この結合された抗体またはイムノコンジュゲートはＣＤ７９ｂを発現しているＢ細胞中に内部移行される。一実施形態では、ＣＤ７９ｂはヒトのＣＤ７９ｂであり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗ＣＤ７９ｂ抗体が結合するＣＤ７９ｂを発現している哺乳動物であってもよい。またさらに、この個体は、ＣＤ７９ｂが（例えば、ＣＤ７９ｂの投与によって、またはＣＤ７９ｂをコードする導入遺伝子の発現によって）導入されている哺乳動物であってもよい。

【０８１１】

抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはイムノコンジュゲートは、治療目的のためにヒトに投与されてもよい。さらに、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはイムノコンジュゲートは、獣医学の目的のためまたはヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するＣＤ７９ｂを発現する非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、ラットまたはマウス）に投与されてもよい。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートの治療有効性を評価するため（例えば、投与の投薬量および時間経過の試験）に有用であり得る。

【０８１２】

本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートは、治療において単独で、または他の組成物と組み合わせて用いられてもよい。例えば、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートは、少なくとも１つの付加的治療剤および／またはアジュバントと同時に投与されてもよい。特定の実施形態では、付加的治療剤は、細胞毒性剤、化学療法剤または増殖阻害性剤である。このような実施形態のうちの一つでは、化学療法剤は、薬剤またはこの薬剤の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン（Ｏｎｃｏｖｉｎ（商標））、プレドニゾロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰもしくはＣＯＰ、または免疫療法剤、例えば、抗ＣＤ２０（例えば、Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））または抗ＶＥＧＦ（例えば、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））であり、この併用療法は、ガンおよび／またはＢ細胞障害、例えば、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、およびマントル細胞リンパ腫を含むＢ細胞増殖性障害の処置に有用である。

【０８１３】

上で注記されるこのような併用治療は、併用投与（２つ以上の治療剤が同じかまたは別の製剤に包含される場合）、および別々の投与（この場合には、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートの投与は追加の治療剤および／またはアジュバントの前、同時および／またはその後に投与することができる）を包含する。本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートはまた、放射線療法と組み合わせて用いられてもよい。

【０８１４】

本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲート（および任意の追加の治療剤またはアジュバント）は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、および鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、または皮下的な投与が挙げられる。加えて、抗体もしくはイムノコンジュゲートを、特に抗体もしくはイムノコンジュゲートの用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、任意の適切な経路、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によって投与することができる。

【０８１５】

本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートは、適正医薬品管理基準に合わせた様式で処方、投薬、投与されるであろう。この文脈での考慮の要因としては、処置されている特定の障害、処置されてい特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与の方法、投与のスケジュール、および医師には公知の他の要因が挙げられる。この抗体またはイムノコンジュゲートは必須ではないが場合によっては、問題の障害を

予防するかまたは処置するために一般に用いられる一つ以上の薬剤とともに処方される。そのような他の作用剤の有効量は、処方物中に存在する抗体もしくはイムノコンジュゲートの量、障害もしくは疾患の型または治療、および上記で考察された他の要因に依存する。これらは、一般的に、本明細書に記載されるものと同じ投薬量および投与経路で、または本明細書に記載される投薬量の１～９９％で、あるいは経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量および任意の投与経路で、用いられる。

【０８１６】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートの適切な用量は（単独で用いる場合、または化学療法剤などの１つ以上の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合）、治療される疾患のタイプ、抗体もしくはイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度および経過、この抗体もしくはイムノコンジュゲートを予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴および抗体もしくはイムノコンジュゲートへの応答性、および担当医師の判断に依存するであろう。抗体もしくはイムノコンジュゲートは一時的または一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプおよび重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ（例えば０．１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ）の抗体もしくはイムノコンジュゲートを、例えば一以上の分割投与または連続注入のいずれかによる患者への投与のための初期候補用量とすることができる。ある典型的な１日量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であろう。数日間以上にわたる繰り返し投与については、状態に応じて、処置は通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体もしくはイムノコンジュゲートの投薬量の例は、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲であろう。従って、抗体またはイムノコンジュゲートの約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇの１つ以上の用量を（またはそれらを組み合わせて）患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごとまたは３週ごとに投与してもよい（例えば、その結果、患者に約２～約２０、例えば約６用量の抗体もしくはイムノコンジュゲートが投与される）。初期のより高ローディング用量に続いて、１つ以上のより低用量を投与してもよい。例示的な投薬レジメンは、約４ｍｇ／ｋｇの初期ローディング用量の後、約２ｍｇ／ｋｇの毎週の維持用量の抗体を投与する工程を含む。しかしながら、他の投薬レジメンが有用である場合もある。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって容易にモニターされる。

【０８１７】

Ｃ．活性アッセイ

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体およびイムノコンジュゲートは、当分野で公知の種々のアッセイによって、それらの物理的／化学的な性質および／または生物活性について特徴付けしてもよい。

【０８１８】

１．活性アッセイ

一局面では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはそのイムノコンジュゲートを同定するために提供される。生物学的な活性としては、例えば、細胞の成長または増殖を阻害する能力（例えば「細胞殺傷」活性）、またはプログラムされた細胞死（アポトーシス）を含む細胞死を誘導する能力を挙げることができる。また、インビボおよび／またはインビトロでのこのような生物学的な活性を有する抗体もしくはイムノコンジュゲートも提供される。

【０８１９】

特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体またはそのイムノコンジュゲートは、インビトロでの細胞の成長または増殖を阻害する能力について試験される。細胞の成長または増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のための特定のアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなアッセイの１つは、Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，　ＷＩ）から市販されているＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ

Ａｓｓａｙである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標であるＡＴＰの存在の量に基づいて培養物中の生細胞数を決定する。Ｃｒｏｕｃｈら（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１６０：８１～８８、米国特許第６６０２６７７号を参照のこと。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）に用いられるように９６－または３８４－ウェルの形式で行ってもよい。Ｃｒｅｅら（１９９５）ＡｎｔｉＣａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ ６：３９８～４０４を参照のこと。アッセイ手順は、単一の試薬（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）試薬）を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果細胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが発生される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、ＡＴＰの存在の量に比例する。データは、ルミノメーターまたはＣＣＤカメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位（ＲＬＵ）として表す。

【０８２０】

細胞増殖についての別のアッセイは比色アッセイである「ＭＴＴ」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロマイドのホルマザンへの酸化を測定する。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（商標）アッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を示す。例えば、Ｍｏｓｍａｎｎ（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６５：５５～６３およびＺｈａｎｇら（２００５）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６５：３８７７～３８８２を参照のこと。

【０８２１】

一局面では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施形態では、このようなアッセイは、例えば、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）トリパンブルー（Ｍｏｏｒｅら、（１９９５）Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１７：１～１１を参照）、または７ＡＡＤの取り込みによって示される膜の完全性の喪失を測定する。例示的なＰＩ取り込みアッセイでは、細胞は、１０％の熱不活性化ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ）と２ｍＭのＬ－グルタミンを補充した、ダルベッコの改変イーグル培地（Ｄ－ＭＥＭ）：ハムＦ－１２（５０：５０）中で培養される。したがって、このアッセイは、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で行う。１００×２０ｍｍのディッシュに１ディッシュあたり３×10^6の密度で細胞を播種し、一晩付着させる。その培地を取り除き、新鮮な培地のみ、または種々の濃度の抗体もしくはイムノコンジュゲートを含んでいる培地と交換する。細胞を３日間インキュベートする。処置後、単層をＰＢＳにて洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、１２００ｒｐｍで４℃で５分間遠心して、ペレットを３ｍｌの冷却Ca^{2+}結合緩衝液（１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４、１４０ｍＭのＮａＣｌ、２．５ｍＭの$CaCl_2$）に再懸濁して、細胞凝集塊を取り除くために３５ｍｍのストレーナーを取り付けた１２×７５ｍｍ試験管（試験管あたり１ｍｌ、１処理群につき３試験管）にアリコートする。次いで、試験管にＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を加える。サンプルは、ＦＡＣＳＣＡＮ（商標）フローサイトメータおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（商標）ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を用いて分析される。ＰＩ取り込みによって定まる統計学的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体もしくはイムノコンジュゲートをこのように同定する。

【０８２２】

一局面では、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはイムノコンジュゲートは、インビトロでアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体もしくはイムノコンジュゲートの例示的なアッセイはアネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、細胞を培養し、前段落で考察したようにディッシュに播く。培地を取り除き、新鮮培地のみ、または０．００１～１０μｇ／ｍｌの抗体もしくはイムノコンジュゲートを含んでいる培地と交換する。３日間のインキュベート後、単層をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、細胞を遠心して、Ca^{2+}結合緩衝液に再懸濁し、前段落で考察されたように試験管にアリコー

トする。次いで、試験管に標識したアネキシン（例えばアネキシンＶ－ＦＩＴＣ）（１μｇ／ｍｌ）を加える。サンプルは、ＦＡＣＳＣＡＮ（商標）フローサイトメータおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（商標）ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて分析する。コントロールと比べて統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体もしくはイムノコンジュゲートをこのように同定する。アポトーシスを誘導する抗体もしくはイムノコンジュゲートの別の例示的なアッセイは、ゲノムＤＮＡのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンＤＮＡ　ＥＬＩＳＡ比色アッセイである。このようなアッセイは、例えば細胞死検出ＥＬＩＳＡキット（Ｒｏｃｈｅ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いて行うことができる。

【０８２３】

上記いずれかのインビトロアッセイに用いるための細胞としては、天然でＣＤ７９ｂを発現するか、またはＣＤ７９ｂを発現するように操作されている、細胞または細胞株が挙げられる。このような細胞としては、同じ組織由来の正常細胞と比べてＣＤ７９ｂを過剰発現する腫瘍細胞が挙げられる。また、このような細胞には、ＣＤ７９ｂを発現する細胞株（腫瘍細胞株を含む）および、正常にはＣＤ７９ｂを発現しないがＣＤ７９ｂをコードする核酸をトランスフェクトされている細胞株が挙げられる。

【０８２４】

一局面では、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはそのイムノコンジュゲートは、インビボでの細胞成長または増殖を阻害する能力について試験される。特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体もしくはそのイムノコンジュゲートは、インビボで腫瘍成長を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインビボのモデル系がこのような試験のために用いられ得る。例示的な異種移植片システムでは、適切に免疫を低下させた非ヒト動物、例えば、ＳＣＩＤマウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体もしくはイムノコンジュゲートは動物に投与される。抗体もしくはイムノコンジュゲートが腫瘍増殖を阻害するかまたは低減する能力が測定される。上記の異種移植片系の特定の実施形態では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者由来の腫瘍細胞である。異種移植片モデルを作製するために有用なこのような細胞としては、ヒト白血病およびリンパ腫細胞株が挙げられ、この細胞としては限定するものではないが、ＢＪＡＢ－ｌｕｃ細胞（ルシフェラーゼレポーター遺伝子でトランスフェクトされたＥＢＶ陰性陰性のバーキットリンパ腫細胞株）、Ｒａｍｏｓ細胞（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＣＲＬ－１９２３）、ＳｕＤＨＬ－４細胞（ＤＳＭＺ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ，ＡＡＣ４９５）、ＤｏＨＨ２細胞（Ｋｌｕｉｎ－Ｎｅｉｌｅｍａｎｓ、Ｈ．Ｃ．ら、Ｌｅｕｋｅｍｉａ　５：２２１～２２４（１９９１）、およびＫｌｕｉｎ－Ｎｅｉｌｅｍａｎｓ、Ｈ．Ｃ．ら、Ｌｅｕｋｅｍｉａ　８：１３８５～１３９１（１９９４））、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞（Ｊａｄａｙｅｌ，Ｄ．Ｍ．ら，Ｌｅｕｋｅｍｉａ　１１（１）：６４～７２（１９９７）を参照のこと）が挙げられる。特定の実施形態では、ヒト腫瘍細胞は、皮下注射によって、または哺乳動物の脂肪体などの適切な部位への移植によって、適切に免疫を低下させた非ヒト動物に導入される。

【０８２５】

２．結合アッセイおよび他のアッセイ

一局面では、抗ＣＤ７９ｂ抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、特定の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、細胞の表面に発現されるＣＤ７９ｂに結合する能力について試験される。ＦＡＣＳアッセイをこのような試験に用いてもよい。

【０８２６】

一局面では、競合アッセイを用いて、ＣＤ７９ｂへの結合についてマウス２Ｆ２抗体および／またはヒト化２Ｆ２．Ｄ７抗体と競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。特定の実施形態では、このような競争する抗体は、マウス２Ｆ２抗体および／またはヒト化２Ｆ２．Ｄ７抗体が結合する同じエピトープ（例えば線形または高次構造のエピトープ）に結合する。例示的な競合アッセイとしては、限定するものではないが、Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍ

ａｎｕａｌ　第１４章（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ）に挙げられるものなどの慣用的なアッセイが挙げられる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　第６６巻（Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）のＭｏｒｒｉｓ（１９９６）「Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，」に示される。２つの抗体のそれぞれが５０％以上他の結合をブロックする場合、これらの抗体は同じエピトープに結合すると言える。

【０８２７】

例示的な競合アッセイでは、固定されたＣＤ７９ｂは、ＣＤ７９ｂに結合する第一標識抗体（例えばマウス２Ｆ２抗体および／またはヒト化２Ｆ２．Ｄ７抗体）と、ＣＤ７９ｂへの結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含んでいる溶液中でインキュベートされる。二次抗体はハイブリドーマ上清に存在してもよい。コントロールとして、固定したＣＤ７９ｂを、第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。ＣＤ７９ｂへの第一抗体の結合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたＣＤ７９ｂと会合している標識の量を測定する。固定されたＣＤ７９ｂと会合している標識の量がコントロールのサンプルと比較して試験サンプルにおいて実質的に減少しているならば、二次抗体がＣＤ７９ｂへの結合について第一抗体と競合していることが示される。特定の実施形態では、固定されたＣＤ７９ｂは、細胞の表面上に、またはその表面上にＣＤ７９ｂを発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

【０８２８】

一局面では、精製した抗ＣＤ７９ｂ抗体はさらに、限定するものではないが、Ｎ末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィおよびパパイン消化を含む、一連のアッセイによって特徴付けることができる。

【０８２９】

一実施形態では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を保有する変更された抗体を考慮しており、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、さらに特定のエフェクター機能（補体またはＡＤＣＣなど）が不要または有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施形態では、抗体のＦｃ活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビトロおよび／またはインビボ細胞障害アッセイを行って、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Ｆｃレセプター（ＦｃＲ）結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠いている（すなわちＡＤＣＣ活性を欠いていると思われる）が、ＦｃＲｎ結合能は維持していることを確認することができる。ＡＤＣＣを仲介する第一細胞であるＮＫ細胞は、Ｆｃ（ＲＩＩＩのみを発現するが、その一方で単核細胞はＦｃ（ＲＩ、Ｆｃ（ＲＩＩおよびＦｃ（ＲＩＩＩを発現する。造血系細胞でのＦｃＲ発現については、ＲａｖｅｔｃｈおよびＫｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　９：４５７～９２（１９９１）の４６４頁の表３に要約されている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのインビトロアッセイの例は、米国特許第５，５００，３６２号または同第５，８２１，３３７号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、例えばＣｌｙｎｅｓら、ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）９５：６５２～６５６（１９９８）に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できる。また、Ｃ１ｑ結合アッセイを行って、抗体がＣ１ｑに結合できず、従ってＣＤＣ活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばＧａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０２：１６３（１９９６）に記載のように、ＣＤＣアッセイを行ってもよい。また、ＦｃＲｎ結合およびインビボクリアランス／半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行ってもよい。

【０８３０】
以下の実施例は、例示の目的で示すだけであって、決して本発明の範囲を限定するものではない。
【０８３１】
本明細書に引用される全ての特許および文献の引用はその全体が出典明記によって本明細書に援用される。
【実施例】
【０８３２】
本実施例にて言及される市販の試薬は、他に示さない限り製造業者の指示に従って用いた。本実施例で用いられる抗体としては市販の抗体が挙げられる。以下の実施例および本明細書全体にわたって特定される細胞の供給源は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡであるＡＴＣＣアクセッション番号による。
【０８３３】
（実施例１）
ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の作製
残基番号はＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））に従う。１文字のアミノ酸略号を用いる。ＤＮＡ縮合はＩＵＢコードを用いて示す（Ｎ＝Ａ／Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｄ＝Ａ／Ｇ／Ｔ、Ｖ＝Ａ／Ｃ／Ｇ、Ｂ＝Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｈ＝Ａ／Ｃ／Ｔ、Ｋ＝Ｇ／Ｔ、Ｍ＝Ａ／Ｃ、Ｒ＝Ａ／Ｇ、Ｓ＝Ｇ／Ｃ、Ｗ＝Ａ／Ｔ、Ｙ＝Ｃ／Ｔ）。
【０８３４】
キメラ２Ｆ２抗体（本明細書においては「ｃｈ２Ｆ２」と呼ばれる）を、２００６年８月３日出願の米国特許出願番号第１１／４６２，３３６に以前に記載されたとおり作製した。
【０８３５】
Ａ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト
ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を作製した。マウス２Ｆ２抗体（ｍｕ２Ｆ２）由来のＶＬおよびＶＨドメインをヒトコンセンサスＶＬκＩ（ｈｕＫＩ）およびヒトサブグループＩＩＩコンセンサスＶＨ（ｈｕＩＩＩ）ドメインとアラインメントさせた。ＨＶＲグラフトを作製するために、ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスＶＨドメインとは３つの位置：Ｒ７１Ａ，Ｎ７３Ｔ、およびＬ７８Ａで異なるアクセプターＶＨフレームワーク（Ｃａｒｔｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：４２８５（１９９２））を用いた。マウス２Ｆ２（ｍｕ２Ｆ２）抗体由来の超可変領域をアクセプターヒトコンセンサスフレームワークに操作して、２Ｆ２の直接ＨＶＲ－グラフトを作製した（本明細書においては「２Ｆ２グラフト」または「２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体」または「ｈｕ２Ｆ２グラフト」と呼ばれる）。ＶＬドメインでは以下の領域をヒトコンセンサスアクセプターに移植した：位置２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）（図７）。ＶＨドメインでは、位置２６～３５（Ｈ１）、４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２（Ｈ３）を移植した（図８Ａおよび図８Ｂ）。ＭａｃＣａｌｌｕｍら（ＭａｃＣａｌｌｕｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６２：７３２～７４５（１９９６））は、抗体および抗原の複合体の結晶構造を分析して、重鎖の４９、９３および９４の位置が接触領域の一部であり、そのためヒト化抗体の場合はＨＶＲ－Ｈ２およびＨＶＲ－Ｈ３の定義に包含されることを見出した。
【０８３６】
直接グラフト改変体（２Ｆ２－グラフト）は、各々の超可変領域に別のオリゴヌクレオチドを用いて、ファージ上に提示されたＦａｂおよびＩｇＧとしての両方で、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発によって作製された。正確なクローンはＤＮＡ配列決定によって評価した。

【０８３７】
Ｂ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト改変体
２Ｆ２移植「ヒト化」抗体の超可変領域における変異的な多様性を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト改変体をファージライブラリーを用いて作製した。抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト改変体は、ＨＶＲで複数の位置のバリエーションを含んだ（図９）。
【０８３８】
Ｃ．ファージ選択
ファージ選別のために、ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$（２μｇ／ｍｌ）をＭａｘｉＳｏｒｐマイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃ）上でＰＢＳ中で４℃で一晩固定した。プレートはカゼインブロッカー（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて少なくとも１時間ブロックした。ファージを培養液上清から回収し、０．５％ＢＳＡおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳＢＴ）に懸濁した。ファージライブラリーの追加および２時間のファージ選別後、マイクロタイターウェルを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳＴ）にて徹底的に洗浄し、未結合のファージを取り除いて、結合したファージを、１００ｍＭ　ＨＣｌにてウェルを３０分間インキュベートすることによって溶出した。選別のストリンジェンシーは、ＰＢＳＴでの洗浄回数を増やすことによって、または溶出の前の期間を延長するために可溶性のｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$とインキュベートすることによって連続回の選別の間増大され得る。
【０８３９】
溶出されたファージは、１Ｍのトリス、ｐＨ８にて中和して、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ細胞およびＭ１３／ＫＯ７ヘルパーファージを用いて増幅させ、２ＹＴ、５０μｇ／ｍｌカルバネシリン中で３７℃で一晩増殖させた。標的含有ウェルから溶出されるファージの力価を、非標的含有ウェルから回収したファージの力価と比較して、濃縮を評価した。
【０８４０】
Ｄ．Ｆａｂ産生およびＩｇＧ産生
親和性測定のためにＦａｂタンパク質を発現させるため、停止コドンを、ファージディスプレイベクターの重鎖とｇ３の間に導入した。クローンをＥ．ｃｏｌｉの３４Ｂ８細胞内に形質転換して、完全Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ．培地中で３０℃で増殖させた（Ｐｒｅｓｔａら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５９３～４５９９（１９９７））。細胞を遠心分離によって回収して、ＰＢＳ、１００μＭ　ＰＭＳＦ、１００μＭ　ベンズアミジン、２．４ｍＭのＥＤＴＡに懸濁して、マイクロフルイダイザーを用いて破壊した。ＦａｂはプロテインＧアフィニティクロマトグラフィにて精製した。
【０８４１】
スクリーニングの目的のために、ＩｇＧ改変体を最初に２９３細胞中で作製した。ＶＬおよびＶＨをコードするベクター（２５μｇ）をＦｕＧｅｎｅシステムを用いて２９３細胞中にトランスフェクトした。５００μｌのＦｕＧｅｎｅを、ＦＢＳを含まない４．５ｍｌのＤＭＥＭ培地と混合して、室温で５分間インキュベートした。各々の鎖（２５μｇ）をこの混合物に添加し、室温で２０分間インキュベートし、次いでトランスフェクションのためにフラスコに５％$ＣＯ^{2}$中に３７℃で一晩移した。翌日、そのトランスフェクション混合物を含む培地を取り出して、０．１ｍｌ／Ｌの微量元素および１０ｍｇ／Ｌのインスリンを含む２３ｍｌのＰＳ０４培地で置き換えた。細胞をさらに５日間インキュベートして、その後その培地を１０００ｒｐｍで５分間回収して、０．２２μｍの低タンパク質結合フィルターを用いて無菌濾過した。サンプルは、培地１２５ｍｌごとに２．５ｍｌの０．１％のＰＭＳＦを添加した後４℃で保管可能であった。
【０８４２】
Ｅ．親和性測定（Ｂｉａｃｏｒｅ分析）
２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体の親和性測定のために、ヒトＣＤ７９ｂ（ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$）の細胞外ドメインをＣＨＯ細胞単独でまたはＦｃ融合物（ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$－Ｆｃ）として表し、従来の手段で精製した。さらに、２Ｆ２についてのエピトープを含んでいる１６アミノ酸のペプチド（ＡＲＳＥＤＲＹＲＮＰＫＧＳＡＣＫ）（配列番

号７８）を従来の手段で合成した。

【０８４３】

２Ｆ２抗体のエピトープ（図１４では「試験ペプチド」として表示される）の特徴付けは、２００６年８月３日に提出の米国特許出願番号第１１／４６２，３３６号に以前に開示されている。２Ｆ２抗体のエピトープは、膜貫通ドメインに対して遠位の細胞外ペプチド領域に位置しており、ヒトＣＤ７９ｂの全長型および短縮型に存在し（Ｃｒａｇｇ，Ｂｌｏｏｄ，１００（９）：３０６８～７６（２００２））、これは正常Ｂ細胞および悪性Ｂ細胞において記載されている（Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ，Ｓ．ら、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３２（９）：６５１～９（１９９５）；Ａｌｆａｒａｎｏら、Ｂｌｏｏｄ，９３（７）：２３２７～３５（１９９９））。ＣＤ７９ｂの短縮型は、細胞外Ｉｇ様ドメイン（ＣＤ７９ｂのスプライシング改変型に存在しない細胞外ドメインは図１４ではボックスにしている）全体を欠いている。

【０８４４】

Ｆａｂおよびｃｈ２Ｆ２のＩｇＧ改変体の結合で、固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$またはＣＤ７９ｂ－Ｆｃまたは２Ｆ２のエピトープを含有している１６アミノ酸のペプチドに対する２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体（ｈｕ２Ｆ２グラフト）または２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）を、表面プラズモン共鳴によって測定した。親和性測定は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００を用いる表面プラズモン共鳴によって行った。抗原、ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$またはｈｕＣＤ７９ｂ－Ｆｃを、ＣＭ５センサーチップ上で１０ｍＭの酢酸ナトリウムｐＨ４．８中で固定した（約５０～２００ＲＵ）。２Ｆ２についてのエピトープ（配列番号７８のアミノ酸１～１１）を含んでいる１６アミノ酸のペプチド（ＡＲＳＥＤＲＹＲＮＰＫＧＳＡＣＫ）（配列番号７８）に対する結合を測定する実験では、ビオチン化ペプチドを、ストレプトアビジンでコーティングしたセンサーチップ上で捕獲した（約２０ＲＵ）。精製された２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体（ＦａｂまたはＩｇＧとして）（ＰＢＳＴ中で０．５～１０００ｎＭという２倍階段希釈）を、３０μＬ／分という流速で注射した。各々のサンプルは４分の会合および１０分の解離で分析した。各々の注射後、そのチップを１０ｍＭのグリシン（ｐＨ１．７）を用いて再生した。

【０８４５】

結合応答は、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体（ＦａｂまたはＩｇＧ）フローセルからコントロールのフローセルを差引きすることによって補正した。k_{on}およびk_{off}の同時フィッテイングの１：１のＬａｎｇｕｉｒモデルを反応速度論分析に用いた。

【０８４６】

Ｆ．結合分析（ＦＡＣＳ分析）

ＳＲライブラリーから生じる２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）のＢＪＡＢ細胞に対する結合をさらに確認するため、ＢＪＡＢ細胞に対する標識化ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７（ＩｇＧ改変体）抗体の結合を、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。

【０８４７】

ＦＡＣＳ分析については、モノクローナル抗体ｃｈ２Ｆ２および２Ｆ２．Ｄ７を、製造業者の指示に従って、Ｚｅｎｏｎ（登録商標）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヒトＩｇＧ標識キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で標識した。ＢＪＡＢ細胞（１００μｌの容積に1×10^{6}個の細胞）を各１μｇの標識抗体、ｈＩｇＧ１アイソタイプ、ｃｈ２Ｆ２または２Ｆ２．Ｄ７で染色した。

【０８４８】

Ｇ．親和性測定（スキャッチャード分析）

ＨＶＲ－Ｌ３に変化を有する２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）のＩｇＧ改変体の結合をさらに測定するために、未標識のｃｈ２Ｆ２との競合を用いるヒトＣＤ７９ｂおよびカニクイザルＣＤ７９ｂを発現するＢＪＡＢ細胞に対するヨウ素化抗ＣＤ７９ｂ（ｃｈ２Ｆ２と同じエピトープと有する）の結合を分析して、スキャッチャード分析を行った。

【０８４９】
スキャッチャード分析には、ｃｈ２Ｆ２と同じエピトープを有する０．５ｎＭのＩ^{125}標識した抗ヒトＣＤ７９ｂ、または０．５ｎＭのＩ^{125}標識した２Ｆ２－グラフト「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）を、カニクイザルＣＤ７９ｂおよび内因性ヒトＣＤ７９ｂを安定に発現しているトランスフェクトされたＢＪＡＢ株の存在下で、５０～０．０２ｎＭ（１２工程の１：２連続希釈）におよぶ、それぞれ未標識のｃｈ２Ｆ２またはｈｕ２Ｆ２．Ｄ７に対して競合させた。４℃で４時間のインキュベーション後、細胞を洗浄して細胞ペレットのカウントをガンマカウンターで読み取った（１４７０　ＷＩＺＡＲＤ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｇａｍｍａ　Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈｅｍ，ＭＡ）。全てのポイントを三連で行い、１０分間カウントした。Ｎｅｗ　Ｌｉｇａｎｄ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）プログラムを用いてＫｄ算出のためには平均ＣＰＭを用いた。

【０８５０】
結果および考察
Ａ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の作製の結果
ヒト化抗ＣＤ７９ｂの作製のために用いられるヒトアクセプターフレームワークは、コンセンサスヒトκＩＶＬドメインおよびヒトサブグループＩＩＩコンセンサスＶＨドメインの改変体を含む。改変体ＶＨドメインは、ヒトコンセンサスから３つ変化している：Ｒ７１Ａ、Ｎ７３ＴおよびＬ７８Ａ。マウス２Ｆ２（ｍｕ２Ｆ２）のＶＬおよびＶＨドメインを、ヒトκＩおよびサブグループＩＩＩドメインとアラインメントした；各々のＨＶＲを特定し、次いでヒトアクセプターフレームワークに移植して、ファージ上でＦａｂとして提示され得るＨＶＲ－グラフトを作製した（図７および図８）。

【０８５１】
２Ｆ２－グラフトをＦａｂとして提示するファージは、固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$には結合しなかった（データ示さず）。さらに、Ｂｉａｃｏｒｅ分析で測定した場合、２Ｆ２－グラフトはＦａｂとしてｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$に結合せず、２Ｆ２－グラフトはＦａｂとしてまたはＩｇとしてｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$－Ｆｃに結合しなかった（図１０、ＮＢ＝結合なし（ｎｏ　ｂｉｎｄｉｎｇ））。

【０８５２】
１．ＣＤＲの修復
以下の配列変化を有する固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$に結合できた２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体を特定した。

【０８５３】
Ｌ３中のＨＶＲを標的する唯一の配列変化を、複数の位置変化を含んでいるライブラリー中で観察して、図９に示す（Ｌ３変異については：Ｗ８９ＦおよびＹ９６Ｆ（２Ｆ２．Ｄ７変異）（配列番号１８）。

【０８５４】
選択クローンは、ＦＡＣＳによる分析にはＦａｂとして、そしてＢｉａｃｏｒｅおよびスキャッチャードによるさらなる分析にはＩｇＧとして再構成した。

【０８５５】
ａ．親和性測定（Ｂｉａｃｏｒｅ分析）
Ｂｉａｃｏｒｅ分析を示している図１０に示されるとおり、このＣＤＲ修復アプローチによって、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体の親和性を回復するＨＶＲ－Ｌ３（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）における配列変化を特定した。表面プラズモン共鳴アッセイによって、Ｌ３における変化（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）は、Ｂｉａｃｏｒｅ分析で測定した場合、固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$または２Ｆ２についてのエピトープ（配列番号７８のアミノ酸１～１１）を含んでいる１６アミノ酸のペプチド（配列番号７８）に結合する場合ｃｈ２Ｆ２と同様の親和性を有した（図１０）ことが示された。

【０８５６】
ｂ．親和性測定（スキャッチャード分析）

スキャッチャード分析によって評価した場合、このＣＤＲ修復アプローチによって、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体の親和性を改善した配列変化が特定された。詳細には、この細胞結合アッセイによって、ｃｈ２Ｆ２および２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）（ＩｇＧとして再構成された）の親和性が、カニクイザルＣＤ７９ｂおよび内因性ヒトＣＤ７９ｂを安定に発現しているＢＪＡＢ細胞結合について、スキャッチャード分析によって測定した場合、それぞれ、１ｎＭ（ｃｈ２Ｆ２；Ｋｄ＝０．９９±０．２３ｎＭ）および２ｎＭ（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７；Ｋｄ＝２．０±０．５３ｎＭ）というＫｄ値を有することが示された。

【０８５７】

ｃ．結合測定（ＦＡＣＳ分析）

ＦＡＣＳ分析によって評価した場合、このＣＤＲ修復アプローチで、ＢＪＡＢ細胞に対する２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体（ｈｕ２Ｆ２グラフト）の結合を改善した配列変化が特定された（データ示さず）。詳細には、ＢＪＡＢ細胞に対するファージライブラリーから特定されたモノクローナルｈｕ２Ｆ２．Ｄ７（ＩｇＧ改変体）のＦＡＣＳ分析によって、ＢＪＡＢ細胞に対するｈｕ２Ｆ２．Ｄ７改変体の結合が示された（データ示さず）。

【０８５８】

Ｂ．２Ｆ２抗体のヒト化の考察

６つのマウス２Ｆ２のＨＶＲのグラフト（位置２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、２６～３５（Ｈ１）、４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２（Ｈ３）として定義）から出発して、ヒトコンセンサスκＩＶＬおよびサブグループＩＩＩＶＨ（Ａ７１、Ｔ７３およびＡ７８を含有している）までＣＤＲ修復を用いて、結合親和性を改善するＨＶＲの１～６の変化を特定した。図１０で特定されたＨＶＲの配列変化によって、ｃｈ２Ｆ２と類似の親和性を有する２Ｆ２ヒト化改変体がもたらされた。

【０８５９】

（実施例２）

抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の作製

２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体のＩｇＧ改変体の有効性を試験するために、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体を、ＤＭ１などの薬物にコンジュゲートした。ＤＭ１にコンジュゲートされる改変体は、ＨＶＲ－Ｌ３の変化を有する改変体を含んだ。

【０８６０】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の作製のために用いられる薬物としてはメイタンシノイドＤＭ１が挙げられ、ドラスタチン１０誘導体モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）およびモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）を含んでもよい。（米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号；米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号；Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．，１７：１１４～１２３（２００６））、ＤＭ１，ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦは、ＮＨＬの化学療法処置で用いられるビンカアルカロイドインヒビターよりも少なくとも１００倍細胞毒性である有糸分裂インヒビターである（その全てが全体として出典明記によって本明細書に援用されている、Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．，１７：１１４～１２３（２００６）；Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２１：７７８～７８４（２００３）；Ｅｒｉｃｋｓｏｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６６：４４２６～４４３３（２００６））。ＡＤＣの作製に有用なリンカーは、ＤＭ１については、ＢＭＰＥＯ、ＳＰＰまたはＳＭＣＣ（本明細書においては「ＭＣＣ」とも呼ばれる）、およびＭＭＡＥおよびＭＭＡＦについてはＭＣまたはＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢである。ＤＭ１については、抗体は、ＤＭ１のチオ基に、およびリンカー試薬ＳＭＣＣを用いてリジンのε－アミノ基を通じて連結された。あるいは、ＤＭ１については、この抗体は、ＳＰＰリンカーを用いてリジンのｅ－アミノ基を通じてＤＭ１に連結されてもよい。ＳＰＰ（Ｎ－スクシンイミジル４－（２’－ピリジルジチオ）ペンタノエート）は、リジンのεアミノ基と反応してタンパク質上の反応性の２－ピリジルジフルフィドリンカーを残す。ＳＰＰリンカー類では、遊離のスルフィドラル（例えば、ＤＭ１）との反応の際に、ピリジル基が置換さ

れ、還元可能なジスルフィド結合を介して結合されたＤＭ１が残る。ＳＰＰリンカーを介して結合したＤＭ１は、還元条件下で（すなわち、例えば、細胞内で）遊離されるが、ＳＭＣＣリンカーを介して結合したＤＭ１は、還元条件における切断に対して耐性である。さらに、ＳＭＣＣ－ＤＭ１のＡＤＣは、このＡＤＣが内部移行され、細胞の内側で有効な抗有糸分裂剤であるリジン－Ｎ$^{\varepsilon}$－ＤＭ１の遊離を生じるリソソームに対して標的される場合、細胞毒性を誘発し、そして細胞から遊離された場合、リジン－Ｎ$^{\varepsilon}$－ＤＭ１は非毒性である（Ｅｒｉｃｋｓｏｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６６：４４２６～４４３３（２００６））。ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦに関しては、抗体は、マレイミドカプロイル－バリン－シトルリン（ｖｃ）－ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ）によってシステインを通じてＭＭＡＥまたはＭＭＡＦに連結されてもよい。ＭＭＡＦについては、この抗体は代替的に、マレイミドカプロイル（ＭＣ）リンカーによってシステインを通じてＭＭＡＦに連結されてもよい。ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢリンカーは、カテプシンＢなどの細胞内プロテアーゼによって切断可能であり、切断されたとき、遊離の薬物を放出する（Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２１：７７８～７８４（２００３））が、ＭＣリンカーは、細胞内プロテアーゼによる切断には耐性である。

【０８６１】

ＳＭＣＣ－ＤＭ１を用いる抗ＣＤ７９ｂについての抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号に記載の手順と同様に作製された。抗ＣＤ７９ｂ精製抗体は、５０ｍＭのリン酸カリウムおよび２ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）を含有している溶液中へ緩衝液交換された。ＳＭＣＣ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）をジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）に溶解して、抗体溶液に添加し、１０：１という最終のＳＭＣＣ／Ａｂモル比を得た。この反応を混合しながら室温で３時間進行させた。ＳＭＣＣ修飾抗体を引き続き、１５０ｍＭのＮａＣｌおよび２ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ６．０）を含む３５ｍＭのクエン酸ナトリウム中で平衡にしたＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム（Ｇ－２５）上で精製した。ＤＭＡに溶解したＤＭ１をＳＭＣＣ抗体調製物に添加して、１０：１というＤＭ１対抗体のモル比を得た。この反応を攪拌しながら室温で４～２０時間進行させた。ＤＭ１修飾抗体溶液を２０容積のＰＢＳでダイアフィルトレートして、未反応のＤＭ１を除き、無菌濾過して、４℃で保管した。代表的には、このプロセスを通じて４０～６０％の収率の抗体を達成した。この調製物はゲル濾過およびレーザー光散乱によって評価した場合、通常単量体が９５％を超えていた。ＤＭ１が２５２ｎｍで吸収最大であるので、抗体に結合した薬物の量は２５２ｎｍと２８０ｎｍとの示差的な吸収測定によって測定可能であった。代表的には薬物対抗体比は３～４であった。

【０８６２】

本明細書に記載される抗ＣＤ７９ｂ抗体についての抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、ＳＰＰ－ＤＭ１リンカーを用いて、米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号に記載される手順と同様に作製できる。抗ＣＤ７９ｂ精製抗体は、５０ｍＭのリン酸カリウムを含有する溶液に緩衝液交換して、２ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）ＳＰＰ（Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ）をＤＭＡに溶解し、抗体溶液に加えて、約１０：１という最終のＳＰＰ／Ａｂモル比を得たが、この正確な比は抗体の所望の薬物ローディングに依存した。１０：１の比によって通常、約３～４という薬物対抗体比が生じる。ＳＰＰを室温で３～４時間反応させる。ＳＰＰ修飾抗体を引き続き、１５０ｍＭのＮａＣｌおよび２ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ６．０）を含む３５ｍＭのクエン酸ナトリウムまたはリン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．４）中で平衡にしたＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム（Ｇ－２５）上で精製した。ＤＭＡに溶解したＤＭ１をＳＰＰ抗体調製物に添加して、１０：１というＤＭ１対抗体のモル比を得て、これによって抗体に対して利用可能なＳＰＰリンカーが３～４倍モル過剰になる。ＤＭ１との反応を攪拌しながら室温で４～２０時間進行させた。ＤＭ１修飾抗体溶液を２０容積のＰＢＳでダイアフィルトレートして、未反応のＤＭ１を除き、無菌濾過して、４℃で保管した。代表的には、このプロセスによって４０～６０％またはそれ以上の抗体収率が達成された。この抗体－薬物コンジュゲートは、ゲル

濾過およびレーザー光散乱によって評価した場合、通常単量体が９５％を超えている。結合した薬物の量はＳＭＣＣ－ＤＭ１コンジュゲートの調製について記載したとおり、２５２ｎｍと２８０ｎｍとの示差的な吸収測定によって測定される（上記）。

【０８６３】

ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ＭＭＡＥ，ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ（ｖｃ）－ＰＡＢ－ＭＭＡＥまたはＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ（ｖｃ）－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ薬物リンカー類を用いる本明細書に記載される抗ＣＤ７９ｂ抗体の抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）はまた、米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号に記載の手順と同様に作製してもよい。精製された抗ＣＤ７９ｂ抗体を５００ｍＭのホウ酸ナトリウムおよび５００ｍＭの塩化ナトリウム（ｐＨ８．０）に溶解し、さらに、過剰の１００ＭＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）で処理する。約３０分間の３７℃でのインキュベーション後、その緩衝液をＳｅｐｈａｄｅｘＧ２５樹脂での溶出によって交換して、１ｍＭのＤＴＰＡを含有するＰＢＳで溶出する。チオール／Ａｂ値は、溶液の２８０ｎｍでの吸光度から還元された抗体濃度を測定すること、ならびにＤＴＮＢ（Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）との反応によるチオール濃度および４１２ｎｍでの吸光度の測定によってチエックする。この還元された抗体をＰＢＳに溶解して氷上で冷却した。薬物リンカー、例えば、ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ（ｖｃ）－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ（ＤＭＳＯ中）をアセトニトリルおよび水に溶解して、ＰＢＳ中の冷却して還元した抗体に添加する。１時間のインキュベーション後、過剰のマレイミドを添加して反応物をクエンチして未反応の抗体のチオール基をキャッピングする。その反応混合物を超遠心分離によって濃縮して、抗体薬物コンジュゲートを精製し、ＰＢＳ中のＧ２５樹脂を通した溶出によって脱塩し、無菌条件下で０．２μｍのフィルターを通して濾過し、貯蔵のため凍結する。

【０８６４】

抗体薬物コンジュゲート（本明細書に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体を用いる）をアッセイ培地中で２×１０μｇ／ｍｌに希釈した。コンジュゲートを架橋剤ＳＭＣＣと連結した（代用のジスルフィドリンカーをＳＰＰについてメイタンシノイドＤＭ１毒素に対して用いてもよい）（米国特許出願公開第２００５／０２７６８１２号および米国特許出願公開第２００５／０２３８６４９号）。さらに、コンジュゲートをＭＣ－バリン－シトルリン（ｖｃ）－ＰＡＢまたはＭＣを用いてドラスチン１０誘導体、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）毒素またはモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）毒素（２００５年５月３１日出願、米国特許出願第１１／１４１，３４４号、および２００４年１１月５日出願、米国特許出願第１０／９８３，３４０号）に対して連結してもよい。陰性のコントロールとしてはＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）（抗ＨＥＲ２）ベースのコンジュゲート（ＳＭＣＣ－ＤＭ１またはＳＰＰ－ＤＭ１またはＭＣ－ｖｃ－ＭＭＡＥまたはＭＣ－ｖｃ－ＭＭＡＦ）が挙げられた。陽性のコントロールとしては、コンジュゲートローディング用量に対して等しい遊離のＬ－ＤＭ１を挙げることができる。サンプルをボルテックスして、希釈の前に均一な混合を確実にした。

【０８６５】

薬物コンジュゲートの抗－ＣＤ７９ｂ抗体は、２Ｆ２キメラ抗体（実施例１Ａに記載）および本明細書にさらに記載される抗体を含み（実施例１を参照のこと）これにはｈｕ２Ｆ２．Ｄ７が含まれる。

【０８６６】

（実施例３）

インビボの腫瘍細胞殺傷アッセイ

Ａ．異種移植片

ＨＶＲ－Ｌ３（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７）に変化を有する２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体のＩｇＧ改変体の有効性を試験するため、ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７改変体をＤＭ１にコンジュゲートして、マウスでの腫瘍に対するこのコンジュゲートされた改変体の効果を分析した。

【０８６７】

詳細には、ＲＡＭＯＳ細胞、ＢＪＡＢ細胞（ｔ（２；８）（ｐ１１２；ｑ２４）（ＩＧ

Ｋ－ＭＹＣ）転位、変異型ｐ５３遺伝子を含むバーキットリンパ腫細胞株であって、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）陰性である）（Ｄｒｅｘｌｅｒ、Ｈ．Ｇ．，Ｔｈｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ－Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｆａｃｔｓ Ｂｏｏｋ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００１））、Ｇｒａｎｔａ ５１９細胞（サイクリンＤ１（ＢＣＬ１）の過剰発現を生じるｔ（１１；１４）（ｑ１３；ｑ３２）（ＢＣＬ１－ＩＧＨ）転位を含み、Ｐ１６ＩＮＫ４ＢおよびＰ１６ＩＮＫ４Ａ欠失を含み、ＥＢＶ陽性であるマントル細胞リンパ腫細胞株リンパ腫細胞株）（Ｄｒｅｘｌｅｒ、Ｈ．Ｇ．，Ｔｈｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ－Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｆａｃｔｓ Ｂｏｏｋ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００１））、Ｕ６９８Ｍ細胞（リンパ芽球性リンパ肉腫Ｂ細胞株；（Ｄｒｅｘｌｅｒ、Ｈ．Ｇ．，Ｔｈｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ－Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｆａｃｔｓ Ｂｏｏｋ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００１）およびＤｏＨＨ２細胞（Ｉｇ重鎖によって駆動されるＢｃｌ－２の過剰発現を生じる濾胞性リンパ腫ｔ（１４；１８）（ｑ３２；ｑ２１）の転位特徴を有し、Ｐ１６ＩＮＫ４Ａ欠失を有し、ｔ（８；１４）（ｑ２４；ｑ３２）（ＩＧＨ－ＭＹＣ）転位を含み、ＥＢＶ陰性である濾胞性リンパ腫細胞株）（Ｄｒｅｘｌｅｒ、Ｈ．Ｇ．，Ｔｈｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ－Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｆａｃｔｓ Ｂｏｏｋ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００１））を含んでいる複数の異種移植片モデルで、抗体が腫瘍を退行させる能力を検査してもよい。

【０８６８】

２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体の有効性の分析のために、雌性ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス（６～８週齢、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡから）を、ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウスの脇腹への注射によって2×10^{7}個のＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞またはＧｒａｎｔａ－５１９細胞を皮下に接種して、異種移植片腫瘍を平均２００mm^{2}まで増殖させた。０日目とは、下に特段示さない限り腫瘍が平均２００mm^{2}になった日および処置の初回／または唯一の用量が投与された時点を指す。腫瘍容積は、２次元を基に計算し、ノギスを用いて測定し、以下の式に従ってmm^{3}で表される：$V=0.5a\times b^{2}$（ここでａおよびｂはそれぞれ腫瘍の長径と短径である）。各々の実験群から採集したデータを平均±ＳＥとして表す。１０匹のマウス群を、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体またはコントロールの抗体－薬物コンジュゲートとともに、マウス$1\ m^{2}$あたり５０～２１０μｇの抗体結合した薬物の単回静脈内（ｉ．ｖ．）用量（マウス１ｋｇあたり約１～４ｍｇ／ｋｇに相当する）を用いて処置した。腫瘍は、この実験を通じて週に１回または２回のいずれか測定された。マウスの体重はこの実験を通じて週に１回または２回のいずれか測定された。マウスを腫瘍容積が３０００mm^{3}に達する前に、または腫瘍が切迫した潰瘍形成の徴候を示した時に、安楽死させた。全ての動物のプロトコールは、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）によって承認された。

【０８６９】

使用した抗体と毒素の間のリンカーは、ＤＭ１についてはチオエーテル架橋剤ＳＭＣＣであった。追加のリンカーとしては、ＤＭ１についてはジスルフィドリンカーＳＰＰまたはチオエーテル架橋剤ＳＭＣＣ、またはモノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）もしくはモノメチルアウリスタンＦ（ＭＭＡＦ）についてはマレイミド成分およびパラ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）自己犠牲成分を有するＭＣもしくはＭＣ－バリン－シトルリン（ｖｃ）－ＰＡＢまたは（バリン－シトルリン（ｖｃ））ジペプチドリンカー試薬）を挙げることができる。用いられる毒素はＤＭ１であった。追加の毒素としてはＭＭＡＥまたはＭＭＡＦを挙げることができる。

【０８７０】

この実験のためのＣＤ７９ｂ抗体としては、２００６年８月３日出願の米国特許出願番号第１１／４６２，３３６号に記載のキメラ２Ｆ２（ｃｈ２Ｆ２）抗体（実施例１Ａを参

照のこと）、および本明細書に記載の２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体（実施例１を参照のこと）が挙げられた。さらなる抗体としては、２００６年７月１１日にＰＴＡ－７７１２としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから作製された２Ｆ２抗体を挙げることができる。

【０８７１】

陰性コントロールとしてはＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）（抗ＨＥＲ２）に基づくコンジュゲート（ＳＭＣＣ－ＤＭ１）が挙げられた。

【０８７２】

Ｂ．結果

１．ＢＡＬＢ－ルシフェラーゼ異種移植片

３６日の時間経過で、ＤＭ１にコンジュゲートされた２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７改変体）（ＩｇＧとして再構成される）（およびキメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体（ｃｈ２Ｆ２）（それぞれ、ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびｃｈ２Ｆ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）は、陰性コントロールＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（抗ＨＥＲ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）に比較してＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ腫瘍を有するＳＣＩＤマウスで腫瘍増殖の阻害を示した。ＡＤＣは、全てのＡＤＣおよびコントロールについて０日目に単回用量（表７に示すとおり）で投与した。詳細には、ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１抗体（ＩｇＧとして再構成された）およびｃｈ２Ｆ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１は腫瘍増殖を有意に阻害した（図１９）。さらに、表７では、試験した総数のうち、ＰＲ＝部分的退行（ここでは投与後任意の時点で腫瘍容積は０日目に測定した腫瘍容積の５０％未満に低下した）またはＣＲ＝完全寛解（ここで投与後任意の時点で腫瘍容積は０ｍｍ^{3}に低下した）を示しているマウスの数を示している。

【０８７３】

【表７】

表7：SCIDマウスにおけるBJAB-Luc異種移植片（マウス1匹あたり二千万個の細胞）

投与された抗体（処置）	PR	CR	抗体の用量 (mg/kg)	薬物-DM1の用量 (μg/m^2)	薬物比 (薬物/抗体)
コントロールの抗HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	2	100	3.3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	1/10	2.3	100	3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	0/10	1.2	50	3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	1/10	2.9	100	2.3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	0/10	1.5	50	2.3

２．Ｇｒａｎｔａ－５１９（ヒトマントル細胞リンパ腫）異種移植片

１４日の時間経過において、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体改変体７（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７改変体）（ＩｇＧとして再構成した）（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）は、陰性コントロールであるＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（抗ＨＥＲ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）に比べてＧｒａｎｔａ－５１９腫瘍を用いてＳＣＩＤマウスで腫瘍増殖の阻害を示した。ＡＤＣは、全てのＡＤＣおよびコントロールについて０日目に単回用量で（表８に示すとおり）投与された。詳細には、ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１抗体（ＩｇＧとして再構成した）は腫瘍増殖を有意に阻害した（図２０Ａ）。

【０８７４】

さらに、ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびコントロールのＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（抗ＨＥＲ２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１）での処置は、マウスの体重パーセントの低下を生じなかった（図２０Ｂ）。なおさらに

、表８では、試験した１０匹のマウスの全数のうち、ＰＲ＝部分的退行（ここでは投与後任意の時点で腫瘍容積は０日目に測定した腫瘍容積の５０％未満に低下した）またはＣＲ＝完全寛解（ここで投与後任意の時点で腫瘍容積は０ｍｍ^{3}に低下した）を示しているマウスの数を示している。

【０８７５】

【表８】

表8：SCIDマウスにおけるGranta-519異種移植片（マウス1匹あたり二千万個の細胞）

投与された抗体（処置）	PR	CR	抗体の用量 (mg/kg)	薬物-DM1の用量 ($\mu g/m^2$)	薬物比（薬物/抗体）
コントロールの抗HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	206	3.4
hu2F2.D7-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	166	2.8

２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体ＡＤＣが異種移植片において腫瘍の進行を有意に阻害する能力に照らして、ＣＤ７９ｂ分子は、哺乳動物の腫瘍の治療のための優れた標的である場合があり、この腫瘍としては、Ｂ細胞関連のガン、例えば、リンパ腫（すなわち、非ホジキンリンパ腫）、白血病（すなわち、慢性リンパ球性白血病）、および他の造血系細胞のガンが挙げられる。さらに２Ｆ２移植型「ヒト化」ＡＤＣは、Ｂ細胞関連ガン、例えば、リンパ腫（すなわち、非ホジキンリンパ腫）、白血病（すなわち、慢性リンパ球性白血病）、および他の造血細胞のガンを含むインビボの腫瘍増殖を軽減するのに有用である。

【０８７６】

（実施例４）

ＣＤ７９ｂ抗体の共局在化

２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体および抗体改変体が細胞への内部移行の際にどこに送達されるかを確認するために、Ｂ細胞株に内部移行された抗ＣＤ７９ｂ抗体の共局在化研究をＲａｍｏｓ細胞株で評価してもよい。ＬＡＭＰ－１は後期エンドソームおよびリソソームのマーカーであり（Ｋｌｅｉｊｍｅｅｒら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１３９（３）：６３９～６４９（１９９７）；Ｈｕｎｚｉｋｅｒら、Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ，１８：３７９～３８９（１９９６）；Ｍｅｌｌｍａｎら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌｏｇｙ，１２：５７５～６２５（１９９６））、これには、後期エンドソーム／リソソーム様対応物であるＭＨＣクラスＩＩの対応物（ＭＩＩＣ類）が挙げられる。ＨＬＡ－ＤＭはＭＩＩＣ類のマーカーである。

【０８７７】

Ｒａｍｏｓ細胞を３７℃で３時間、１μｇ／ｍｌの２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体および抗体改変体、ＦｃＲブロック（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）および２５μｇ／ｍｌのＡｌｅｘａ６４７－トランスフェリン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）とともに、完全無炭酸培地（Ｇｉｂｃｏ）中で１０μｇ／ｍｌのロイペプチン（Ｒｏｃｈｅ）および５μＭのペプスタチン（Ｒｏｃｈｅ）とともにインキュベートして、リソソームの分解を阻害する。次いで、細胞を２回洗浄して、３％のパラホルムアルデヒド（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて室温で２０分間固定し、５０ｍＭのＮＨ４Ｃｌ（Ｓｉｇｍａ）でクエンチして、０．４％のサポニン／２％のＦＢＳ／１％のＢＳＡを用いて２０分間透過化処理し、次いで１μｇ／ｍｌのＣｙ３抗マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）とともに２０分間インキュベートする。次いで、この反応を２０分間、マウスＩｇＧ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）でブロックして、続いてＩｍａｇｅ－ｉＴ ＦＸ Ｓｉｇｎａｌ Ｅｎｈａｎｃｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）と３０分インキュベートする。細胞を最後は、リソソームおよびＭＩＩＣ（ＭＨＣクラスＩＩ経路の一部であるリソソーム様区画）の両方についてのマーカーであるＺｅｎｏｎ Ａｌｅｘａ４８８標識したマウス抗ＬＡＭＰ１（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、とともに２０分間インキュベートし、３％のＰＦＡを用いて後固定する。細胞を

２０μｌのサポニン緩衝液中に再懸濁して、ポリ－リジン（Ｓｉｇｍａ）コーティングしたスライドに固定させて、その後にＤＡＰＩ含有ＶｅｃｔａＳｈｉｅｌｄ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いてカバーガラスに装填する。ＭＩＩＣまたはリソソームの免疫蛍光のために、細胞を固定して、透過化し、上記のように増強し、次いで製造業者（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）に従いＺｅｎｏｎ標識Ａｌｅｘａ５５５－ＨＬＡ－ＤＭ（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）およびＡｌｅｘａ４８８－Ｌａｍｐ１を用いて過剰のマウスＩｇＧの存在下で同時染色する。

【０８７８】

従って、２Ｆ２移植型「ヒト化」抗体または抗体改変体とＭＩＩＣまたはＢ細胞株のリソソームとの共局在化によって、免疫蛍光によって評価されるとおりこの分子が哺乳動物においてＢ細胞関連のガン、例えば、リンパ腫（すなわち、非ホジキンリンパ腫）、白血病（すなわち、慢性リンパ球性白血病）、および他の造血細胞のガンを含む腫瘍の治療のための優れた薬剤として示され得る。

【０８７９】

（実施例５）

システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製

システイン操作された抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製は本明細書に開示されるとおり行った。

【０８８０】

ｃｈ２Ｆ２抗体をコードするＤＮＡ（軽鎖、配列番号４、図４；および重鎖、配列番号５、図５）は、この軽鎖および重鎖を改変するために本明細書で開示された方法によって突然変異誘発されてもよい。

【０８８１】

ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７抗体をコードするＤＮＡ（重鎖（配列番号９０）および軽鎖（配列番号８９）、図１３）を、本明細書に開示される方法によって突然変異誘発して、重鎖を改変した。ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７抗体をコードするＤＮＡ（重鎖、（配列番号９０）図１３）も、本明細書に開示される方法によって突然変異誘発して重鎖のＦｃ領域を修飾してもよい。

【０８８２】

システイン操作した抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製では、図１８に示されるように、軽鎖中のＫａｂａｔの位置２０５（連続位置２１０）のバリンをシステインで置換して軽鎖をコードするＤＮＡを突然変異誘発した（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７チオ ＭＡｂの軽鎖配列番号８８）。重鎖をコードするＤＮＡを、図１７に示されるように、突然変異誘発して重鎖のＥＵ位置１１８（連続位置１１８：Ｋａｂａｔ番号１１４）でアラニンをシステインで置換した（ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７チオ ＭＡｂの重鎖配列番号８５）。抗ＣＤ７９ｂ抗体のＦｃ領域を、表２～３に示されるように突然変異誘発して、重鎖Ｆｃ領域のＥＵ位置４００（連続位置４００；Ｋａｂａｔ番号３９６）でセリンをシステインで置換してもよい。

【０８８３】

Ａ．還元および再酸化によるコンジュゲーションのためのシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製

全長のシステイン操作抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体（ＴｈｉｏＭａｂ）は、ＣＨＯ細胞で発現され、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィで精製され続いてサイズ排除クロマトグラフィされた。この精製された抗体を５００ｍＭのホウ酸ナトリウムおよび５００ｍＭの塩化ナトリウム中で、ｐＨ約８．０で再構成して、約５０～１００倍モル過剰の１ｍＭのＴＥＣＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩；Ｇｅｔｚら（１９９９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第２７３巻：７３～８０；Ｓｏｌｔｅｃ Ｖｅｎｔｕｒｅｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）を用いて、３７℃で約１～２時間還元する。還元されたＴｈｉｏＭａｂを希釈して、１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５）中でＨｉＴｒａｐ Ｓカラムにロードして、０．３Ｍの塩化ナトリウムを含有しているＰＢＳで希釈する。この溶出された還元されたＴｈｉｏＭａｂを２ｍＭのデヒドロアスコルビン酸（ｄｈＡＡ）を用いてｐＨ７で３時間、または２ｍＭの硫酸銅水溶液（$CuSO_4$）を用いて室温

で一晩処理する。外気酸化も有効である場合がある。この緩衝液をＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５樹脂上で溶出することによって交換し、１ｍＭのＤＴＰＡを含むＰＢＳで溶出する。チオール／Ａｂ値を、溶液の２８０ｎｍでの吸光度から還元された抗体濃度を決定すること、ならびにＤＴＮＢ（Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）との反応および４１２ｎｍでの吸光度の決定によってチオール濃度を決定することによって、推定する。

【０８８４】

（実施例６）

システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体および薬物リンカー中間生成物のコンジュゲーションによるシステイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲートの調製

実施例５の還元および再酸化の手順後、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体をＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水）緩衝液中で再構成して、氷上で冷却する。マレイミドなどのチオール反応性官能基を有する、アウリスタチン薬物リンカー中間生成物、例えば、ＭＣ－ＭＭＡＥ（マレイミドカプロイル－モノメチルアウリスタチン　Ｅ）、ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥまたはＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦの１抗体あたりの操作システインに対して約１．５モル等量をＤＭＳＯに溶解して、アセトニトリルおよび水に希釈し、冷却し、還元し、再酸化した抗体にＰＢＳ中で添加する。約１時間後、過剰のマレイミドを添加して反応をクエンチして、未処理の抗体チオール基にキャップする。この反応混合物を超遠心分離によって濃縮して、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲートを精製し、ＰＢＳ中でＧ２５樹脂を通す溶出によって脱塩し、無菌条件下で０．２μｍのフィルターを通して濾過して、保管のために凍結する。

【０８８５】

ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）チオＭＡｂ－ＢＭＰＥＯ－ＤＭ１の調製は、以下のとおり行ってもよい。ｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）チオＭＡｂ上の遊離のシステインを、ビス－マレイミド試薬ＢＭ（ＰＥＯ）３（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）によって修飾して、抗体の表面上に未処理のマレイミド基を残す。これは、ＢＭ（ＰＥＯ）３を５０％のエタノール／水混合物中に１０ｍＭの濃度まで溶解すること、および１０倍モル過剰のＢＭ（ＰＥＯ）３を約１．６ｍｇ／ｍｌ（１０マイクロモル）の濃度のリン酸緩衝化生理食塩水中にｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）チオＭＡｂを含んでいる溶液に添加すること、およびこれを１時間反応させることによって達成される。過剰のＢＭ（ＰＥＯ）３を、１５０ｍＭのＮａＣｌ緩衝液を含む３０ｍＭのクエン酸塩（ｐＨ６）中でゲル濾過（ＨｉＴｒａｐカラム，Ｐｈａｒｍａｃｉａ）によって除去する。ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）中に溶解した約１０倍モル過剰のＤＭ１をｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）チオＭＡｂ－ＢＭＰＥＯ中間体に添加する。ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）も、薬物部分の試薬を溶解するために使用してもよい。この反応混合物をゲル濾過またはＰＢＳへの透析の前に一晩反応させて、未反応の薬物を取り除く。ＰＢＳ中のＳ２００カラム上のゲル濾過を用いて高分子量凝集物を除いて、精製されたｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）チオＭＡｂ－ＢＭＰＥＯ－ＤＭ１を得る。

【０８８６】

同じプロトコールによって、チオコントロールのｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＢＭＰＥＯ－ＤＭ１、チオコントロールのｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ、チオコントロールのｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥおよびチオコントロールの抗ＣＤ２２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦを作製してもよい。

【０８８７】

上記の手順によって、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体薬物コンジュゲート（ＴＤＣ）を、例えば、以下に限定するものではないが調製して試験してもよい：

１．Ａ１１８Ｃチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）およびＭＣ－ＭＭＡＦのコンジュゲーションによるチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ；

２．Ａ１１８Ｃチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）およびＢＭＰＥＯ－ＤＭ１のコンジュゲーションによるチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＢＭＰＥＯ－

ＤＭ１；
３．Ａ１１８Ｃチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）およびＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥのコンジュゲーションによるチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ；
４．チオｃｈ２Ｆ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）およびＭＣ－ＭＭＡＦのコンジュゲーションによるチオｃｈ２Ｆ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ；ならびに
５．チオｃｈ２Ｆ２－ＬＣ（Ｖ２０５Ｃ）およびＭＣ－ＭＭＡＦのコンジュゲーションによるチオｃｈ２Ｆ２－ＬＣ（Ｖ２０５Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ。

【０８８８】

（実施例７）

細胞表面抗原に対するシステイン操作チオＭＡｂ薬物コンジュゲートの結合親和性の特徴付け

ＢＪＡＢルシフェラーゼ細胞上で発現されるＣＤ７９ｂに対するチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７薬物コンジュゲートおよびチオｃｈ２Ｆ２薬物コンジュゲートの結合親和性をＦＡＣＳ分析によって確認する。

【０８８９】

要するに、１００μｌ中約1×10^{6}個の細胞を、限定するものではないが、以下の抗ＣＤ７９ｂチオＭａｂ薬物コンジュゲートまたは裸の（コントロールとしてのコンジュゲートされていないＡｂ）のうちの１つの種々の量（ＢＪＡＢルシフェラーゼ細胞の細胞百万個あたり１．０μｇ、０１．μｇまたは０．０１μｇのＡｂ）と接触させる：（１）チオｃｈ２Ｆ２－ＬＣ（Ｖ２０５Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦまたは（２）チオｃｈ２Ｆ２－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ；（３）チオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ、（４）チオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＢＭＰＥＯ－ＤＭ１、または（５）チオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ＭＭＡＦ。ＰＥコンジュゲートしたマウス抗ヒトＩｇを二次検出抗体として用いる（ＢＤカタログ番号５５５７８７）。

【０８９０】

細胞表面に結合した抗ＣＤ７９ｂ抗体をＰＥコンジュゲートしたマウス抗ヒトＩｇを用いて検出する。

【０８９１】

（実施例８）

抗ＣＤ７９ｂチオＭａｂ薬物コンジュゲートによるインビトロの細胞増殖減少についてのアッセイ

抗ＣＤ７９ｂチオＭＡｂ－薬物コンジュゲート（限定するものではないがチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣＭＭＡＦ、チオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥおよびチオｈｕ２Ｆ２．Ｄ７－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＢＭＰＥＯ－ＤＭ１を含む）のインビトロの力価を、細胞増殖アッセイ（例えばＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ、Ｇｒａｎｔａ－５１９、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞中で）によって測定する。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）発光細胞生存アッセイは市販されており（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、Ｃｏｌｅｏｐｔｅｒａのルシフェラーゼの組み換え発現に基づく均質アッセイ方法（米国特許第５５８３０２４号；米国特許第５６７４７１３号；米国特許第５７００６７０号）である。この細胞増殖アッセイによって、代謝的に活性な細胞の指標である、存在するＡＴＰの定量に基づく培養中の生きた細胞の数が決定される（Ｃｒｏｕｃｈら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏ．，１６０：８１～８８（１９９３）；米国特許第６６０２６７７号）。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）アッセイを９６ウェル形式で行って、自動化ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）に適合させる（Ｃｒｅｅら、ＡｎｔｉＣａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ，６：３９８～４０４（１９９５））。均質なアッセイ手順は、単一の試薬（Ｔｈｅ ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）試薬）を、血清補充培地中で培養した細胞に直接添加する工程を包含する。

【０８９２】
均質な「添加－混合－測定」の形式によって、細胞溶解および存在するＡＴＰの量に対して比例するルシフェラーゼシグナルの発生が得られる。基質である甲虫のルシフェリン（Ｂｅｅｔｌｅ　Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ）を、ＡＴＰからＡＭＰへの同時変換および光子の発生を伴う組み換えホタルルシフェラーゼによって酸化的に脱炭酸する。生きている細胞は相対ルシフェラーゼ量（ＲＬＵ）に反映される。データを照度計またはＣＣＤカメラ画像デバイスで記録してもよい。発光出力は経時的に測定されるＲＬＵとして表わされる。ＲＬＵの％は、「非薬物コンジュゲート」のコントロールに比較して正規化したＲＬＵ割合である。あるいは、発光からの光子は、発光物質の存在下でシンチレーションカウンターでカウントできる。発光量は次にＣＰＳ（１秒あたりのカウント）として提示され得る。

【０８９３】
チオＭＡｂ－薬物コンジュゲートの有効性は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ，Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ　ｂｕｌｌｅｔｉｎ　ＴＢ２８８；Ｍｅｎｄｏｚａら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６２：５４８５～５４８８（２００２））に適合した以下のプロトコールを使用する細胞増殖アッセイによって測定する：
１．約３０００個のＢＪＡＢ、Ｇｒａｎｔａ－５１９またはＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞を含んでいる培地中の細胞培養物の４０μｌのアリコートを、３８４ウェルの不透明な壁のプレートの各々のウェルに入れる。

【０８９４】
２．ＴＤＣ（チオＭａｂ薬物コンジュゲート）（１０μｌ）を１００００、３３３３、１１１１、３７０、１２３、４１、１３．７、４．６または１．５ｎｇ／ｍＬという最終濃度まで四連の実験ウェルに添加して、ここで「非薬物コンジュゲート」コントロールウェルには、培地単独を入れて、３日間インキュベートする。

【０８９５】
３．プレートを約３０分間室温と平衡にする。

【０８９６】
４．ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ試薬（５０μｌ）を添加する。

【０８９７】
５．この内容物をオービタルシェーカーで２分間混合して細胞の溶解をもたらす。

【０８９８】
６．このプレートを室温で１０分間インキュベートして発光シグナルを安定にする。

【０８９９】
７．発光を記録してグラフでＲＬＵ（相対発光量）％として報告する。薬物コンジュゲートなしの培地とインキュベートした細胞からのデータを０．５１ｎｇ／ｍｌでプロットする。

【０９００】
培地：ＢＪＡＢ、Ｇｒａｎｔａ－５１９およびＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞はＲＰＭＩ１６４０／１０％ＦＢＳ／２ｍＭグルタミン中で増殖。

【０９０１】
（実施例９）
抗ＣＤ７９ｂチオＭａｂ薬物コンジュゲートによるインビボ腫瘍増殖の阻害についてのアッセイ
同様の研究では、実施例３に開示される同じ異種移植片研究プロトコールを用いること（上記を参照のこと）、投与される薬物コンジュゲートおよび用量を変化させること、異種移植片モデル、例えば、Ｇｒａｎｔａ－５１９異種移植片（ヒトマントル細胞リンパ腫）、ＤＯＨＨ２（濾胞性リンパ腫）異種移植片、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２（びまん性大細胞型リンパ腫）異種移植片またはＢＪＡＢ（バーキットリンパ腫）異種移植片におけるＢ細胞腫瘍容積を軽減するのにおけるチオＭａｂ薬物コンジュゲートの有効性を研究する。

【０９０２】

前述の記載された明細書は、当業者が本発明を行うのに十分であるとみなされる。本発明は、寄託された構築物によって範囲を限定されるものではない。なぜなら寄託された実体は、本発明の特定の局面の単一の例示とみなされ、機能的に等価である任意の構築物が本発明の範囲内であるからである。本明細書の物質の寄託は、本明細書に含まれる記載の説明が、最良の形態を含んでいる本発明の任意の局面の実施を可能にするのに不十分であると認めるものではなく、それが提示する特定の例示に対して特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきでもない。実際、本明細書に示されかつ記載されるものに加えて本発明の種々の変形が、前述の説明から当業者には明らかになるであろうし、添付の特許請求の範囲内におさまる。

【図１】

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIG. 1

【図２】

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

シグナル配列
　アミノ酸 1-28.
膜貫通ドメイン
　アミノ酸 5-25, 159-179.
免疫グロブリンドメイン
　アミノ酸 58-124.
免疫レセプターチロシン-ベースの活性化モチーフ
　アミノ酸 193-213.
N-グリコシル化部位
　アミノ酸 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.
プロテインキナーゼCリン酸化部位
　アミノ酸 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.
カゼインキナーゼIIリン酸化部位
　アミノ酸 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.
チロシンキナーゼIIリン酸化部位
　アミノ酸 113-120.
N-ミリストイル化部位
　アミノ酸 40-45, 118-123.

FIG. 2

【図３】

キメラ抗ヒトCD79b (ch2F2) 軽鎖

GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTAT
TACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAGAGCGCCTAATTTATCTGGTGTCTAAACTGGATTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTGTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCG
GAGGGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIG. 3

【図４】

キメラ抗ヒトCD79b (ch2F2) 軽鎖

DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPERLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCCWQGTHFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 4

【図５】

キメラ抗ヒトCD79b (ch2F2) 重鎖

CAGGTTCAACTCCAGCAACCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATGATTGATCCTTCAGACAGTGAAACTCACTACAATCAT
ATCTTCAAGGACAAGGCCACTTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACTTGCAGCT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAATCTCTACTTGTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTTAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIG. 5

【図６】

キメラ抗ヒトCD79b (ch2F2)重鎖

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDSETHYNH
IFKDKATLTVDKSSSTAYLQLSSLTSEDSAVYYCARNLYLWGQGTSVTVSLASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

FIG. 6

【図７】

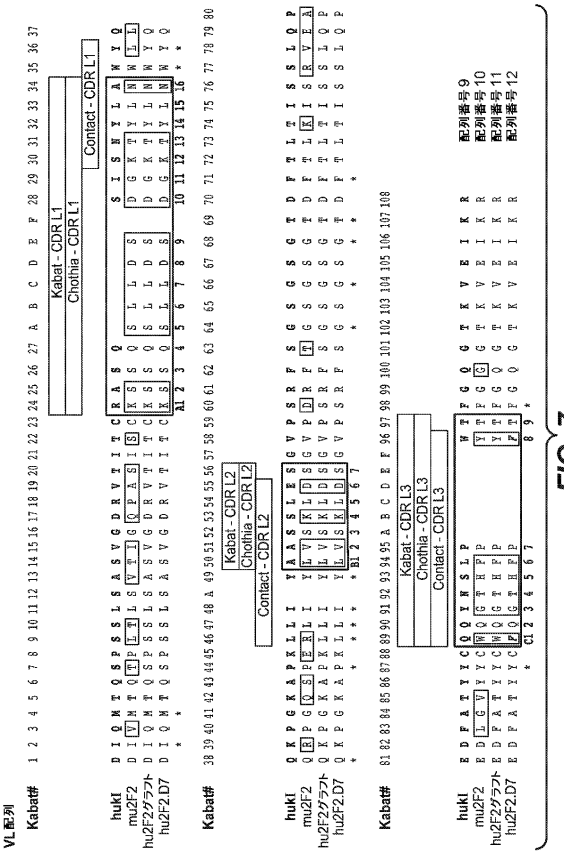


FIG. 7

【図８Ａ】

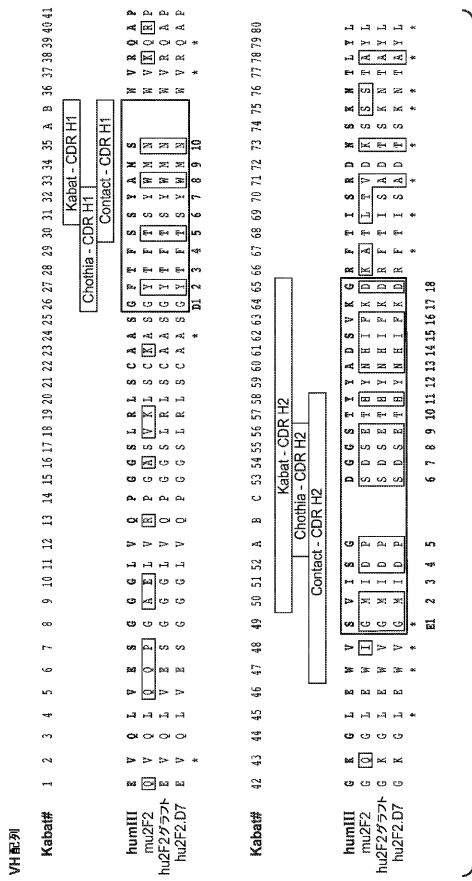


FIG. 8A

【図８Ｂ】

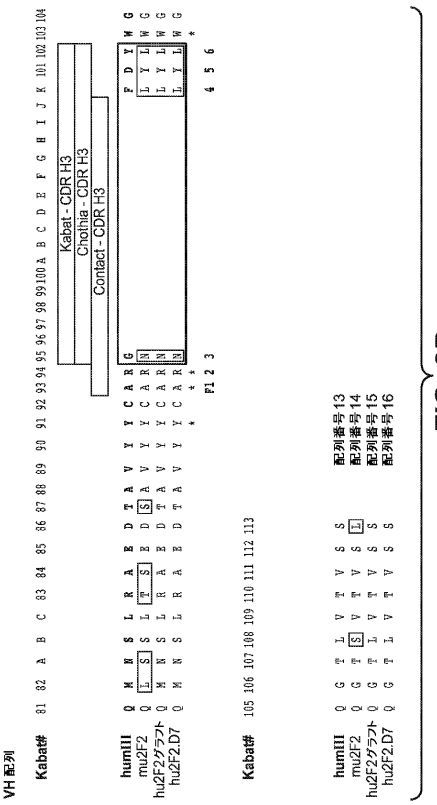


FIG. 8B

【図９】

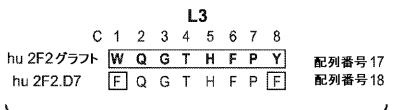


FIG. 9

【図１０】

	Biacore KD (nM)		
2F2 改変体	Fab	IgG	固定された抗原
ch 2F2	108	2.7	hu CD79b.ecd-Fc
	111	1.4	hu CD79b.ecd
		2	15マーペプチド
hu 2F2 グラフト	NB	NB	hu CD79b.ecd-Fc
		NB	hu CD79b.ecd
hu 2F2.D7	68	3.9	hu CD79b.ecd
		2.7	16マーペプチド

FIG. 10

【図１１Ａ】

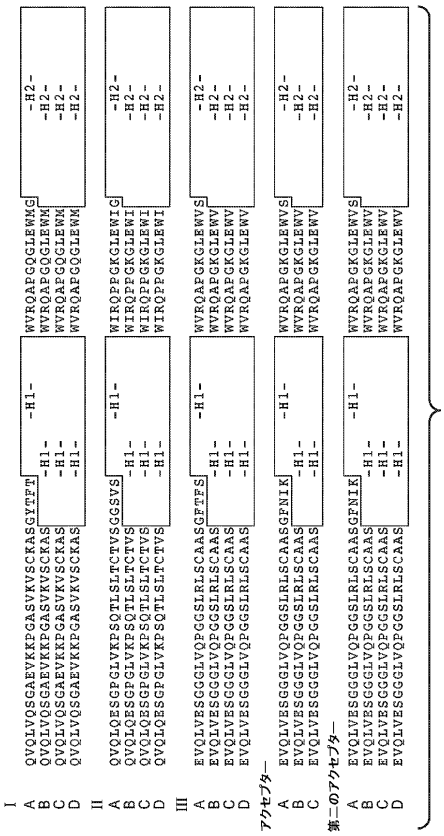


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

FIG. 11B

【図１２】

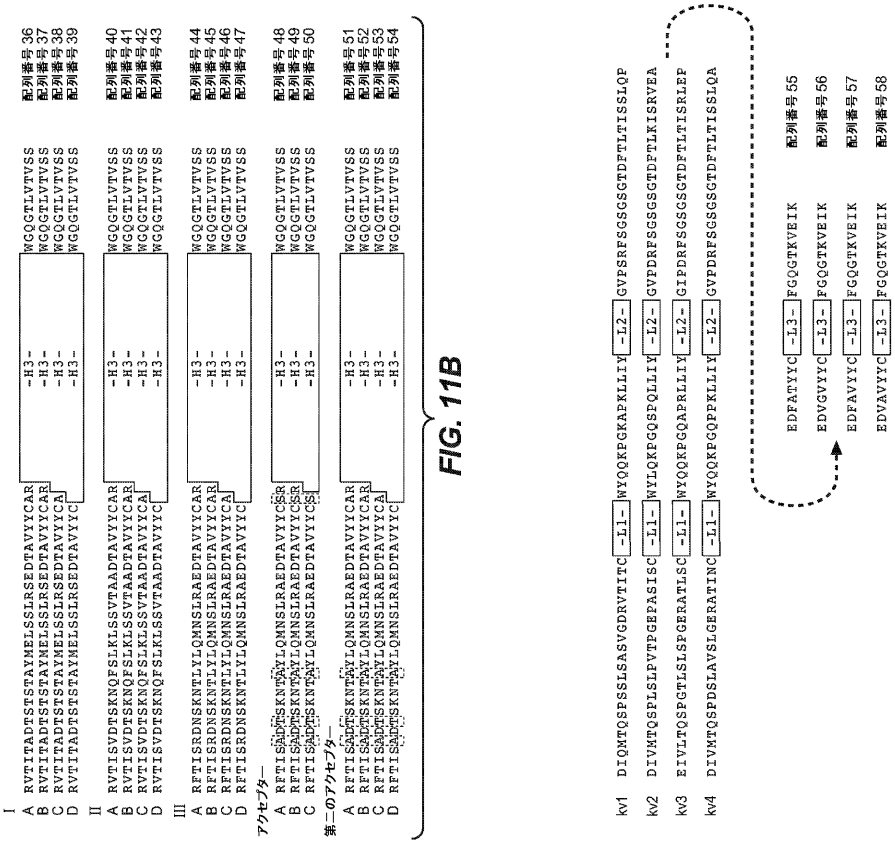


FIG. 12

【図１３】

A. hu2F2.D7 軽鎖

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号19)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号20)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号21)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (配列番号22)
HVR1-LC: KSSQSLLDSDGKTYLN (配列番号23)
HVR2-LC: LVSKLDS (配列番号24)
HVR3-LC: FQGTHFPFT (配列番号25)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(配列番号26)

軽鎖:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号89)

LC-可変ドメイン:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKR (配列番号12)

B. hu2F2.D7 重鎖

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号27)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (配列番号28)
FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号29)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (配列番号30)
HVR1-HC: GYTFTSYWMN (配列番号31)
HVR2-HC: GMIDPSDSETHYNHIFKD (配列番号32)
HVR3-HC: ARNLYL (配列番号33)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(配列番号34)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(配列番号35)

重鎖:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(配列番号90)

HC-可変ドメイン:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSS (配列番号16)

FIG. 13

【図１４】

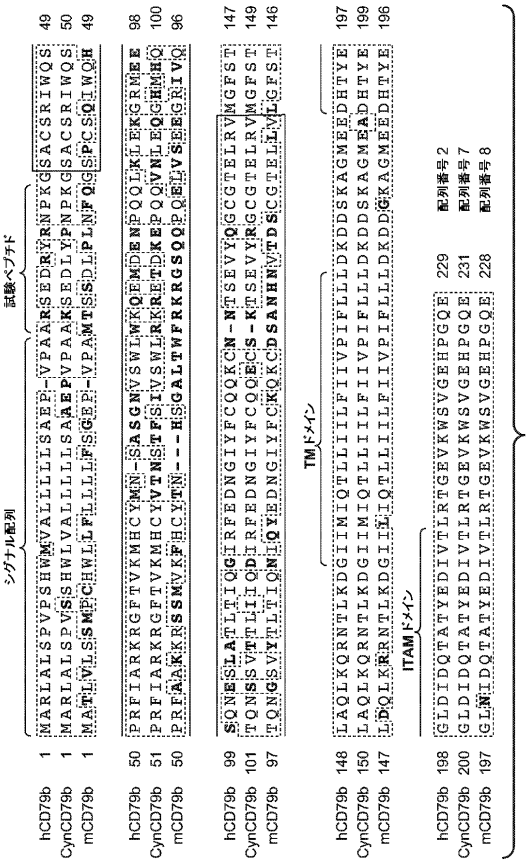


FIG. 14

【図１５】

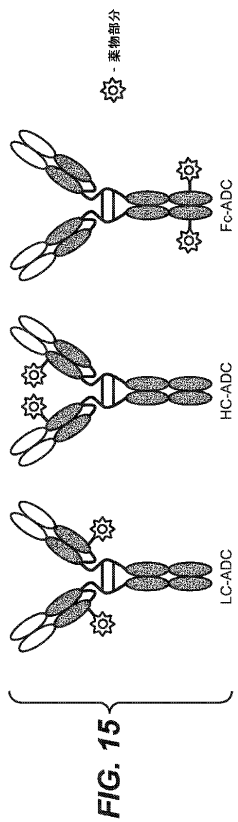


FIG. 15

【図１６】

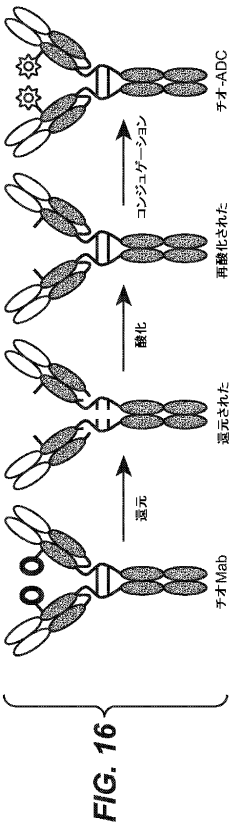


FIG. 16

【図１７】

抗CD79b A118C hu2F2.D7システイン操作された重鎖チオMAb

A. 軽鎖配列
チオ-hu2F2.D7-HC-A118C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号86）

B. 重鎖配列
チオ-hu2F2.D7-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
（配列番号85）

FIG. 17

【図１８】

抗CD79b V205C hu2F2.D7 システイン操作された軽鎖チオMAb

A. 軽鎖配列
チオ-hu2F2.D7-LC-V205C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC （配列番号88）

B. 重鎖配列
チオ-hu2F2.D7-LC-V205C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
（配列番号87）

FIG. 18

【図１９】

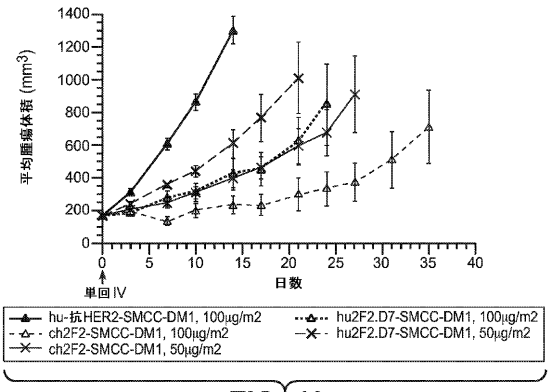


FIG. 19

【図２０】

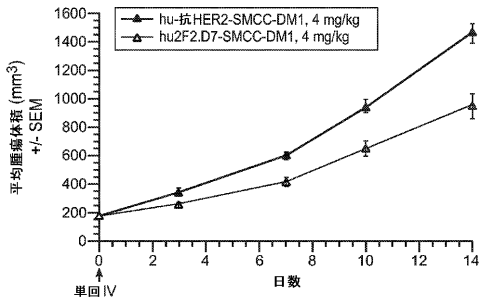


FIG. 20A

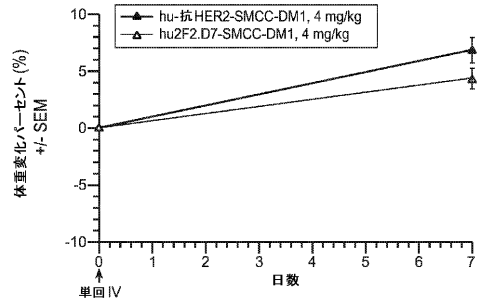


FIG. 20B

【配列表】
0006132357000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	C
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61P	35/02	
G01N	*33/536*	*(2006.01)*	A61K	39/395	T
G01N	*33/574*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D
			G01N	33/536	A
			G01N	33/574	A
			G01N	33/574	D

(72)発明者 マーク デニス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０７０, サン カルロス, プリマウス アベニュー １２０
(72)発明者 クリスティ エルキンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１１０, サンフランシスコ, ボンビュー ストリート １４５ ナンバーエー
(72)発明者 ヤガス レディー ジャヌトュラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５５５, フレモント, テュペロ ストリート ３４３９１
(72)発明者 アンドリュー ポルソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１１５, サンフランシスコ, バークリー ウェイ ２８１
(72)発明者 チェン ビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０４０, マウンテン ビュー, モンテレナ コート １５６

審査官 厚田 一拓

(56)参考文献 国際公開第２００５／１１７９８６（WO, A1）
国際公開第２００６／０３４４８８（WO, A1）
国際公開第９９／０４２０７５（WO, A1）
国際公開第２００４／００６９５５（WO, A1）
Blood, ２００７年 3月２０日, Vol.110, No.2, p.616-623
蛋白質 核酸 酵素, １９９８年 2月 1日, Vol.43, No.2, p.159-167

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０
Ｃ０７Ｋ １６／００ － １６／４６
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）