

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5358187号
(P5358187)

(45) 発行日 平成25年12月4日(2013.12.4)

(24) 登録日 平成25年9月6日(2013.9.6)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
請求項の数 23 (全 105 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2008-545980 (P2008-545980)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成18年12月14日(2006.12.14)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2009-519716 (P2009-519716A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成21年5月21日(2009.5.21)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/062115		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02007/120334	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成19年10月25日(2007.10.25)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成21年12月8日(2009.12.8)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/751,081		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成17年12月15日(2005.12.15)	(72) 発明者	ゴードン, ナタニエル, シー,
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 950
(31) 優先権主張番号	60/793,980		08, キャンベル, シャープ コート
(32) 優先日	平成18年4月21日(2006.4.21)		1415
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリユビキチンを標的とする方法と組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リジン48-結合性ポリユビキチンに特異的に結合し、リジン63-結合性ポリユビキチン及びモノユビキチンに特異的に結合しない単離された抗体であって、

それぞれ配列番号：265-279；配列番号：281-295；配列番号：297-311；及び配列番号：313-327；に示す、クローンapu01、apu02、apu03、apu04、apu05、apu06、apu07、apu08、apu09、apu10、apu11、apu12、apu13、apu14又はapu15のものに対応するHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3配列を含んでなり；かつ、配列番号：79のHVR-L1配列および配列番号：80のHVR-L2配列を含んでなる、抗体。

10

【請求項2】

リジン48-結合性ポリユビキチンに特異的に結合し、リジン63-結合性ポリユビキチン及びモノユビキチンに特異的に結合しない単離された抗体であって、

それぞれ配列番号：695-704；配列番号：706-715；配列番号：717-726；及び配列番号：728-737；に示す、クローンapu2.01、apu2.02、apu2.03、apu2.04、apu2.05、apu2.06、apu2.07、apu2.08、apu2.09又はapu2.10のものに対応するHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3配列を含んでなり；かつ、配列番号：79のHVR-L1配列および配列番号：80のHVR-L2配列を含んでなる、抗体。

20

【請求項 3】

配列番号：269のHVR-H1配列、配列番号：285のHVR-H2配列、配列番号：301のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：317のHVR-L3配列を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号：701のHVR-H1配列、配列番号：712のHVR-H2配列、配列番号：723のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：734のHVR-L3配列を含んでなる、請求項2に記載の抗体。

10

【請求項 5】

リジン48-結合性ポリユビキチンとリジン63-結合性ポリユビキチンの双方に特異的に結合する単離された抗体であって、

該抗体はモノユビキチンに特異的に結合せず、該抗体は、リジン63-結合性ポリユビキチンに対する抗体の結合親和性と比較して、実質的に減少した結合親和性でリジン48-結合性ポリユビキチンに結合し、

それぞれ配列番号：329-336；配列番号：338-345；配列番号：347-354；及び配列番号：356-363；に示す、クローンapu17、apu18、apu19、apu20、apu21、apu22、apu23およびapu24のものに対応するHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3配列を含んでなり；かつ、配列番号：79のHVR-L1配列および配列番号：80のHVR-L2配列を含んでなる、抗体。

20

【請求項 6】

リジン48-結合性ポリユビキチンとリジン63-結合性ポリユビキチンの双方に特異的に結合する単離された抗体であって、

該抗体はモノユビキチンに特異的に結合せず、該抗体は、リジン63-結合性ポリユビキチンに対する抗体の結合親和性と比較して、実質的に減少した結合親和性でリジン48-結合性ポリユビキチンに結合し、

それぞれ配列番号：739-748；配列番号：750-759；配列番号：761-770；及び配列番号：772-781；に示す、クローンapu2.11、apu2.12、apu2.13、apu2.14、apu2.15、apu2.16、apu2.17、apu2.18、apu2.19およびapu2.20のものに対応するHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3配列を含んでなり；かつ、配列番号：79のHVR-L1配列および配列番号：80のHVR-L2配列を含んでなる、抗体。

30

【請求項 7】

配列番号：330のHVR-H1配列、配列番号：339のHVR-H2配列、配列番号：348のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：357のHVR-L3配列を含んでなる、請求項5に記載の抗体。

【請求項 8】

配列番号：739のHVR-H1配列、配列番号：750のHVR-H2配列、配列番号：761のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：772のHVR-L3配列を含んでなる、請求項6に記載の抗体。

40

【請求項 9】

配列番号：740のHVR-H1配列、配列番号：751のHVR-H2配列、配列番号：762のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：773のHVR-L3配列を含んでなる、請求項6に記載の抗体。

【請求項 10】

50

リジン 48-結合性ポリユビキチンとリジン 63-結合性ポリユビキチンの双方に特異的に結合する単離された抗体であって、

該抗体はモノユビキチンに特異的に結合せず、該抗体は、リジン 63-結合性ポリユビキチンに対する抗体の結合親和性と比較して、実質的に減少した結合親和性でリジン 48-結合性ポリユビキチンに結合し、

それぞれ配列番号：789-799；配列番号：801-811；及び配列番号：813-823；に示す、クローン apu3.01、apu3.02、apu3.03、apu3.04、apu3.05、apu3.06、apu3.07、apu3.08、apu3.09、apu3.10 および apu3.11 に記載のものに対応する HVR-H1、HVR-H2 および HVR-H3 配列を含んでなり；かつ、配列番号：79 の HVR-L1 配列、配列番号：80 の HVR-L2 配列および配列番号：777 の HVR-L3 配列を含んでなる、抗体。

10

【請求項 11】

配列番号：744 の HVR-H1 配列、配列番号：755 の HVR-H2 配列、配列番号：766 の HVR-H3 配列、配列番号：79 の HVR-L1 配列、配列番号：80 の HVR-L2 配列、および配列番号：777 の HVR-L3 配列を含んでなる、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号：795 の HVR-H1 配列、配列番号：807 の HVR-H2 配列、配列番号：819 の HVR-H3 配列、配列番号：79 の HVR-L1 配列、配列番号：80 の HVR-L2 配列、および配列番号：777 の HVR-L3 配列を含んでなる、請求項 10 に記載の抗体。

20

【請求項 13】

前記抗体がポリユビキチン化されたタンパク質に特異的に結合する、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 のいずれかに記載の抗体をコードする核酸分子。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

30

【請求項 17】

請求項 1 から 13 のいずれかに記載の抗体を産生することができる細胞株。

【請求項 18】

抗体が産生される条件下で抗体をコードする核酸分子を含んでなる宿主細胞を培養することを含んでなる、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の抗体の産生方法。

【請求項 19】

請求項 1 から 13 のいずれかに記載の少なくとも一の抗体と試料を接触させることを含んでなる、試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化されたタンパク質の存在を同定する方法。

40

【請求項 20】

ポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質を含有すると思われる試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該試料を請求項 1 から 13 のいずれかに記載の少なくとも一の抗体に曝し、そして、試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質への少なくとも一の抗体の結合を決定することを含んでなる方法。

【請求項 21】

試料を請求項 1 から 13 のいずれかに記載の少なくとも一の抗体と試料を接触させることを含んでなる、試料中の非ポリユビキチン化タンパク質からポリユビキチン化タンパク質を分離する方法。

50

【請求項 2 2】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一に記載の少なくとも一の抗体を含んでなる、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一に記載の方法に使用するためのキット。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一に記載の抗体の抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、抗ポリユビキチン抗体の分野、および特にモノユビキチンに特異的に結合せず、異なるイソペプチド結合を有するポリユビキチンを区別することができる抗ポリユビキチン抗体に関する。

10

【0 0 0 2】

(背景)

ユビキチンは、多種多様な細胞経路において重要な調整の役割を有する小タンパク質である。中でもタンパク質分解でのユビキチンの役割は最も周知であり、標的タンパク質にユビキチンが共有結合するとその標的タンパク質が 2 6 S のプロテアソームによって認識され、破壊される (Wilkinson, Semin. Cell Devel. Biol. 11(3): 141-148 (2000) を参照)。様々なシグナル伝達経路のプロテインキナーゼ制御はユビキチン化とも相関している (Sun and Chen, Curr. Opin. Cell Biol. 16: 119-126 (2004) を参照)。例えば、I κ B キナーゼによる I κ B のリン酸化により、I κ B のユビキチン化とその後の 2 6 S のプロテアソームによる分解が促される；I κ B は N K κ B のインヒビターであるので、I κ B の分解は N K κ B を活性化する (Ghosh and Karin, Cell 109 (Suppl.): S81-S96 (2002) ; Palombella 等, Cell 78: 773-785 (1994))。また、ユビキチン化は D N A 修復を媒介する (Sun and Chen, Curr. Opin. Cell Biol. 16: 119-126 (2004) を参照)。D N A が損傷されると、増殖性細胞核抗原 (P C N A) のモノユビキチン化により、D N A が破壊されていても D N A を合成することができる損傷耐性ポリメラーゼが活性化される (Stelter and Ulrich, Nature 425: 188-191 (2003))。ユビキチン化が伴うことが知られている他の生理学的なプロセスには、細胞分裂、細胞増殖、細胞移動、及びアポトーシス／細胞死が含まれる (Johnson, Nat. Cell Biol. 4: E295-E298 (2002) ; Pickart, Mol. Cell. 8: 499-504 (2001))。

20

30

【0 0 0 3】

標的タンパク質への 7 6 アミノ酸タンパク質であるユビキチンの共有結合は、3-工程酵素法である (Pickart, Annu. Rev. Biochem. 70: 503-533 (2001))。第一に、ユビキチン-活性化酵素 E 1 は、A T P 依存性反応においてユビキチン-E 1 チオエステルを形成する。第二工程において、ユビキチンは、ユビキチン-E 1 チオエステルから、ユビキチンコンジュゲート酵素 (E 2) ファミリのメンバーに転移される。第三工程では、ユビキチン-プロテインリガーゼ (E 3) の援助により、ユビキチンのカルボキシル末端と標的タンパク質上のリジン残基の ϵ アミノ基との間にイソペプチド結合が形成される。デユビキチナーゼと呼ばれる酵素は標的タンパク質からユビキチン部分を取り除く (Guterman and Glickman, Curr. Prot. Pep. Sci. 5: 201-210 (2004))。重要な制御分子としてのユビキチンの役割に注目すると、ヒトゲノムはユビキチン化又は脱ユビキチン化に参与する多くの異なるタンパク質を有する。今までのところ少なくとも 4 0 の異なる E 2 s、5 0 0 の異なる E 3、及び 8 0 の異なるデユビキチナーゼが同定されている (Wong 等, Drug. Discov. Today 8: 746-754 (2003))。

40

【0 0 0 4】

ユビキチンは 7 つのリジン残基 (L y s 6、L y s 22、L y s 27、L y s 33、L y s 29、L y s 48 および L y s 63) を含有するため、ユビキチン自体がユビキチン化の標的タンパク質として役立ちうる (Peng 等, Nat. Biotechnol. 21: 921-926 (2003) ; Pickart and Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004))。ユビキチンタンパク質のユビキチ

50

ン化の際に産生される分子はポリユビキチン分子と呼ばれ、2以上のユビキチン成分を含みうる。ユビキチンのユビキチン化は理論的には7つのリジン残基のいずれかで生じており(Peng等, Nat. Biotechnol. 21: 921-926 (2003))、異なる種のポリユビキチンはユビキチン内の異なるリジン残基へのイソペプチド結合を有している。2つのユビキチン部分よりも大きな単一のポリユビキチン部分は1より多い種類のリジン連鎖を有する可能性がある。いくつかの研究から、E2酵素があるユビキチン分子と他のユビキチン分子との間で作製される種類のリジン連鎖に影響することが示されている(Tenno等, Genes to Cells 9: 865-875 (2004); Deng等 (2000); Hofmann and Pickart (2001))。ポリユビキチンおよびユビキチンは、遊離分子として存在するし、標的タンパク質と共有結合して存在する。

10

【0005】

ユビキチンのように、ポリユビキチンの関与は、細胞内輸送、エンドサイトーシス、遺伝子発現／サイレンシング、タンパク質分解、キナーゼ活性化、翻訳、及びDNA修復を含む多くの細胞性プロセスに見られる(Hoege等, Nature 419:135-141 (2002); Spence等, Mol. Cell. Biol. 15:1265-1273 (1995); Hofmann and Pickart, Cell 96: 645-653 (1999))。しかしながら、ポリユビキチンおよびポリユビキチン化は、同じ経路のモノユビキチン及びモノユビキチン化と著しく異なる生理学的役割を有しうる。例えば、DNA損傷後のPCNAのモノユビキチン化により誤りがちなDNAポリメラーゼの活性化が生じるのに対して、モノユビキチン化が観察される同定された残基でのPCNAのポリユビキチン化により誤りのないDNA修復が生じる(Stelter and Ulrich, Nature 425: 188-191 (2003); Hoege等, Nature 419:135-141 (2002); Spence等, Mol. Cell. Biol. 15:1265-1273 (1995); 及びHofmann and Pickart, Cell 96: 645-653 (1999))。

20

【0006】

さらに、異なるリジン連鎖を有するポリユビキチンは異なる生理学的役割を有するようである。最も研究されている2つはLys48-連鎖性とLys63-連鎖性のポリユビキチンであり、この2つの構造的な研究により、異なるリジン-連鎖性ポリユビキチンは著しく異なる立体構造を有しているため、選択した結合パートナーと異なる相互作用を可能にすることが示唆されている(Tenno等, Genes to Cells 9: 865-875 (2004))。典型的に、Lys48-連鎖性ポリユビキチンによる共有結合的修飾はタンパク質分解の標的タンパク質を明らかにするが、Lys48-連鎖性ポリユビキチンもタンパク質分解性でない方法で特定のタンパク質を調節するという証拠がいくつかある(Chau等, Science 243: 1576-1583 (1989); Finley等, Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick等, Nat. Cell. Biol. 6:634-641 (2004))。それに対して、Lys63-連鎖性ポリユビキチンは、DNA修復(K63R-ユビキチンを発現する酵母細胞はDNA修復を欠失する)、キナーゼ活性化、細胞内輸送、及び翻訳を含む様々な非タンパク質分解性の細胞内経路に関係している(Pickart and Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004); Hicke and Dunn, Annu Rev. Cell Dev. Biol. 19: 141-172 (2003); Spece等, Mol. Cell Biol. 15: 1265-1273 (1995); Ulrich, Eukaryot. Cell 1: 1-10 (2002); Spence等, Cell 102: 67-76 (2000); Seibenhener等, Mol. Cell. Biol. 24(18): 8055-8068 (2004))。ある具体例では、synphilin-1は通常、プロテアソーム非依存的な方法でパーキンによるK63-連鎖性ポリユビキチンにてユビキチン化されるが、synphilin-1は交互にK48-連鎖性ポリユビキチンによるユビキチン化による破壊の標的となりうる(Lim等, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005))。パーキンソン病患者の分析により、synphilin-1のK63-ポリユビキチン化がこの病気に関係するレビー小体封入対の形成に伴うことが示される(Lim等, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005))。

30

40

【0007】

他のリジン-連鎖性ポリユビキチンは、これらを区別することが難しいので、広範囲に大規模に研究されていない。今までの研究は、一又は複数のリジンが除去されている変異したユビキチンを発現する細胞、特定の結合の酵素的に合成したポリユビキチン、又はある種のポリユビキチンと他種のポリユビキチンとを区別するための質量分析法などの技術

50

に頼っている。これらの方法のそれぞれは、特定のリジン-連鎖性ポリユビキチンの正常な生理学的性質の分析に不相当であるか面倒なものである。モノユビキチンとは対照的にポリユビキチンに特異的である抗体が存在するのに対して(Fujimoro等, FEBS Lett. 349: 173-180 (1994))、異なるリジン連鎖のポリユビキチン間を区別することができる抗体はまだない。

【0008】

驚くべきことではないが、様々な細胞性プロセスに重要な役割があるので、ユビキチンおよびポリユビキチンも多くの疾患に関係していた(Argiles, Ubiquitin and Disease, R. G. Landes (1998)を参照)。筋消耗にユビキチン調節不全が観察される(Mitch and Goldberg, New Engl. J. Med. 335: 1897-905 (1996); Bodine等, Science 294: 1704-1708 (2001))。遺伝病の中には、嚢胞性線維症(Ward等, Cell 83: 121-127 (1995))、アンジェルマン症候群(Kishino等, Nature Genet. 15: 70-73 (1997))およびリデル症候群(Staub等, EMBO J 16: 6325-6336 (1997))を含む異常なユビキチン活性に関連しているものがある。また、ユビキチンは免疫及び炎症性の応答に役割がある。例えば、細胞外ユビキチンはサイトカインのような働きがあることが明らかになっており、末梢血単核細胞のエンドトキシンに対するTNF α 応答を阻害し、エンドトキシン応答性低下を制御する(Majetschhak等, Blood 101: 1882-1890 (2003); Ciechanover, EMBO J 17: 7151-7160 (1998))。また、ユビキチンとポリユビキチンはヒトの血清中に見られ、寄生虫病やアレルギー疾患を有する患者の血清では両分子のレベルが高い(Takada等, Clinical Chem. 43: 1188-1195 (1997))。

【0009】

また、いくつかのユビキチンが媒介する経路の調節不全は癌に関与する(Spataro等, Br. J. Cancer 77: 448-55 (1998); Beckmann等, Hum. Mutat. 25: 507-12 (2005))。例えば、ヘテロダイマーユビキチンリガーゼBRCA1-BARD1の突然変異は乳癌と関係しており(Hashizume等, J. Biol. Chem. 276: 14537-40 (2001))、ユビキチン経路によって分解されるMy cの能力を破壊する突然変異は、c-My cの発癌能力を活性化し(Salghetti等, EMBO J. 18: 717-726 (1999))、発癌性相関と関係のないものであるc-Junは制御されない増殖が生じるので、形質転換したv-Junはユビキチン化も分解もされない(Ciechanover, EMBO J. 17: 7151-7160 (1998); Trier等, Cell 78: 787-798 (1994))。

【0010】

ユビキチンおよびポリユビキチンは、特に神経学的疾患において研究されている(Chung等, TINS 24(11 Suppl.) S7-S14 (2001))。ハンチントン病、脊髄小脳失調症、プリオン脳症、ピック病、レビー小体病、パーキンソン病、及びアルツハイマー病に蓄積する封入対、小体、及び神経原線維変化は、モノ及び／又はポリユビキチンについて免疫陽性染色される(Alves-Rodrigues等, Trends Neurosci. 21: 516-520 (1998); Cammarata等, Neurosci Lett. 156: 96-98 (1993); Kalchman等, J. Biol. Chem. 271: 19385-94 (1996); Holmberg等, Human Mol. Genet. 7: 913-918 (1998); Yedidia等, EMBO J. 20: 5383-91 (2001); Mori等, Science 235: 1641-44 (1987); Leigh等, Acta Neuropathol. (Berl.) 79: 61-72 (1989); 及びKuzuhara等, Acta Neuropathologica 75: 345-353 (1988))。様々な形態のパーキンソン病は、デユビキチナーゼであるユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1(UCH-L1)の突然変異と関係していたのに対して(Leroy等, Nature 395: 451-452 (1998))、他の形態のパーキンソン病は、ユビキチンコンジュゲート酵素であるUb c H7と相互作用してsynphilin-1をユビキチン化することが知られているE2-依存性ユビキチン-タンパク質リガーゼであるパーキンの不活性化突然変異と関係していた(Shimura等, Nature Genet. 25: 302-305 (2000); Zhang等, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 13354-13359 (2000); Lim等, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005))。両タイプの突然変異により異常なタンパク分解性プロセッシングとタンパク質の不適切な凝集が生じる(McNaught等, Nature Rev. Neurosci. 2: 589-594 (2001)を参照)。また、UCH-L1突然変異は、ハンチントン舞踏病によって分かれることが明らかとなっている(Naze等, Neurosci. Lett.

328: 1: 1-4 (2002))。突然変異型のユビキチンはポリユビキチン鎖に高率に組み込まれているが、一度形成された脱ユビキチン化に抵抗性があるので、潜在的に正常な細胞性タンパク質分解性のプロセシング系を優位に阻害することが、アルツハイマー病の脳において同定された(Lam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9902-9906 (2000))。

【0011】

リジン連鎖が異なるポリユビキチン間を区別することができる組成物及び方法をいうだけでなく、ユビキチン及びポリユビキチンが媒介する経路を標的とする及び調節する際に有効な組成物及び方法を有することが有利であることは明らかである。本明細書において提供される本発明はこのような組成物および方法に関する。

【0012】

特許文献及び出版物を含む、本明細書中で引用したすべての参考文献は、その全体が出典明記によって援用される。

【0013】

(発明の概要)

本発明は、ポリユビキチンに結合する及び／又はポリユビキチンと関係する生物学的活性を制御することができる新規の抗体を提供する。

ある実施態様では、ポリユビキチンに特異的に結合し、モノユビキチンに特異的に結合しない単離された抗体が提供される。ある実施態様では、第一リジン連鎖が第二リジン連鎖と異なる場合に、第一リジン連鎖を含む第一ポリユビキチンを特異的に結合し、第二リジン連鎖を含む第二ポリユビキチンを特異的に結合しない単離された抗体を提供する。ある実施態様では、前記抗体はさらに、リジン6-連鎖性ポリユビキチン、リジン11-連鎖性ポリユビキチン、リジン27-連鎖性ポリユビキチン、リジン29-連鎖性ポリユビキチン、リジン33-連鎖性ポリユビキチン、リジン48-連鎖性ポリユビキチン、又はリジン63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する。

【0014】

ある実施態様では、第一K48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合し、ポリユビキチンの異なるリジン-連鎖性型(すなわち、K48-連鎖性ポリユビキチンでないもの)を含む第二ポリユビキチンを特異的に結合しない単離された抗体を提供する。ある実施態様では、前記第二ポリユビキチンがK63-連鎖性ポリユビキチンである。

ある実施態様では、第一K63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合し、ポリユビキチンの異なるリジン-連鎖性型(すなわち、K63-連鎖性ポリユビキチンでないもの)を含む第二ポリユビキチンを特異的に結合しない単離された抗体を提供する。ある実施態様では、前記第二ポリユビキチンがK48-連鎖性ポリユビキチンである。

【0015】

ある実施態様では、第一リジン連鎖を含む第一ポリユビキチンと第二リジン連鎖を含む第二ポリユビキチンをともに特異的に結合する単離された抗体であって、該第一リジン連鎖が第二リジン連鎖と異なり、該抗体はモノユビキチンを特異的に結合せず、該抗体は、第一ポリユビキチンに対する抗体の結合親和性と比較して、実質的に減少した結合親和性で第二ポリユビキチンを結合する抗体を提供する。

ある実施態様では、リジン48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合し、モノユビキチンを特異的に結合しない単離された抗体を提供する。ある実施態様では、前記抗体はさらに、それぞれ配列番号：1-25、151-175、265-279、392-459及び695-704；配列番号：27-51、177-201、281-295、461-528および706-715；配列番号：53-77、203-227、297-311、530-597および717-726；及び配列番号：313-327および728-737のいずれかのHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3及びHVR-L3から選択される少なくとも一の高頻度可変(HVR)配列を含んでなる。ある実施態様では、前記抗体はさらに、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、該HVR-H1がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j (配列番号：825)を含み、このときアミノ酸aがグリシンであり、アミノ酸bがフェニルアラ

10

20

30

40

50

ニンであり、アミノ酸 c がアスパラギンであり、アミノ酸 d がバリン、フェニルアラニン、ロイシンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸 e がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 f がチロシンであり、アミノ酸 g がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 h がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンおよびメチオニンから選択され、そしてアミノ酸 j がヒスチジンであり、該 HVR-H 2 がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z a' (配列番号：826) を含み、このときアミノ酸 k がセリンであり、アミノ酸 l がイソロイシンであり、アミノ酸 m がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 n がプロリンおよびセリンから選択され、アミノ酸 o がチロシンであり、アミノ酸 p がチロシンであり、アミノ酸 q がセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 r がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 s はスレオニンであり、アミノ酸 t はセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 u がチロシンであり、アミノ酸 v がアラニンであり、アミノ酸 w がアスパラギン酸であり、アミノ酸 x がセリンであり、アミノ酸 y がバリンであり、アミノ酸 z がリジンであり、そして、アミノ酸 a' がグリシンであり、該 HVR-H 3 がアミノ酸配列 b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' を含み、このときアミノ酸 b' がグルタミン酸、セリン、グリシンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 c' がグリシン、チロシン、セリンおよびアスパラギンから選択され、アミノ酸 d' がチロシン、セリン、リジン、フェニルアラニンおよびグルタミン酸から選択され、アミノ酸 e' がセリン、チロシン、グリシンおよびトリプトファンから選択され、アミノ酸 f' がグルタミン、チロシン、セリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 g' がグリシン、セリン、チロシン、メチオニンおよびアラニンから選択され、アミノ酸 h' がグリシン、アラニン、プロリンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸 i' がフェニルアラニン、イソロイシン、メチオニン、アラニンおよびロイシンから選択されるか又は存在せず、アミノ酸 j' がフェニルアラニンであるかまたは存在せず、アミノ酸 k' がアスパラギン酸であり、そして、アミノ酸 l' がチロシンである。ある実施態様では、前記抗体はさらに、図 10A および 10B のクローン apu01、apu02、apu03、apu04、apu05、apu06、apu07、apu08、apu09、apu10、apu11、apu12、apu13、apu14 又は apu15 に記載のものに対応する HVR-H 1、HVR-H 2 および HVR-H 3 配列を含んでなる。

【0016】

ある実施態様では、抗体は、HVR-H 1、HVR-H 2、HVR-H 3 から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、該 HVR-H 1 がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j (配列番号：827) を含み、このときアミノ酸 a がグリシンであり、アミノ酸 b がフェニルアラニンであり、アミノ酸 c がアスパラギンであり、アミノ酸 d がイソロイシンであり、アミノ酸 e がセリンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸 f がチロシンであり、アミノ酸 g がセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 h がセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンおよびメチオニンから選択され、そして、アミノ酸 j がヒスチジンであり、該 HVR-H 2 はアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z a' (配列番号：828) を含み、このときアミノ酸 k はセリンであり、アミノ酸 l がイソロイシンであり、アミノ酸 m がチロシンであり、アミノ酸 n がセリンであり、アミノ酸 o がチロシンであり、アミノ酸 p がチロシンであり、アミノ酸 q がセリンであり、アミノ酸 r がチロシンであり、アミノ酸 s はスレオニンであり、アミノ酸 t はセリンであり、アミノ酸 u がチロシンであり、アミノ酸 v がアラニンであり、アミノ酸 w がアスパラギン酸であり、アミノ酸 x がセリンであり、アミノ酸 y がバリンであり、アミノ酸 z がリジンであり、そしてアミノ酸 a' がグリシンであり、該 HVR-H 3 がアミノ酸配列 b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' (配列番号：829) を含み、このときアミノ酸 b' がセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 c' がチロシンであり、アミノ酸 d' がセリンであり、アミノ酸 e' がチロシンおよびトリプトファンから選択され、アミノ酸 f' がセリン、チロシン、アルギニン、フェニルアラニンおよびヒスチジンから選択され、アミノ酸 g' がグルタミン酸、セリン、ロイシン、フェニルアラ

ニン、メチオニン、アスパラギンおよびバリンから選択され、アミノ酸 h' がアラニンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 i' がロイシン、メチオニン、フェニルアラニンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸 j' がアスパラギン酸であり、そして、アミノ酸 k' がチロシンである。ある実施態様では、前記抗体はさらに、図 16 A のクローン a p u 2.01、a p u 2.02、a p u 2.03、a p u 2.04、a p u 2.05、a p u 2.06、a p u 2.07、a p u 2.08、a p u 2.09 又は a p u 2.10 に記載のものに対応する H V R-H 1、H V R-H 2 および H V R-H 3 配列を含んでなる。

【0017】

ある実施態様では、抗体はさらに、アミノ酸配列 m' n' o' p' q' r' s' t' u' v' w' (配列番号：830) を含む H V R-L 3 配列を含んでなり、このときアミノ酸 m' がグルタミンであり、アミノ酸 n' がグルタミンであり、アミノ酸 o' がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 p' がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 q' がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 r' がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 s' がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 t' がロイシン、セリン、プロリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 u' がプロリンであるかまたは存在せず、アミノ酸 v' がフェニルアラニン、イソロイシン、バリンおよびロイシンから選択され、そして、アミノ酸 w' がスレオニンである。ある実施態様では、抗体はさらに、配列番号：79 の H V R-L 1 配列、配列番号：80 の H V R-L 2 配列、および図 10 C のクローン a p u 01、a p u 02、a p u 03、a p u 04、a p u 05、a p u 06、a p u 07、a p u 08、a p u 09、a p u 10、a p u 11、a p u 12、a p u 13、a p u 14 又は a p u 15 に記載の H V R-L 3 配列に対応する H V R-L 3 配列を含んでなる。ある実施態様では、抗体はさらに、アミノ酸配列 Q-Q-S-S-Y-S-S-L-I-T (配列番号：728) を含む H V R-L 3 配列を含んでなる。ある実施態様では、配列番号：79 の H V R-L 1 配列、配列番号：80 の H V R-L 2 配列、および図 16 B のクローン a p u 2.01、a p u 2.02、a p u 2.03、a p u 2.04、a p u 2.05、a p u 2.06、a p u 2.07、a p u 2.08、a p u 2.09 又は a p u 2.10 に記載の H V R-L 3 配列に対応する H V R-L 3 配列を含んでなる。

【0018】

ある実施態様では、リジン 48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：269 の H V R-H 1 配列、配列番号：285 の H V R-H 2 配列、配列番号：301 の H V R-H 3 配列、配列番号：79 の H V R-L 1 配列、配列番号：80 の H V R-L 2 配列、および配列番号：317 の H V R-L 3 配列を含んでなる抗体を提供する。ある実施態様では、リジン 48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：701 の H V R-H 1 配列、配列番号：712 の H V R-H 2 配列、配列番号：723 の H V R-H 3 配列、配列番号：79 の H V R-L 1 配列、配列番号：80 の H V R-L 2 配列、および配列番号：734 の H V R-L 3 配列を含んでなる抗体を提供する。ある実施態様では、リジン 48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：701 の H V R-H 1 配列、配列番号：712 の H V R-H 2 配列、配列番号：723 の H V R-H 3 配列、配列番号：79 の H V R-L 1 配列、配列番号：80 の H V R-L 2 配列、および配列番号：734 の H V R-L 3 配列を含んでなる抗体を提供する。

【0019】

ある実施態様では、リジン 63-連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合し、モノユビキチンに特異的に結合しない単離された抗体を提供する。ある実施態様では、抗体はさらに、それぞれ配列番号：81-89、229-239、329-336、599-629、及び 739-748；配列番号：91-99、241-251；338-345、631-661、及び 750-759；配列番号：101-109、253-263、347-354、663-693、及び 761-770；及び配列番号：356-363 および 772-781 のいずれかの H V R-H 1、H V R-H 2、H V R-H 3 および H V R-L 3 か

10

20

30

40

50

ら選択される少なくとも一の高頻度可変性(HVR)配列を含んでなる。ある実施態様では、抗体は、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、該HVR-H1がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j (配列番号：831)を含み、このときアミノ酸aがグリシンであり、アミノ酸bがフェニルアラニンであり、アミノ酸cがアスパラギンであり、アミノ酸dがバリン、イソロイシンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸eがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸fがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸gがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸hがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸iがイソロイシンおよびメチオニンから選択され、そして、アミノ酸jがヒスチジンであり、該HVR-H2がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z' (配列番号：832)を含み、このときアミノ酸kはセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸lがイソロイシンであり、アミノ酸mがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸nがプロリンおよびセリンから選択され、アミノ酸oがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸pがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸qがセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸rがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸sはスレオニンであり、アミノ酸tはセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸uがチロシンであり、アミノ酸vがアラニンであり、アミノ酸wがアスパラギン酸であり、アミノ酸xがセリンであり、アミノ酸yがバリンであり、アミノ酸zがリジンであり、そして、アミノ酸a'がグリシンであり、該HVR-H3がアミノ酸配列 b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' s' t' u' v'を含み、このときアミノ酸b'がセリン、グルタミン酸、グリシンおよびトリプトファンから選択され、アミノ酸c'がグリシン、チロシン、イソロイシン、グルタミンおよびセリンから選択され、アミノ酸d'がチロシン、メチオニン、グリシンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸e'がチロシン、アルギニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニンおよびプロリンから選択され、アミノ酸f'がチロシン、トリプトファン、セリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸g'がグルタミン、チロシン、セリン、フェニルアラニンおよびバリンから選択され、アミノ酸h'がグリシン、スレオニン、トリプトファン、リジンおよびプロリンから選択され、アミノ酸i'がチロシン、アラニン、トリプトファン、グルタミン酸、プロリンおよびセリンから選択され、アミノ酸j'がトリプトファン、イソロイシン、チロシンおよびアラニンから選択され、アミノ酸k'がトリプトファン、チロシン、グリシンおよびアスパラギン酸から選択されるかまたは存在せず、アミノ酸l'がチロシン、セリン、フェニルアラニンおよびトリプトファンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸m'がチロシン、アスパラギン酸およびセリンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸n'がチロシンおよびアラニンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸o'がスレオニン、セリン、バリン、グリシンおよびチロシンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸p'がグリシン、アスパラギン酸、セリン、メチオニンおよびチロシンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸q'がチロシン、アラニンおよびグリシンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸r'がチロシン、ロイシンおよびグリシンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸s'がグリシンであるかまたは存在せず、アミノ酸t'がメチオニンおよびロイシンから選択されるかまたは存在せず、アミノ酸u'がアスパラギン酸であり、そしてアミノ酸v'がチロシンである。ある実施態様では、前記抗体はさらに、図11Aおよび11Bのクローンapu17、apu18、apu19、apu20、apu21、apu22、apu23およびapu24に記載のものに対応するHVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3配列を含んでなる。

【0020】

ある実施態様では、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、該HVR-H1がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j (配列番号：833)を含み、このときアミノ酸aがグリシンであり、アミノ酸bがフェニルアラニンであり、アミノ酸cがアスパラギンであり、アミノ酸dがイソロイシン、バリンおよびロイシンから選択され、アミノ酸eがセリン、リジンおよびバリンから選択さ

10

20

30

40

50

れ、アミノ酸 f がセリン、トリプトファン、グリシンおよびスレオニンから選択され、アミノ酸 g がセリン、アスパラギンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 h がチロシン、イソロイシン、ロイシンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンおよびメチオニンから選択され、そしてアミノ酸 j がヒスチジンであり、該 HVR-H 2 がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z a' (配列番号：834) を含み、このときアミノ酸 k がチロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ヒスチジンおよびアラニンから選択され、アミノ酸 l がイソロイシンであり、アミノ酸 m がセリン、アラニンおよびグルタミンから選択され、アミノ酸 n がプロリンであり、アミノ酸 o がチロシンであり、アミノ酸 p がロイシン、チロシンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸 q がセリンおよびグリシンから選択され、アミノ酸 r がセリン、スレオニンおよびトリプトファンから選択され、アミノ酸 s はスレオニンであり、アミノ酸 t はセリン、アスパラギン、リジンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸 u がチロシンであり、アミノ酸 v がアラニンであり、アミノ酸 w がアスパラギン酸であり、アミノ酸 x がセリンであり、アミノ酸 y がバリンであり、アミノ酸 z' がリジンであり、そしてアミノ酸 a' がグリシンであり、該 HVR-H 3 がアミノ酸配列 b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' (配列番号：908) を含み、このときアミノ酸 b' がグルタミン酸であり、アミノ酸 c' がチロシンであり、アミノ酸 d' がチロシンであり、アミノ酸 e' がアルギニンであり、アミノ酸 f' がトリプトファンであり、アミノ酸 g' がチロシンであり、アミノ酸 h' がスレオニンであり、アミノ酸 i' がアラニンであり、アミノ酸 j' がイソロイシンであり、アミノ酸 k' がアスパラギン酸であり、そしてアミノ酸 l' がチロシンである。ある実施態様では、前記抗体は、図 17A のクローン apu2.11、apu2.12、apu2.13、apu2.14、apu2.15、apu2.16、apu2.17、apu2.18、apu2.19 および apu2.20 に記載のものに対応する HVR-H1、HVR-H2 および HVR-H3 配列を含んでなる。

【0021】

ある実施態様では、抗体は、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3 から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、該 HVR-H1 がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j (配列番号：835) を含み、このときアミノ酸 a がグリシンであり、アミノ酸 b がフェニルアラニンであり、アミノ酸 c がアスパラギンであり、アミノ酸 d がイソロイシン、バリンおよびロイシンから選択され、アミノ酸 e がリジンおよびメチオニンから選択され、アミノ酸 f がスレオニン、メチオニン、アスパラギン、アルギニンおよびイソロイシンから選択され、アミノ酸 g がグリシン、バリンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸 h がチロシン、イソロイシン、ロイシンおよびフェニルアラニンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンおよびメチオニンから選択され、そしてアミノ酸 j がヒスチジンであり、該 HVR-H2 がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z a' b' (配列番号：836) を含み、このときアミノ酸 k がアラニンであり、アミノ酸 l がチロシンであり、アミノ酸 m がイソロイシンであり、アミノ酸 n がセリン、イソロイシンおよびスレオニンから選択され、アミノ酸 o がプロリンであり、アミノ酸 p がチロシンであり、アミノ酸 q がロイシン、チロシン、アスパラギン酸、セリンおよびトリプトファンから選択され、アミノ酸 r がグリシンであり、アミノ酸 s がトリプトファン、バリン、セリン、アスパラギン、アルギニンおよびチロシンから選択され、アミノ酸 t はスレオニンである、アミノ酸 u はアルギニン、アスパラギン、バリン、スレオニン、セリンおよびリジンから選択され、アミノ酸 v がチロシンであり、アミノ酸 w がアラニンであり、アミノ酸 x がアスパラギン酸であり、アミノ酸 y がセリンであり、アミノ酸 z がバリンであり、アミノ酸 a' がリジンであり、そしてアミノ酸 b' がグリシンであり、該 HVR-H3 がアミノ酸配列 c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' (配列番号：837) を含み、このときアミノ酸 c' がセリンであり、アミノ酸 d' がアルギニンであり、アミノ酸 e' がグルタミン酸であり、アミノ酸 f' がチロシンであり、アミノ酸 g' がチロシンであり、アミノ酸 h' がアルギニンであり、アミノ酸 i' がトリプトファンであり、アミノ酸 j' がチロシンであり、アミノ酸 k' がスレオニンであり、アミノ酸 l' がア

ラニンであり、アミノ酸m'がイソロイシンであり、アミノ酸n'がアスパラギン酸であり、そしてアミノ酸o'がチロシンである。ある実施態様では、前記抗体は、図23Aおよび23Bのクローンapu3.01、apu3.02、apu3.03、apu3.04、apu3.05、apu3.06、apu3.07、apu3.08、apu3.09、apu3.10および3.11に記載のものに対応するHVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3配列を含んでなる。

【0022】

ある実施態様では、抗体は、アミノ酸配列w'x'y'z'ABCDEFGHIを
含むHVR-L3配列を含んでなり、このときアミノ酸w'がグルタミンであり、アミノ酸
x'がグルタミンであり、アミノ酸y'がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸z'
'がセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸Aがセリンおよびチロシンから選択さ
れ、アミノ酸Bがセリンおよびチロシンから選択され、アミノ酸Cがプロリン、セリンお
よびロイシンから選択され、アミノ酸Dがセリン、プロリンおよびチロシンから選択され
るかまたは存在せず、アミノ酸Eがロイシンおよびフェニルアラニンから選択されるかま
たは存在せず、アミノ酸Fがフェニルアラニン、バリン、スレオニンおよびイソロイシン
から選択され、そして、アミノ酸Gがアルギニン、スレオニンおよびフェニルアラニンか
ら選択される。ある実施態様では、前記抗体は、配列番号：79のHVR-L1配列、配
列番号：80のHVR-L2配列、及び図11Cのクローンapu17、apu18、a
pu19、apu20、apu21、apu22、apu23およびapu24に記載の
HVR-L3配列に対応するHVR-L3配列を含んでなる。ある実施態様では、前記抗体
は、アミノ酸配列Q-Q-Y-S-S-Y-S-S-L-F-T(配列番号：772)を含むHVR-
L3配列を含んでなる。ある実施態様では、前記抗体は、配列番号：79のHVR-L1
配列、配列番号：80のHVR-L2配列、及び図17Bのクローンapu2.11、ap
u2.12、apu2.13、apu2.14、apu2.15、apu2.16、apu2.
17、apu2.18、apu2.19およびapu2.20に記載のHVR-L3配列に対
応するHVR-L3配列を含んでなる。ある実施態様では、前記抗体は、配列番号：79
のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：777のHV
R-L3配列に対応するHVR-L3配列を含んでなる。

【0023】

ある実施態様では、リジン63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された
抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：330のHVR-H1配
列、配列番号：339のHVR-H2配列、配列番号：348のHVR-H3配列、配列番
号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：35
7のHVR-L3配列を含んでなる抗体を提供する。ある実施態様では、リジン63-連鎖
性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチンを特異
的に結合せず、配列番号：739のHVR-H1配列、配列番号：750のHVR-H2配列
、配列番号：761のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：
80のHVR-L2配列、および配列番号：772のHVR-L3配列を含んでなる抗体を
提供する。ある実施態様では、リジン63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単
離された抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：740のHVR
-H1配列、配列番号：751のHVR-H2配列、配列番号：762のHVR-H3配列
、配列番号：79のHVR-L1配列、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番
号：773のHVR-L3配列を含んでなる抗体を提供する。ある実施態様では、リジン
63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチ
ンを特異的に結合せず、配列番号：744のHVR-H1配列、配列番号：755のHV
R-H2配列、配列番号：766のHVR-H3配列、配列番号：79のHVR-L1配列
、配列番号：80のHVR-L2配列、および配列番号：777のHVR-L3配列を含ん
でなる抗体を提供する。ある実施態様では、リジン63-連鎖性ポリユビキチンを特異
的に結合する単離された抗体であって、モノユビキチンを特異的に結合せず、配列番号：7
95のHVR-H1配列、配列番号：807のHVR-H2配列、配列番号：819のHV

R-H 3 配列、配列番号：79のHVR-L 1 配列、配列番号：80のHVR-L 2 配列、および配列番号：777のHVR-L 3 配列を含んでなる抗体を提供する。

【0024】

ある態様では、前記のいずれかの抗体と同じポリユビキチン上の同じ抗原決定基に結合する単離された抗体であり、モノユビキチンに特異的に特異的に結合しない。ある態様では、前記のいずれかの抗体とポリユビキチンへの結合について競合する単離された抗体であり、モノユビキチンに特異的に特異的に結合しない。

【0025】

ある態様では、前記いずれかの抗体はポリユビキチン化されたタンパク質に特異的に結合する。ある態様では、前記抗体はさらに、ポリユビキチン化されたタンパク質の分解を阻害する。ある態様では、前記抗体はさらに、少なくとも一のポリユビキチンが媒介するシグナル伝達経路を調節する。ある態様では、前記抗体はさらに、少なくとも一のポリユビキチンが媒介するシグナル伝達経路を阻害する。ある態様では、前記抗体はさらに、少なくとも一のポリユビキチンが媒介するシグナル伝達経路を刺激する。

【0026】

ある態様では、本発明の抗体をコードする核酸分子を提供する。ある態様では、前記核酸を含んでなるベクターを提供する。ある態様では、前記ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。ある態様では、本発明の抗体を産生することができる細胞株を提供する。ある態様では、抗体が産生される条件下で抗体をコードする核酸分子を含んでなる宿主細胞を培養することを含んでなる、本発明の抗体の産生方法を提供する。ある態様では、本発明の抗体の有効量と薬学的に受容可能な担体とを含有してなる組成物を提供する。

【0027】

ある態様では、試料を本発明の少なくとも一の抗体と接触させることを含んでなる、試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化されたタンパク質の存在を同定する方法を提供する。ある態様では、本発明の少なくとも一の抗体の有効量を患者に投与することを含んでなる、患者のポリユビキチンの調節不全に関連する疾患又は症状の治療のための方法を提供する。ある態様では、前記患者は哺乳類の患者である。ある態様では、前記患者はヒトである。ある態様では、前記疾患は、癌、筋疾患、ユビキチン経路関連の遺伝的疾患、免疫性／炎症性の疾患および神経学的疾患から選択される。ある態様では、前記疾患は、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、嚢胞性線維症、アンジェルマン症候群、リデル症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病およびパジェット病から選択される。

【0028】

ある態様では、ポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質を含有すると思われる試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該試料を本発明の少なくとも一の抗体に曝し、そして、試料中のポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質への少なくとも一の抗体の結合を決定することを含んでなる方法を提供する。

ある態様では、試料を本発明の少なくとも一の抗体と接触させることを含んでなる、試料中の非ポリユビキチン化タンパク質からポリユビキチン化タンパク質を分離する方法を提供する。

【0029】

ある態様では、細胞を本発明の少なくとも一の抗体と接触させ、そして、細胞に対する該接触工程の効果を評価することを含んでなる、細胞でのポリユビキチンの機能及び／又は活性を決定する方法を提供する。

ある態様では、試料を本発明の少なくとも一の抗体と接触させ、そして、細胞に対する該接触工程の効果を評価することを含んでなる、試料でのポリユビキチンの機能及び／又は活性を決定する方法を提供する。

【0030】

他の実施態様では、リジン-6 3 連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合し、該リジン-6

10

20

30

40

50

3連鎖性ポリユビキチンのエピトープに結合する単離された抗体を提供する。ある態様では、前記エピトープには、リジン-6 3連鎖性ポリユビキチンの第二ユビキチンサブユニットと第一ユビキチンサブユニットに残基が含まれる。他のこのような態様では、前記エピトープは、G l u - 1 8、P r o - 1 9、S e r - 2 0、A s p - 2 1、T h r - 5 5、L e u - 5 6、S e r - 5 7、A s p - 5 8、A s n - 6 0、I l e - 6 1、及びG l n - 6 2から選択される第一ユビキチンサブユニットに少なくとも一の残基を含む。他のこのような態様では、前記エピトープは、L e u - 8、T h r - 9、G l u - 3 4、G l y - 3 5、I l e - 3 6、P r o - 3 7、A s p - 3 9、G l n - 4 0、L e u - 7 1、A r g - 7 2、L e u - 7 3、A r g - 7 4、G l y - 7 5から選択される第二ユビキチンサブユニットに少なくとも一の残基を含む。他のこのような態様では、前記エピトープは、G l u - 1 8、P r o - 1 9、S e r - 2 0、A s p - 2 1、T h r - 5 5、L e u - 5 6、S e r - 5 7、A s p - 5 8、A s n - 6 0、I l e - 6 1、及びG l n - 6 2から選択される第一ユビキチンサブユニットに少なくとも一の残基と、L e u - 8、T h r - 9、G l u - 3 4、G l y - 3 5、I l e - 3 6、P r o - 3 7、A s p - 3 9、G l n - 4 0、L e u - 7 1、A r g - 7 2、L e u - 7 3、A r g - 7 4、及びG l y - 7 5から選択される第二ユビキチンサブユニットに少なくとも一の残基を含む。

10

【0031】

ある実施態様では、ユビキチン分子の第一アミノ酸位の第一リジン残基への少なくとも一のイソペプチド結合を含む第一ポリユビキチンに特異的に結合し、該抗体がユビキチン分子の第二アミノ酸位の第二リジン残基への少なくとも一のイソペプチド結合を含む第二ポリユビキチンに特異的に結合せず、このとき該第一および該第二のアミノ酸位が異なる、単離された抗体を提供する。本発明の抗体は多くの形態でありうる。例えば、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体でありうる。ある実施態様では、本発明の抗体はヒト抗体ではなく、例えばゼノマウスで産生された抗体ではない(例えば、国際公開第96/33735号に記載)。本発明の抗体は完全長又はその断片であってもよい(例えば、抗原結合成分を含む断片)。他の実施態様では、本発明は上記の抗体のいずれかの抗原結合断片を提供する。

20

【0032】

(発明を実施するための形態)

一般的技術

30

特に示さない限り、本発明の実施には、当業者の技量内にある分子生物学(組換え技術を含む)、細菌学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の一般的な技術を用いる。このような技術は、文献、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版(Sambrook等, 2001); 「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等編, 1987, 及び定期更新物); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullis等編, 1994); PCR2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor編(1995)); Harlow及びLane, 編 (1988 Antibodies, A Laboratory Manual; 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988; 及び「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas等, 2001)に十分に説明されている。

40

【0033】

定義

本明細書において使用する「ユビキチン」及び「モノユビキチン」という用語は互換可能に使用され、アミノ酸6、アミノ酸22、アミノ酸27、アミノ酸29、アミノ酸33、アミノ酸48、及び/又はアミノ酸63に少なくとも1のリジン残基を有する76アミノ酸タンパク質と実質的に同じ天然ヒト及び合成ユビキチンの全ての種と定義される。

本明細書において使用する「ポリユビキチン」という用語は、ユビキチンの異なる重合体連鎖のヒト及び合成クラスに含まれる天然ヒト及び合成のユビキチン重合体鎖として定義され、それらには、限定されるものではないが、K6連鎖性ポリユビキチン、K22連

50

鎖性ポリユビキチン、K 2 7連鎖性ポリユビキチン、K 2 9連鎖性ポリユビキチン、K 3 3連鎖性ポリユビキチン、K 4 8連鎖性ポリユビキチン及びK 6 3連鎖性ポリユビキチンが含まれる。ポリユビキチンは、どのような長さを有してもよく、少なくとも2のユビキチン部分を含む。ポリユビキチンは、元来一本鎖タンパク質として発現されるユビキチンのタンデムリピートとは区別される。

【0034】

本明細書において使用する「K＊-連鎖性ポリユビキチン」及び「L y s ＊連鎖性ポリユビキチン」という用語は互換可能であり、1のユビキチン部分のC末端と別のユビキチン部分の位置＊のリジンの間に少なくとも1のイソペプチド結合を含むポリユビキチン分子を指す。例えば、「K 6 3-連鎖性ポリユビキチン」は、「L y s 6 3-連鎖性ポリユビキチン」と互換可能に使用され、これらの用語はいずれも、分子中のユビキチン部分の一方のC末端と、他方のユビキチン部分の位置63のリジンの間にイソペプチド結合を含むポリユビキチン分子を指す。

10

【0035】

本明細書において使用する、第1リジン連鎖が第2リジン連鎖と「異なる」という表現は、1のユビキチン部分と別のユビキチン部分の間の第1リジン連鎖が、1のユビキチン部分と別のユビキチン部分の間の第2リジン連鎖とは異なるリジン残基（例えば、K 6、K 2 2、K 2 7、K 2 9、K 3 3、K 4 8、及び／又はK 6 3）を含むことを示唆する。

本明細書において使用する、「ユビキチン経路」という用語は、ユビキチン及び／又はポリユビキチンを含む細胞又は再構成されたインビトロ中の生化学的経路を指す。

20

【0036】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。一実施態様では、タンパク質は、(1)例えばローリー法で測定した場合95%を越える抗体、一部の実施態様では99重量%を超えるまで、(2)例えばスピニングカップシェークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なほど、あるいは、(3)例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

30

【0037】

本明細書で使用する「抗ユビキチン抗体」及び「抗モノユビキチン抗体」という用語は互換可能に使用され、ユビキチン分子に対する特異的結合能を有する抗体を指す。

本明細書で使用する「抗ポリユビキチン抗体」という用語は、ポリユビキチン分子に対する特異的結合能を有する抗体を指す。

【0038】

本明細書で使用する「抗K 4 8-連鎖性ポリユビキチン抗体」とは、K 4 8-連鎖性ポリユビキチンに対する特異的結合能を有する抗体を指す。

40

本明細書で使用する「抗K 6 3-連鎖性ポリユビキチン抗体」とは、K 6 3-連鎖性ポリユビキチンに対する結合能を有する抗体を指す。

【0039】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」、「等価な」、又は「実質的に等価な」という句は、当業者が2つの数値(例えば、分子に関連するもの、及び参照／比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばK d値、抗ウイルス効果等)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び／又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が有意に類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照／比較分子の値の例えば約50%以下、約40%以下、約30%以下、約20%以下、及び／又は約10%以下である。

50

【0040】

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が2つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照／比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばK_d値)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、2つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照／比較分子の値の、例えば約10%より大きく、約20%より大きく、約30%より大きく、約40%より大きく、及び／又は約50%より大きい。

【0041】

一般的に「結合親和性」は、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的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」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。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(K_d)として表される。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することができる。低親和性抗体は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、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何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实施態様を記載する。

【0042】

一実施態様では、本発明の「K_d」又は「K_d値」は、所望の抗体のF a b型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(R I A)で測定される。抗原に対するF a bの溶液結合親和性は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(¹²⁵I)-標識抗原にてF a bを均衡化して、抗F a b抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって測定する(Chen,等,(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。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5 µg/mlの捕獲抗F a b抗体(Cappel Labs)を含む50 mM炭酸ナトリウム(pH 9.6)にて一晚コートして、その後2%(w/v)のウシ血清アルブミンを含むP B Sにて室温(およそ23°C)で2~5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、100 pM又は26 pMの[¹²⁵I]抗原を段階希釈した所望のF a bと混合する(例えば、Presta等,(1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗V E G F抗体、F a b-12の評価と一致する)。ついで所望のF a bを一晚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)かかるかもしれない。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。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のT w e e n 20を含むP B Sにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount γ計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か又はそれ以下濃度のF a bを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、~10反応単位(R U)の固定した抗原C M 5チップを用いて25°CのBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってK_d又はK_d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、提供者の指示書に従って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(E D C)及びN-ヒドロキシスクシニミド(N H S)で活性化した。抗原を10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(~0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(R U)がおよそ10になるように5 µl/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1 M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F a b(0.78 nMから500 nM)を25°C、およそ25 µl/分の流速で0.05% T w e e n 20(P B S T)を含むP B Sに注入した。会合及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_{o n})と解離速度(K_{o f f})を算出した。平衡解離定数(K_d)をK_{o f f}/K_{o n}比として算出した。例

10

20

30

40

50

として、Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかしながら、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪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(pH 7.2)、25℃の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

【0043】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、
 ~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25℃のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。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、提供者の指示書に従って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)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(~0.2 µM)に希釈し、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5 µl/分の流速で注入した。反応しない群をブロックするために1 M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(0.78 nMから500 nM)を25℃、およそ25 µl/分の流速で0.05% Tween 20(PBST)を含むPBSに注入した。会合及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})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(K_d)を K_{off}/K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかしながら、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪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(pH 7.2)、25℃の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

【0044】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他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。一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うる円形の二重鎖DNAループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始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、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「組換えベクター」と呼ぶ。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使用さ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」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0045】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシ

10

20

30

40

50

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又は塩基、及び／又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしく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とすることができる。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及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。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、例えば標識との結合により、さらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、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-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有する有機キャップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしく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、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0046】

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

【0047】

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

【0048】

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性

抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び／又は親和成熟したものであってよい。

【0049】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたβシート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

【0050】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0051】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。二本鎖Fv種において、この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv種では、柔軟なペプチドリンカーによって1の重鎖及び1の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連鎖することができ、よって軽鎖及び重鎖は、二本鎖Fv種におけるものと類似の「二量体」構造に連結することができる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0052】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0053】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0054】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異

10

20

30

40

50

なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等、Cellular and Mol. Immunology, 第4版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と1以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

【0055】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0056】

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

【0057】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一である。従って、「モノクローナル」との形容は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この場合、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。重要なのは、選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的への親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養液中におけるその産生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等が可能になること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることである。異なる決定基（エпитープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler等、Nature, 256:495 (1975); Harlow等、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling等：Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法（例えば、米国特許第4816567号参照）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clackson等、Nature, 352:624-628 (1991); Marks等、J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu等、J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee等、J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等、J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、或いはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術（例えば、W098/24893; W096

10

20

30

40

50

/34096; W096/33735; W091/10741; Jakobovits等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 255 1 (1993); Jakobovits等、Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann等、Year in Immunol. 7:33 (1993); 米国特許第 5 5 4 5 8 0 7 号; 同第 5 5 4 5 8 0 6 号; 同第 5 5 6 9 8 2 5 号; 同第 5 6 2 5 1 2 6 号; 同第 5 6 3 3 4 2 5 号; 同第 5 6 6 1 0 1 6 号; Marks 等、Bio.Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg等、Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild等、Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

【0058】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又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、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び／又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他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、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号; 及びMorrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

【0059】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び／又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等、Nature 321:522-525(1986); Riechmann等、Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと: Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle 及びGross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

【0060】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び／又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 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 and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、カバットCDRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

カバットループ		AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(カバット番号付け)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia番号付け)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0061】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、V_Lの24-36又は24-34 (L1)、46-56又は50-56 (L2) 及び89-97又は89-96 (L3) と、V_Hの26-35 (H1)、50-65又は49-65 (H2) 及び93-102、94-102、又は95-102 (H3) である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、Kabat等、上掲に従って番号を付した。

【0062】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語およびその異なる言い回しは、Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82bおよび82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同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。

【0063】

「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、scFvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それはscFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。scFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0064】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公報93/11161；及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び／又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。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なるヒト化抗体を除く。

【0065】

「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のHVRにおいて一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモ

10

20

30

40

50

ルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。CDR及び／又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, Proc Nat Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等, Gene, 169:147-155(1995); Yelton等, J. Immunol.155:1994-2004(1995); Jackson等, J. Immunol.154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等, J. Mol. Biol.226:889-896(1992)に記載されている。

【0066】

「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。

10

本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

【0067】

「疾患」とは、本発明の抗体を用いた治療が有益である任意の状態である。これには、慢性及び急性の疾患、又は対象疾患に哺乳動物がかかりやすい病的状態を含む疾病が含まれる。ここで治療される疾患の非限定的例には、癌、筋疾患、ユビキチン経路関連遺伝的疾患、免疫性／炎症性疾患、神経障害、及びその他のユビキチン経路に関連する疾患が含まれる。

「細胞増殖不全」及び「増殖不全」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。ある実施態様では、細胞増殖不全は癌である。

20

【0068】

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「癌増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」という用語はここで意味するように互いに排除するものではない。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長／増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫（ホジキン及び非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平癌腫、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌、白血病及びその他リンパ球増殖性疾患、並びに頭頸部癌の様々なタイプが含まれる。

30

【0069】

「筋疾患」という用語は、筋肉を有する動物の、健常な筋肉の機能を著しく低減するような骨格筋及び／又は平滑筋の劣化又は弱化を典型的な特徴とする生理学的状態を指す又は表わす。筋疾患の例には、これらに限定されるものではないが、筋ジストロフィー、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、アイザックス症候群、全身硬直症候群、家族性周期性四肢麻痺、ミオパチー、横紋筋融解症、筋萎縮症、及び様々なタイプの筋力低下及び筋固縮が含まれる。

40

【0070】

「ユビキチン経路関連遺伝的疾患」という用語は、ユビキチン経路の異常機能を典型的な特徴とする遺伝子に基づく疾患、又は同異常機能によって起こる遺伝子に基づく疾患を指す又は表わす。ユビキチン経路関連遺伝的疾患の例には、これらに限定されるものではないが、嚢胞性繊維症、アンジェルマン症候群、及びリドル症候群が含まれる。

【0071】

「神経障害」又は「神経疾患」という用語は、神経組織の劣化又は神経組織中の細胞間の通信の悪化を典型的特徴とする、哺乳動物の中枢及び／又は末梢神経系の疾患又は不全を指す又は表わす。神経障害の例には、これらに限定されるものではないが、神経変性疾

50

患、例えば非限定的に、レビー小体病、ポリオ後症候群、シャイ・ドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、パーキンソン病、多系統萎縮症、線条体黒質変性症、タウオパチー、（アルツハイマー病、及び核上性麻痺を含むがこれらに限定されない）、プリオン病（ウシ海綿状脳症、スクレイピー、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、慢性消耗病、及び致死性家族性不眠症を含むがこれらに限定されない）、球麻痺、運動ニューロン疾患、及び神経系ヘテロ変性疾患（カナバン病、ハンチントン病、神経セロイドリポフスチン症、アレキサンダー病、トゥレット症候群、メンケス縮毛症候群、コケイン症候群、ハラールホルデン・スパッツ症候群、ラフォラ病、レット症候群、肝レンズ核変性症、レッシュ・ナイハン症候群、及びウンフェルリヒト・レントボルク症候群を含むがこれらに限定されない）、認知症（ピック病、及び脊髄小脳失調症を含むがこれらに限定されない）が含まれる。

10

【0072】

「炎症性疾患」及び「免疫疾患」という用語は、異常な免疫性機構及び／又は異常なサイトカインシグナル伝達により引き起こされる疾患を指す又は表わす。炎症性疾患及び免疫疾患の例には、これらに限定されるものではないが、自己免疫疾患、免疫不全症候群、及び過敏症が含まれる。ここで「自己免疫疾患」とは、個体自身の組織から生じ、個体自身の組織に対する非悪性の疾病又は疾患のことである。ここでの自己免疫疾患は、悪性又は癌性の疾病又は状態、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄芽球性白血病を除く。自己免疫疾病又は疾患の例には、限定されるものではないが、炎症反応、例えば乾癬及び皮膚炎(例えばアトピー性皮膚炎)を含む炎症性皮膚病；全身性強皮症及び硬化症；炎症性腸疾患(例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎)に関連した反応；呼吸困難症候群(成人呼吸困難症候群；ARDSを含む)；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギー病状、例えば湿疹及び喘息及びT細胞の浸潤に関連した他の病状及び慢性炎症反応；アテローム性動脈硬化症；白血球接着不全症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス(SLE)(ループス腎炎、皮膚ループスを含むがこれらに限定されない)；真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病又はインシュリン依存性真性糖尿病)；多発性硬化症；レノー症候群；自己免疫甲状腺炎；橋本甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェールゲン症候群；若年発症糖尿病；及び結核に典型的に見出されるサイトカイン及びTリンパ球により媒介される急性及び遅延型高血圧に関連した免疫反応、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び血管炎；悪性貧血(アジソン病)；白血球血管外遊出に関連した疾病；中枢神経系(CNS)炎症性疾患；多臓器損傷症候群；溶血性貧血(限定されるものではないが、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血を含む)；重症筋無力症；抗原抗体複合体媒介性疾病；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；クレーブス病；ランベルト-イートン筋無力症候群；類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫血小板減少性紫斑病(ITP)又は自己免疫血小板減少病等が含まれる。

20

30

【0073】

免疫不全症候群の例には、これらに限定されるものではないが、毛細血管拡張性運動失調症、白血球粘着不全症、リンパ球減少症、異常ガンマグロブリン血症、HIV又はデルタレトロウイルス感染、分類不全型免疫不全症、重症複合免疫不全症、食食殺菌機能障害、無ガンマグロブリン血症、ディジョージ症候群、及びウィスコット・アルドリッチ症候群が含まれる。過敏症の例には、これらに限定されるものではないが、アレルギー、喘息、皮膚炎、蕁麻疹、アナフィラキシー、ヴィスラー症候群、及び血小板減少性紫斑病が含まれる。

40

【0074】

ここで使用される「治療」とは、治療される個体又は細胞の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を意味し、予防のため、又は臨床病理経過中に実施することができる。治療の所望する効果には、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和、疾病の任意の直

50

接的又は間接的な病理学的結果の減少、炎症及び／又は組織／器官の損傷の防止又は減少、疾病の進行速度の低減、病状の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾病又は疾患の進行を遅延化させるために使用される。

【0075】

「個体」は脊椎動物である。特定の実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、これらに限定されるものではないが、家畜（例えばウシ）、スポーツ用動物、愛玩動物（例えばネコ、イヌ及びウマ）、霊長類、マウス及びラットが含まれる。特定の実施形態では、脊椎動物はヒトである。

治療目的の「哺乳動物」とは、ヒト、家畜、並びに動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、等を含む、哺乳動物に分類されるあらゆる動物を類意味する。特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0076】

「有効量」とは、所望される治療的又は予防的結果を達成するのに必要な期間、必要な用量での有効量を意味する。

本発明の物質／分子の「治療的有效量」は、病状、年齢、性別、個体の体重、及び個体に所望する反応を引き出すための物質／分子の能力等の要因に応じて変わり得る。また、治療的有效量とは、物質／分子の任意の毒性又は有害な影響を、治療的に有益な効果が上回る量である。「予防的有效量」は、所望する予防的結果を達成するのに必要な期間、用量で有効な量を意味する。必ずではないが、典型的には、予防的用量は、疾病の前又は初期の段階に患者に使用されるために、予防的有效量は治療的有效量よりも少ない。

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を意味する。この用語は、放射性同位元素(例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位元素)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリマイシン、ビンカアルカロイド類(ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞毒性剤を以下に記載する。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0077】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商標登録))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びビボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にブラタシン及びブラタシノン)；デルター9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビロール、MARINOL(登録商標))； β -ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCANTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレチン、及び9-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリストアチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)

、チヨロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofوسفamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン γ 1 I 及びカリケアマイシン ω 1 I (例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin) Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、
 10、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、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(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、
 20、ロドルピシン(rodorubicin)、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(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び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)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、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(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、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(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、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(testolactone)；
 30、抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；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)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidanmol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニウアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin) A、ロリジン(roridine) A及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(E L I D I S I N E(登録商標)、F I L D E S I N(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「A r a - C」)；チオテパ；
 40、タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology,

10

20

30

40

50

Princeton, NJ)、ABRAXANETMパクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタピン(gemcitabine) (GEMZAR(登録商標))；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ビンブラスチン (V E L B A N (登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P - 1 6)；イホスファミド；マイトキサントロン；ビンクリスチン (O N C O V I N (登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボリン；ビノレルビン (NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン(novant rone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandr onate)；トポイソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(capecitabine) (X E L O D A (登録商標))；及び上述したものの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体、並びに、上記のうちの2つ以上の組み合わせ、例えば、C H O P (シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ビンクリスチン、及びブレドニゾロンの併用療法の略称)、及びF O L F O X (5-FU及びロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン (E L O X A T I N T M) を用いる治療形態の略称)が含まれる。

【0078】

またこのような「化学療法剤」の定義に含まれるものには、癌の増殖を促進するホルモンの影響を調節、低減、遮断又は阻害するように働く抗ホルモン剤で、多くの場合全身性の治療の形態のものがある。それらはそれ自体がホルモンであり、例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節物質(S E R M)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、E V I S T A (登録商標) ラロキシフェン(raloxifen)、ドロロキシフェン、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)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びF A R E S T O N (登録商標)トレミフェン；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方制御 (E R D)、卵巣を抑制又は停止させる機能を有する薬剤、例えば、L U P R O N (登録商標)及びE L I G A R D (登録商標)等の黄体形成ホルモン放出ホルモン (L H R H) アゴニスト、リユープロリド酢酸塩、ゴセレリン酢酸塩、ブセレリン酢酸塩及びトリプトレリン；フルタミド、ニルタミド及びビカルタミド等のその他抗アンドロゲン；及び副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、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、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、FEMARA(登録商標)レトロゾール、及びARIMI DEX(登録商標)アナストロゾールを含む。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロン酸等のビスホスホネート(例えば、B O N E F O S (登録商標)又はO S T A C (登録商標)、D I D R O C A L (登録商標)エチドロン酸、N E - 5 8 0 9 5、Z O M E T A (登録商標)ゾレドロン酸／ゾレドロン酸、F O S A M A X (登録商標)アレンドロン酸、A R E D I A (登録商標)パミドロン酸、S K E L I D (登録商標)チルドロン酸、又はA C T O N E L (登録商標)リセドロン酸、並びにトロキサシタビン(troxacita bine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に付着細胞の増殖に結びつく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、例えばP K C - α 、R a l f、H - R a s、及び上皮成長因子受容体 (E G F - R)；T H E R A T O P E (登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン；LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX(登録商標) r m R H；ラパチニブditosylate (GW572016としても知られる E r b B - 2 及びE G F R二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)及び上記のものの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体を含む。

【0079】

組成物とその作製方法

本発明は、ポリユビキチンに特異的に結合するが、モノユビキチンには結合しない抗体を提供する。具体的には、第1のリジン連鎖を有するポリユビキチンに対する結合能を有するが、第2の、異なるリジン連鎖を有するポリユビキチンに対する結合能を有さない抗体が提供される。

【0080】

一態様において、本発明は、配列番号1-25、81-89、151-175、229-239、265-279、329-336、392-459、599-629、695-704、739-748及び789-799のうちの少なくとも一つの配列を有するHVR-H1領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号26、90、176、240、280、337、460、630、705、749及び800より選択されたHVR-H1領域コンセンサス配列を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号27-51、91-99、177-201、241-251、281-295、338-345、461-528、631-661、706-715、750-759及び801-811のうちの少なくとも一つの配列を含んでなるHVR-H2領域抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号52、100、202、252、296、346、529、662、716、760及び812から選択されたHVR-H2領域コンセンサス配列を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号53-77、101-109、203-227、253-263、297-311、347-354、530-597、663-693、717-726、761-770及び813-823のうちの少なくとも一つの配列を含むHVR-H3領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号78、110、228、264、312、355、598、694、727、771及び824から選択されたHVR-H3領域コンセンサス配列を含んでなる抗体を提供する。

【0081】

一態様では、本発明は、配列番号1-26、81-90、151-176、229-240、265-280、329-337、392-460、599-630、695-705、739-749及び789-800の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H1領域と、配列番号27-52、91-100、177-202、241-252、281-296、338-346、461-529、631-662、706-716、750-760及び801-812の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H2領域とを含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号1-26、81-90、151-176、229-240、265-280、329-337、392-460、599-630、695-705、739-749及び789-800の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H1領域と、配列番号53-78、101-110、203-228、253-264、297-312、347-355、530-598、663-694、717-727、761-771及び813-824の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H3領域とを含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号27-52、91-100、177-202、241-252、281-296、338-346、461-529、631-662、706-716、750-760及び801-812の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H2領域と、配列番号53-78、101-110、203-228、253-264、297-312、347-355、530-598、663-694、717-727、761-771及び813-824の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H3領域とを含んでなる抗体を提供する。

【0082】

一態様では、本発明は、配列番号313-327、356-363、728-737及び772-781の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-L3領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号328、364、738及び782より選択されるHVR-L3領域コンセンサス配列を含んでなる抗体を提供する。一実施形態に

において、本発明は、配列番号 313-328、356-364、728-738 及び 772-782 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-L3 領域を含んでなり、更に配列番号 1-26、81-90、151-176、229-240、265-280、329-337、392-460、599-630、695-705、739-749 及び 789-800；配列番号 27-52、91-100、177-202、241-252、281-296、338-346、461-529、631-662、706-716、750-760 及び 801-812；並びに配列番号 53-78、101-110、203-228、253-264、297-312、347-355、530-598、663-694、717-727、761-771 及び 813-824 よりそれぞれ選択される、少なくとも一つの HVR-H1、HVR-H2 又は HVR-H3 配列を含んでなる抗体を提供する。

10

【0083】

一態様では、本発明は、以下の内の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3 又は 4 つ全てを含んでなる抗体を提供する：

(i) 配列番号 1-26、81-90、151-176、229-240、265-280、329-337、392-460、599-630、695-705、739-749 及び 789-800 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H1 配列；

(ii) 配列番号 27-52、91-100、177-202、241-252、281-296、338-346、461-529、631-662、706-716、750-760 及び 801-812 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H2 配列；

20

(iii) 配列番号 53-78、101-110、203-228、253-264、297-312、347-355、530-598、663-694、717-727、761-771 及び 813-824 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H3 配列；並びに

(iv) 配列番号 313-328、356-364、728-738 及び 772-782 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-L3 配列。

【0084】

一態様では、本発明は、K48 連鎖性ポリユビキチンに対し、高い親和性で特異的に結合するが、K63 連鎖性ポリユビキチンにはそれよりも実質的に小さい親和性で結合する抗体であって、以下の内の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3 又は 4 つ全てを含んでなる抗体を提供する：

30

(i) 配列番号 1-26、151-176、265-280、392-460 及び 695-705 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H1 配列；

(ii) 配列番号 27-52、177-202、281-296、461-529 及び 706-716 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H2 配列；

(iii) 配列番号 53-78、203-228、297-312、530-598 及び 717-727 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H3 配列；並びに

(iv) 配列番号 313-328 及び 728-738 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-L3 配列。

【0085】

40

一態様では、本発明は K63 連鎖性ポリユビキチンに対し、高い親和性で特異的に結合するが、K48 連鎖性ポリユビキチンにはそれよりも実質的に小さい親和性で結合する抗体であって、以下の内の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3 又は 4 つ全てを含んでなる抗体を提供する：

(i) 配列番号 81-90、229-240、329-337、599-630、739-749 及び 789-800 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H1 配列；

(ii) 配列番号 91-100、241-252、338-346、631-662、750-760 及び 801-812 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H2 配列；

(iii) 配列番号 101-110、253-264、347-355、663-694、761-771 及び 813-824 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR-H3 配列；

50

(iv) 配列番号 3 5 6 - 3 6 4 及び 7 7 2 - 7 8 2 の内の少なくとも一つの配列を含む H V R - L 3 配列。

【0086】

図 2、3、8、9、10、11、14、15、16、17 及び 22 に示すように、配列番号 1 - 7 8、8 1 - 1 0 6 - 1 4 9、1 5 1 - 3 6 4、3 9 2 - 7 8 2 及び 7 8 9 - 8 2 4 のアミノ酸配列には個々の H V R (すなわち H 1、H 2、H 3、L 3) に関して番号を付けた。後述するように、この番号付けは、カバット番号付けシステムと整合している。一実施形態において、本発明の抗体は、上記配列 (i) ~ (iv) の内の 1、2、3 又は全てを含み、H V R - L 1 及び／又は H V R - L 2 はカバット・コンセンサス配列 (例えば配列番号 7 9 (H V R - L 1) 及び 8 0 (H V R - L 2)) を含む。

10

【0087】

一態様では、本発明は、図 2、3、8、9、10、11、14、15、16、17 及び 22 に示すように、重鎖 H V R 配列を含んでなる抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、図 10、11、16 及び 17 に示す軽鎖 H V R 配列を更に含む。

本発明の抗体の一部の実施形態は、下記の配列番号 7 8 3 に示すように、ヒト化 4 D 5 抗体 (huMab4D5-8) (HERCEPTIN (登録商標) Genentech, Inc.、米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) (米国特許第 6 4 0 7 2 1 3 号及び Lee 等、J. Mol. Biol (2004), 340(5):1073-93 においても言及される) の軽鎖可変ドメインを含む。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Th
r Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pr
o Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Se
r Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pr
o Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gl
n Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (配列番号 7 8 3) (H V R 残基を下線で示す)

20

【0088】

一実施形態において、huMab4D5-8 軽鎖可変ドメイン配列は、位置 2 8、3 0、3 1、5 3、6 6 及び 9 1 の一つ以上 (それぞれ、上記に太字及び斜体で示された A s p、A s n、T h r、P h e、A r g 及び H i s) において修飾される。一実施形態において、修飾された huMab4D5-8 配列は、位置 2 8 にセリン、位置 3 0 にセリン、位置 3 1 にセリン、位置 5 3 にセリン、位置 6 6 に G l y 及び／又は位置 9 1 にセリンを含む。したがって、一実施形態において、本発明の抗体は、下記の配列番号 7 8 4 に示される配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

30

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Th
r Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pr
o Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Se
r Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pr
o Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gl
n Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (配列番号 7 8 4) (H V R 残基を下線で示す)

huMab4D5-8 に関する置換された残基は、上記に太字及び斜体で示される。

【0089】

40

特定のリジン連鎖を含むポリユビキチンに対する結合活性が実質的に保持されるならば、本発明の抗体はいかなる適切なフレームワーク可変ドメイン配列をも含むことができる。例えば、一部の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含んでなる。これらの抗体の一実施形態において、フレームワークコンセンサス配列は、位置 7 1、7 3 及び／又は 7 8 に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態において、位置 7 1 は A であり、7 3 は T であり、及び／又は、7 8 は A である。一実施形態において、これらの抗体は huMab4D5-8 (HERCEPTIN (登録商標) Genentech, Inc.、米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) (米国特許番号 6 4 0 7 2 1 3 号及び同第 5 8 2 1 3 3 7、及び Lee 等、J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93 においても言及される) の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む。一実施形態に

50

において、これらの抗体は、ヒトκI軽鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。一実施形態において、これらの抗体は、列番号79、80、313-328、356-364、728-738及び772-78の軽鎖HVR配列配の内の少なくとも1、2又は全てを含む。一実施形態において、これらの抗体は、米国特許番号6407213号及び同第5821337号に記載されているような、huMAb4D5-8の軽鎖HVR配列を含む。一実施形態において、これらの抗体は、huMAb4D5-8（配列番号783及び784）（HERCEPTIN（登録商標）Genentech, Inc.、米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ）（米国特許番号6407213及び5821337、及びLee等、J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93においても言及されている）（及びLee等）の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0090】

一実施形態において、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号111-129、138-141、146-149及び839-895の内の少なくとも一つを含み、HVR H1、H2及びH3配列は、それぞれ、配列番号1-26、81-90、151-176、229-240、265-280、329-337、392-460、599-630、695-705、739-749、及び789-800；27-52、91-100、177-202、241-252、281-296、338-346、461-529、631-662、706-716、750-760及び801-812；並びに53-78、101-110、203-228、253-264、297-312、347-355、530-598、663-694、717-727、761-771及び813-824から選択される。一実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号130-133、134-137、142-145及び896-907の内の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1配列は配列番号79であり、HVR-L2配列は配列番号80であり、HVR-L3配列は配列番号313-328、356-364、728-738及び772-782の少なくとも一つより選択される。

20

【0091】

一実施形態において、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号111-129及び839-895の少なくとも一つの配列を含み、HVR H1、H2及びH3配列はそれぞれ配列番号1、27及び53である（クローン48-1）。同様に、他の実施形態では、クローン48-2から48-118まで、クローン63-1から63-51まで、Fab apu01からapu24まで、Fab apu2.01からapu2.20まで、及びクローンapu3.01から3.11までの各々の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は配列番号111-129及び839-895の少なくとも一つの配列を含み、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列は図2、3、8-11、14-17及び22の各クローン又はFabについて特に列挙される配列である。一実施形態において、本発明の抗体は軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号130-133及び896-907の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1、L2及びL3配列は、それぞれ配列番号79、80及び313である（Fab apu01）。同様に、他の実施形態では、Fab apu01からapu24まで、及びFab apu2.01からapu2.20までの各々の抗体は、軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号130-133及び896-907の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1は配列番号79であり、HVR-L2は配列番号80であり、HVR-L3配列は、図10、11C、16B及び17Bの各々のFabについて特に列挙される配列である。

30

40

【0092】

一実施形態において、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号138-141の少なくとも一つの配列を含み、HVR H1、H2及びH3配列はそれぞれ配列番号1、27及び53である（クローン48-1）。同様に、他の実施形態では、クローン48-2から48-118まで、クローン63-1から63-

50

51まで、Fab apu01からapu24まで、Fab apu2.01からapu2.20まで及びクローンapu3.01-3.11の各々の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号138-141の少なくとも一つの配列を含み、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列は図2、3、8-11、14-17及び22の各クローン又はFabについて特に列挙される配列である。一実施形態において、本発明の抗体は軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号134-137の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1、L2及びL3配列はそれぞれ配列番号79、80及び313である（Fab apu01）。同様に、他の実施形態では、Fab apu01からapu24まで及びFab apu2.01からapu2.20までの各々の抗体は軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号134-137の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1は配列番号79であり、HVR-L2は配列番号80であり、HVR-L3配列は、図10、11C、16B及び17Bの各Fabについて特に列挙される配列である。

10

【0093】

一実施形態において、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号146-149の少なくとも一つの配列を含み、HVR-H1、H2及びH3配列は、それぞれ配列番号1、27及び53である（クローン48-1）。同様に、他の実施形態では、クローン48-2から48-118まで、クローン63-1から63-51まで、Fab apu01からapu24まで、Fab apu2.01からapu2.20まで及びクローンapu3.01から3.11までの各々の抗体は重鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号146-149の少なくとも一つの配列を含み、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列は、図2、3、8-11、14-17及び22の各クローン又はFabについて特に列挙される配列である。一実施形態において、本発明の抗体は軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号142-145の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1、L2及びL3配列は、それぞれ配列番号79、80及び313である（Fab apu01）。同様に、他の実施形態では、Fab apu01からapu24まで及びFab apu2.01からapu2.20までの各々の抗体は軽鎖可変ドメインを含み、そのフレームワーク配列は、配列番号142-145の少なくとも一つの配列を含み、HVR-L1は配列番号79であり、HVR-L2は配列番号80であり、HVR-L3配列は、図10、11C、16B及び17Bの各Fabについて特に列挙される配列である。

20

30

【0094】

一実施形態において、本発明の抗体は、所望の標的結合親和性を得るために親和成熟抗体である。一実施形態において、高い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-H1アミノ酸位置29、30、33及び34に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-H2アミノ酸位置52及び52aに置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-H3アミノ酸位置99、100、100a及び100bに置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-H3アミノ酸位置95-100、100a及び100bに置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-L3アミノ酸位置91及び96に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK63連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK48連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、HVR-H1アミノ酸位置29-34に置換を

40

50

含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-H 2アミノ酸位置5 0、5 2、5 2 a、5 3-5 6及び5 8に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-H 3アミノ酸位置9 5-1 0 0、1 0 0 a、1 0 0 b及び1 0 0 cに置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-L 3アミノ酸位9 1-9 5、9 5 a及び9 5 bに置換を含む。

10

【0095】

別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-H 1アミノ酸位置2 9-3 4に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-H 2アミノ酸位置5 0、5 2、5 4、5 6及び5 8に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3連鎖性ポリユビキチンと特異的に結合するが、それよりも実質的に低い親和性でK 4 8連鎖性ポリユビキチンと結合する本発明の親和成熟抗体は、H V R-H 3アミノ酸位置9 5-1 0 0、1 0 0 a、1 0 0 b及び1 0 0 cに置換を含む。

20

【0096】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号2 6 5、2 8 1及び2 9 7の配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる。一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号7 9、8 0及び3 1 3の配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号2 6 5、2 8 1及び2 9 7の配列を含む重鎖可変ドメインと、更に、配列番号7 9、8 0及び3 1 3の配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。他の実施形態において、特定のクローン番号に対応する本発明の抗体は、図2、3、8、9、1 0、1 1、1 4-1 7及び2 2に記載の、該当するクローン番号のH V R-H 1、H V R-H 2及びH V R-H 3配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる。他の実施形態において、特定のクローン番号に対応する本発明の抗体は、配列番号7 9のH V R-L 1配列、配列番号8 0のH V R-L 2配列、及び図1 0、1 1、1 6及び1 7に記載の当該クローン番号のH V R-L 3配列を含んでなる。他の実施形態において、特定のクローン番号に対応する本発明の抗体は、図2、3、8、9、1 0、1 1、1 4-1 7及び2 2に記載の、該当するクローン番号のH V R-H 1、H V R-H 2及びH V R-H 3配列を含む重鎖可変ドメインと、更に配列番号7 9のH V R-L 1配列、配列番号8 0のH V R-L 2配列、及び図1 0、1 1、1 6及び1 7に記載の当該クローン番号のH V R-L 3配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

30

【0097】

一態様では、本発明は、ポリユビキチンに対する結合について上述の抗体のいずれかと競合する抗体を提供する。一態様では、本発明は、上述の抗体のいずれかと同じポリユビキチン上の抗原決定基に結合する抗体を提供する。

40

本願明細書において示されるように、本発明の抗体は、特定のリジン連鎖を有する単離されたポリユビキチンと特異的に結合する。本願明細書において示されるように、そのポリユビキチンを異種タンパク質に付着させるとき、本発明の抗体も特定のリジン連鎖を有するポリユビキチンと特異的に結合する（例えば実施例3及び4を参照）。

【0098】

少なくとも一つの抗ポリユビキチン抗体、又は抗ポリユビキチン抗体をコードする配列を含む少なくとも一つのポリヌクレオチドを含んでなる組成物が提供される。特定の実施形態では、組成物は、医薬品組成物とすることができる。本明細書で使用する場合、組成物は、一つ以上のポリユビキチンと結合する一つ以上の抗体か、又は一つ以上のポリユビ

50

キチンと結合する一つ以上の抗体をコードする配列を含む一つ以上のポリヌクレオチドを含んでなる。これらの組成物は、公知の適切な担体、例えばバッファーを含む製薬的に許容可能な賦形剤等を更に含むことができる。

単離された抗体及びポリヌクレオチドも提供される。特定の実施形態では、単離された抗体及びポリヌクレオチドは実質的に純粋である。

【0099】

一実施形態において、抗ポリユビキチン抗体はモノクローナル抗体である。別の実施形態では、抗ポリユビキチン抗体の断片（例えばFab、Fab'-SH及びF(ab')₂断片）が提供される。これらの抗体断片は、酵素消化等の従来の手段によって作成することができるか又は組換え体技術によって生成することができる。このような抗体断片は、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体でもよい。これらの断片は、後述する診断及び治療目的に有用である。

【0100】

ファージディスプレイライブラリを用いた抗ポリユビキチン抗体の生成

対象とする抗体が得られるファージディスプレイライブラリを生成するための様々な方法が従来技術に既知である。対象とする抗体の一生成法では、Lee等、J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93に記載されているファージ抗体ライブラリを使用する。

本発明の抗ポリユビキチン抗体は、所望される活性を有する合成抗体クローンを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を用いて同定することができる。原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、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ー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断片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、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収／溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗ポリユビキチン抗体は、興味の対象である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法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗ポリユビキチン抗体クローンの構築によって得ることができる。

【0101】

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)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの超可変ループ又は相補鎖決定領域(CDRs)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及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は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断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

【0102】

VH及び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ンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、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。免疫化したソースからのライブラリは、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)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及

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し、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変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。

【0103】

繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboomら, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾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表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ペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスパーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

【0104】

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗ポリユビキチンクローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合には、検体をポリユビキチンで免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び／又は循環B細胞又は他の末梢血リンパ球(PBL)を、ライブラリ構築のために回収する。一実施態様では、ポリユビキチン免疫化により、ポリユビキチンに対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、抗ヒトポリユビキチンクローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗ヒトポリユビキチン抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下の(III)(b)の章に記載する。

【0105】

抗ポリユビキチン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法を利用してポリユビキチン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、ポリユビキチンアフィニティクロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識ポリユビキチン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。

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び／又はB細胞又は他の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表示が提供され、また、ポリユビキチンが免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検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。対象の免疫細胞は、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、及びトリ種等から得ることができる。

【0106】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandiら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び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、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandiら, (1989)及び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前方向プライマーにより、cDNA及びゲノム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、前方向プライマーは、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)又はSastryら(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り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、又はOrumら, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及び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、又は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。

【0107】

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。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinsonら, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら, Nature Genet., 3: 88-94(1993)); これらクローニングされたセグメント(H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。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すべ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V κ 及びV λ セグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、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及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相当に構造的な多様性を有する抗体をコードする。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及び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。

【0108】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及び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、又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作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリ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。ナイーブのVH及び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つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約 10^{12} クローン)によってのみ限定されるように、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る。双方のベクターは、VH及び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共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有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約 10^{-8} Mの K_d^{-1})の多くの多様な抗体を提供する。

【0109】

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するか、又は、Clacksonら, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにPCR後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。PCRアセンブリは、また、柔軟なペプチドスパーサーをコードしているDNAとVH及びVL DNA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利用することができる。さらに他の技術では、「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のVH及びVL遺伝子を組み合わせ、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利用される。

ライブラリのスクリーニングは、いずれかの既知の技術によって行うことができる。例えば、ポリユビキチンを使用して、吸着プレートの壁をコーティングし、吸着プレートに固定した宿主細胞上に発現させることができるか、細胞選別に使用することができるか、ビオチンにコンジュゲートさせて、ストレプトアビジンでコーティングしたビーズにて捕捉することができるか、又はファージディスプレイライブラリをパニングするための何れかの既知の方法に使用することができる。

【0110】

ファージライブラリサンプルを、少なくとも一部のファージ粒子を吸収剤と結合させるのに適した条件下で、固定化したポリユビキチンに接触させる。通常、pH、イオン強度、温度等を含むこの条件は、生理的条件に近似するように選択される。固体ファージに結合させるファージを洗浄し、次いで、Barbas等、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載のように酸により、Marks等、J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載のようにアルカリにより、或いは、例えばClackson等、Nature, 352: 624-628 (1991)の抗原競合法に類似の手順での、ポリユビキチン抗原競合により、溶出する。ファージは、単一回の選択で20～1,000倍に濃縮することができる。更に、濃縮ファージを細菌培養で増殖させ、更なる選択回を行うことができる。

選択の効率は、洗浄の間の解離の動力学、及び単一のファージ上の多数の抗体断片が同時に抗原と結合できるかどうかを含む、多数の要因によって決まる。短時間の洗浄、多価のファージディスプレイ、及び固体相の抗原の高いコーティング密度により、速い解離動態（及び弱い結合親和性）を有する抗体を保持することができる。密度が高いことは、多価の相互作用によりファージを安定させるだけでなく、解離したファージの再結合に有利である。遅い解離動態（及び良好な結合親和性）を有する抗体の選択を、長時間の洗浄及びBass等、Proteins, 8: 309-314 (1990)及びWO 92/09690に記載のような単価ファージディスプレイ、並びにMarks等Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載のような抗原の低いコーティング密度によって促進することができる。

【0111】

ポリユビキチンのために、異なる親和性のファージ抗体間で選択を行うことが、親和性の差異がわずかであっても、可能である。しかしながら、選択された抗体をランダムに変異させることにより（例えば、上記親和性成熟技術の一部において行われるように）、多数の変異が生じ、大部分が抗原に結合し、且つ少数に親和性の向上が生じると思われる。ポリユビキチンが制限されている場合、珍しい高親和性ファージを計算することができた。親和性の高い変異体全てを保持するため、過剰ビオチン標識したポリユビキチンであるが、ポリユビキチンの標的モル親和性定数より低いモル濃度でビオチン標識したポリユビキチンを用いてファージをインキュベートすることができる。次いで、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズで高親和性結合ファージを捕捉することができる。このような「平衡捕捉」により、結合の親和性に従って抗体を選択することができ、その際の感受性は、親和性の低い、過剰なファージの2倍に過ぎない親和性を有する変異クローンを単離可能なものである。固体相に結合したファージの洗浄に使用する条件を操作して、解離動態に基づく識別を行なうこともできる。

【0112】

抗ポリユビキチンクローンは、活性により選択することもできる。一実施形態では、本発明はポリユビキチンリガンドとポリユビキチンとの結合を遮断するが、ポリユビキチンリガンドと第2のタンパク質との結合を遮断しない抗ポリユビキチン抗体を提供する。そのような抗ポリユビキチン抗体に対応するFvクローンは、(1)上記B(I)(2)に記載のように、ファージライブラリから抗ポリユビキチンクローンを単離し、場合によって、単離されたファージクローンの集団を、当該集団を適切な細菌宿主中で増殖させることにより増幅すること、(2)それぞれ、所望の遮断活性及び非遮断活性を有する、ポリユビキチン及び第2タンパク質を選択すること、(3)抗ポリユビキチンファージクローンを吸収してポリユビキチンを固定すること、(4)過剰な第2タンパク質を使用して、

第2タンパク質の結合決定基と重複するか、同決定基と共有されるポリユビキチン結合決定基を認識するすべての望ましくないクローンを溶出すること、及び(5)(4)の後に吸収されたままのクローンを溶出することにより、選択することができる。場合によって、所望の遮断／非遮断特性を有するクローンを、本明細書に開示される選択手順を1回以上繰り返すことにより、更に濃縮することができる。

【0113】

本発明のFvクローンをコードするDNAは、従来の手順により容易に単離及び配列決定することができる(例えば、ハイブリドーマ又はファージDNAテンプレートから対象の重鎖及び軽鎖コード化領域を特異的に増幅させるように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)。単離後、DNAを発現ベクターに配置し、次いで当該ベクターを、大腸菌細胞、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞、又は他の場合には免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髓腫細胞等の宿主細胞に形質移入し、よって組換え宿主細胞中に所望のモノクローナル抗体の合成を得る。抗体コード化DNAの細菌における組換え発現に関する参考文献には、Skerra等、*Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256 (1993)及びPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)が含まれる。

10

本発明のDNAコード化Fvクローンを、重鎖及び／又は軽鎖の定常領域をコードする既知のDNA配列(例えば、適切なDNA配列をKabat等、上掲から得ることができる)と組み合わせ、完全長又は部分長の重鎖及び軽鎖を形成することができる。IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE定常領域を含む、任意のアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用できること、及びそのような定常領域は任意のヒト又は動物の種から採取できることを理解されたい。「ハイブリッド」の完全長重鎖及び／又は軽鎖のコード化配列を形成するために、一の動物(例えばヒト)の種の可変ドメインDNAから採取し、次いで別の動物種の定常ドメインDNAに融合させるFvクローンは、本明細書で使用する「キメラ」抗体及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。一実施形態では、ヒト可変DNA由来のFvクローンをヒトの定常領域DNAに融合させ、全ヒトの完全長又は部分長重鎖及び／又は軽鎖のコード化配列を形成する。

20

【0114】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約 $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ 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第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、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、又はGramら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プロンポリメラーゼ(Leungら、*Technique*, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、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つ又はそれより多い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、対象のCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開9607754(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を製作する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marksら、*Biotechnol.* 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVDメイン変異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又はVLメインを組み換えること、及び数回のチェーン・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。この技術は、 10^{-9} M の範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

30

40

【0115】

抗ポリユビキチン抗体を生成する他の方法

更に、抗体を生成して親和性を評価する他の方法が従来技術に既知であり、例えばKohler等、*Nature* 256: 495 (1975)；米国特許第4816567号；Goding, *Monoclonal Ant*

50

ibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986; Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987; Munson等、Anal. Biochem., 107:220 (1980); Engels等、Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989); Abrahmsen等、EMBO J., 4: 3901 (1985); Methods in Enzymology, vol. 44 (1976); Morrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)に記載されている。

【0116】

概略的方法

概して、本発明は、一以上のポリユビキチン活性の部分的又は全体的遮断が所望されるポリユビキチン媒介性障害の治療に有用な抗ポリユビキチン抗体を提供する。一実施態様では、本発明の抗ポリユビキチン抗体は、癌の治療に使用される。別の実施態様では、ここに提供される抗ポリユビキチン抗体は、上記のような筋疾患の治療に使用される。別の実施態様では、ここに提供される抗ポリユビキチン抗体は、上記のような神経障害の治療に使用される。別の実施形態では、本発明の抗ポリユビキチン抗体は、遺伝的疾患の治療に使用される。別の実施形態では、ここに提供される抗ポリユビキチン抗体は、免疫異常／炎症性疾患の治療に使用される。

本発明の抗ポリユビキチン抗体の独特の特性は、わずらわしい過度の遺伝子操作又は質量分析等の生物物理学的方法を実施することなく、ポリユビキチンの異なるリジン連鎖形態を区別するのに特に有用である。本発明の抗ポリユビキチン抗体は、インビトロ及びインビボの両方において特定のリジン連鎖性ポリユビキチンの機能及び活性を特徴付けるために使用することができる。本発明の抗ポリユビキチン抗体は、疾病の進行及び病因における特定のリジン連鎖性ポリユビキチンの役割を決定するのに使用することができる。更に、本発明の抗ポリユビキチン抗体は、一以上の特定のリジン連鎖性ポリユビキチンが、抗ポリユビキチン抗体が特異的でないポリユビキチンの正常な活性に干渉することなく、異常制御されるか又は異常に機能する疾病の治療に使用することができる。

【0117】

別の態様では、本発明の抗ポリユビキチン抗体を、特定のリジン連鎖性のポリユビキチンの検出及び単離を行うため、例えば、細胞集団、及び所定の一細胞における、ポリユビキチンの密度及び分布の決定、並びにポリユビキチンの存在又は量に基づく細胞選別を含む、様々な細胞種類及び組織におけるポリユビキチン発現の検出を行うための試薬として使用できる。

また別の態様では、本抗ポリユビキチン抗体は、本発明の課題の抗体と類似の遮断活性パターンを有するポリユビキチンアンタゴニストの開発に有用である。例えば、本発明の抗K48連鎖性ポリユビキチン抗体を使用して、同じK48連鎖性ポリユビキチンの結合特性及び／又はK48連鎖性ポリユビキチン媒介経路遮断能を有するほかの抗体を決定及び同定することができる。同様に、本発明の抗K63連鎖性ポリユビキチン抗体を使用して、同じK63連鎖性ポリユビキチンの結合特性及び／又はK63連鎖性ポリユビキチン媒介経路の遮断能を有するほかの抗体を決定及び同定することができる。

【0118】

更なる実施例として、本発明の抗ポリユビキチン抗体を使用して、線形及び立体エピトープを含め、ここに例証する抗体とほぼ同じポリユビキチンの抗原決定基(一又は複数)に結合する他の抗ポリユビキチン抗体を同定することができる。

本発明の抗ポリユビキチン抗体を、ポリユビキチンを用いる生理学的経路に基づくアッセイに使用することにより、一以上の特定のリジン連鎖を有するポリユビキチンに対する一以上の結合パターンでの結合の遮断に同様の製薬的効果を示す、そのような一以上のリジン連鎖を有するポリユビキチンの小分子アンタゴニストをスクリーニングすることができる。例えば、K48連鎖性ポリユビキチンが、標的とする特定のタンパク質のプロテアソーム分解に関与していることが知られている(例えば、Chau等、Science 243: 1576-1583 (1989); Finley et等、Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick等、Nat. Cell Biol. 6:634-641 (2004)参照)ことから、抗K48連鎖性ポリユビキチン抗体は、候

補となる一以上の小分子アンタゴニストの活性を、当該経路における抗K 4 8連鎖性ポリユビキチン抗体の活性と比較することにより、K 4 8連鎖性ポリユビキチン媒介性標的プロテアソーム分解の小分子アンタゴニストを同定するためのスクリーニングに使用することができる。同様に、別の実施例では、K 6 3連鎖性ポリユビキチンがDNA修復に関与することが知られている（例えば、Pickart及びFushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004)参照）ことから、DNA修復経路をアンタゴナイズする抗K 6 3連鎖性ポリユビキチン抗体の活性を、同じDNA修復経路におけるK 6 3連鎖性ポリユビキチンの一以上の候補小分子アンタゴニストの活性と比較することができる。同様に、別の実施例では、K 6 3連鎖性ポリユビキチンはパーキンソン病のレビー小体の形成に関与していることが知られている（例えば、Lim et等、J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)参照）ことから、抗K 6 3連鎖性ポリユビキチン抗体の、レビー小体の形成をアンタゴナイズする活性を、レビー小体の形成のアンタゴナイズにおける、K 6 3連鎖性ポリユビキチンの一以上の候補となる小分子アンタゴニストの活性と比較することができる。

10

【0119】

候補抗体の生成は、ハイブリドーマ技術、及び結合分子のファージディスプレイライブラリのスクリーニング等の、本明細書に記載の技術を含め、当技術分野において常套的な技術を用いて達成することができる。これらの方法は従来技術において確立されている。

簡潔に説明すると、本発明の抗ポリユビキチン抗体は、一又は複数の所望の活性を有する合成抗体クローンを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を用いて作製することができる。原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、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ー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断片を発現するクローンは抗原に吸収され、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することができ、抗原吸収／溶出のサイクルを繰り返すことによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗ポリユビキチン抗体は、対象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法を設計し、続いて対象のファージクローン由来のFv配列、及びKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いて完全長抗ポリユビキチン抗体クローンを構築することにより、得ることができる。国際公開第03/102157号パンフレット及びその引用文献も参照されたい。

20

30

【0120】

一実施態様では、本発明の抗ポリユビキチン抗体はモノクローナルである。また、ここに提供される抗ポリユビキチン抗体のFab、Fab'、Fab'-SH及びF(ab')₂断片、並びにそれらの変形形態も本発明の範囲に含まれる。これらの抗体断片は、酵素消化等の常套的な手段により作製することができるか、又は組換え技術により生成することができる。このような抗体断片は、キメラ、ヒト又はヒト化とすることができる。これらの断片は、本明細書に定める実験、診断及び治療の目的に有用である。

40

モノクローナル抗体は、ほぼ同種の抗体の集団から得ることができる。つまり、集団を構成する個々の抗体は、少量だけ存在する可能性のある天然に発生する突然変異を別にすれば同一である。従って、形容詞「モノクローナル」とは、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特性を示す。

本発明の抗ポリユビキチンモノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)によって最初に開示されたハイブリドーマ法を含む、従来技術に既知の様々な方法を用いて作製することができるか、或いは組換えDNA法によって作製することができる(例えば、米国特許第4816567号)。

【0121】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

50

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及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て)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。宿主細胞は、限定するものではないが、原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞を含む。この目的のために、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEの定常領域を含め、いずれかのアイソタイプの定常領域を使用することができ、そのような定常領域は何らかのヒト又は動物種から採取することができる。

【0122】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

【0123】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞に関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン(Amp)及びテトラサイクリン(Tet)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモーターを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、λGEM.TM.-11のようなバクテリオファージを、大腸菌LE392のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用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。

【0124】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモーター-シストロン(翻訳単位)対を含みうる。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配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモーターを

10

20

30

40

50

除去し、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又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用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、標的遺伝子の増幅及び／又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、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、異種プロモーターが有用である。

【0125】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、 β ガラクターマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)。

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングする原核生物宿主細胞に対しては、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あるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及び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って置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

【0126】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌trxB⁻系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

本発明の抗体は、発現されるポリペプチド成分の量的な比を変更することにより、分泌されて適切に集合体化(アセンブル)された本発明の抗体の産出を最大化することができる発現系を用いても生成することができる。このような変更は、少なくとも部分的にはポリペプチド成分の翻訳強度を同時に変更することにより行われる。

【0127】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等による米国特許第5840523号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。任意のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作成することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。特定の実施形態では、ヌクレオチド配列における変化はサイレントである。TIRにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード化配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。加えて、いくつかのアミノ酸、例えばロイ

シン、セリン、及びアルギニンは、1番目及び2番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

【0128】

一実施形態では、含有される各シストロンについて一定の範囲のTIR強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のTIR強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。TIR強度は、Simmons等による米国特許第5840523号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化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いて、所望の個々のTIRを選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

10

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(*Serratia marcescens*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ピトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^Rを有する33D3株(米国特許第5639635号)を含むW3110株(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌 λ 1776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608)など、他の株及びその誘導体も好適である。こ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記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass等, 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した細菌を選択することが必要である。pBR322、pBR325、pACYC177、又はpKN410のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、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、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

20

30

【0129】

抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNAを原核生物宿主中に導入し、そのDNAを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール/DMSOを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

40

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知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地(LB)プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

【0130】

50

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有せられうる。場合によっては、培養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、ジチオエリトリートル及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、限定するものではないが、約20℃から約39℃、約25℃から約37℃の範囲、及び約30℃を含む温度範囲で増殖が起こる。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。大腸菌に対しては、pHは約6.8から約7.4、又は約7.0とすることができる。

10

本発明の発現ベクターに誘導性プロモーターが用いられる場合、プロモーターの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモーターが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。一実施態様では、リン酸限定培地はC. R. A. P培地である(例として、Simmons等, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

【0131】

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

20

本発明の一態様では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、例えば約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(一般的炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

30

【0132】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD₅₅₀まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

40

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等(1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (200

50

0) J. Biol. Chem. 275:17100-17105 ; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113 ; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

【0133】

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼ I I I、Omp T、Deg P、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 及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲の Joly 等 (1998) ; Georgiou 等, 米国特許第 5 2 6 4 3 6 5 号 ; Georgiou 等, 米国特許第 5 5 0 8 1 9 2 号 ; Hara 等 (1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72 に記載されている。

10

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

【0134】

抗体精製

一実施態様では、ここで生成される抗体タンパク質を更に精製することにより、更なるアッセイ及び使用のためにほぼ同種の調製物を得る。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相 HPLC、シリカ又は DEAE などの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えば Sephadex G-75 を用いたゲル濾過法。

20

一態様では、固形層に固定したプロテイン A を本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテイン A は抗体の Fc 領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した 41 kD の細胞壁タンパク質である。Lindmark 等 (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテイン A を固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、或いは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムとすることができる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着をできるだけ防ぐように、グリセロールなどの試薬でコートされる。

30

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテイン A 固定固形層に適応し、プロテイン A に対象とする抗体を特異的に結合させることができる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

【0135】

真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、ベクターは、限定するものではないが、以下の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモーター及び転写終末因子。

【0136】

(i) シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。通常選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス gD シグナルが利用できる。

40

このような前駆体領域の DNA は、多価抗体をコードする DNA に読み取り枠を一致させて結合される。

【0137】

50

(ii) 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、SV40開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

【0138】

(iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

10

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【0139】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、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等々である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、例えば、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞(例として、ATCC CRL-9096)を含む。

20

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照のこと。

30

【0140】

(iv) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常、宿主生物体によって認識され、対象のポリペプチドをコードする核酸(例えば抗体)に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNC AAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるAATAA配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

40

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、或いは熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節されうる。

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫

50

ウイルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。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におけるマウス細胞内のヒトβインターフェロンcDNAの発現に関するReyes等、Nature 297:598-601 (1982)も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0141】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明の抗体ポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強され得る。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、通常プロモーターから5'位に位置している。

【0142】

(vi) 転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【0143】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977));ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980));サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34);パッファーローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(He p G 2, HB 8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982));MRC 5細胞;FS 4細胞;及びヒト肝癌株(He p G 2)である。

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

【0144】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の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において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(Sigma)、最小必須培地((MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), (Sigma))が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

【0145】

(ix) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

20

【0146】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーは一般に許容可能な精製技術である。プロテインA等のアフィニティー試薬の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 1657-1675 (1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSETMクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

30

40

任意の予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばpH約2.5-4.5、一般的には低塩濃度(例として、約0-0.25M塩)の溶出緩衝液を用いて低pH疎水性作用クロマトグラフィーにより、必要な精製ステップを更に行う。

一般に、研究、試験及び臨床用に使用される抗体を調製するための技術及び方法は従来技術において既に確立されており、上記と合致している及び/又は対象とする特定の抗体について当業者により適切とみなされることに注意されたい。

【0147】

50

活性アッセイ

本発明の抗体は、従来技術に既知の様々なアッセイにより、その物理的／化学的特性及び生物学的機能について特徴付けることができる。

精製された抗体は、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパパイン消化を含むがこれらに限定されない一連のアッセイにより、更に特徴付けることができる。

必要に応じて、抗体の生物学的活性が分析される。一部の実施態様では、本発明の抗体の抗原結合活性について試験する。従来技術に既知の、本発明に使用可能な抗原結合アッセイには、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「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、及びプロテインAイムノアッセイ等のあらゆる直接的又は競合的結合アッセイを含むがこれらに限定されない。

【0148】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はADCCなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、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。インビボ及び／又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、CDC及び／又は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結合を欠損している(すなわちADCC活性を欠損していると思われる)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、FcγRIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血系細胞でのFcR発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5500362号又は同第5821337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には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等の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に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に結合できない、つまり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等、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結合及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うことができる。

【0149】

抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennanら, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Fab、Fv及びScFv抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模生産が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したFab及び

F(a b')₂断片は米国特許第5869046号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscFvは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である；したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

10

【0150】

ヒト化抗体

本発明は、ヒト化抗体を含む。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が従来技術に既知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトのソースからそれに導入された一以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「重要な」残基と呼ばれ、一般に「重要な」可変ドメインに由来する。ヒト化は、基本的にヒト抗体の該当する配列を高頻度可変領域配列で置換することにより、Winter及び共同研究者(Jones等(1986)Nature 321:522-525；Riechmann等(1988)Nature, 332:323-327；Verhoeyen等(1988)Science 239:1534-1536)の方法に従って実施される。よって、このような「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分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基が、及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

20

【0151】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽鎖及び重鎖いずれも、抗原性を減らすために重要である。いわゆる「最良に適合する(ベストフィット)」方法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる(Sims等(1993)J. Immunol. 151:2296；Chothia等(1987)J. Mol. Biol. 196:901)。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列から得られた特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを複数の異なるヒト化抗体に使用することができる(Carter等(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Presta等(1993)J. Immunol., 151:2623)。

30

更には、抗体は、抗原に対する高い親和性及びその他の望ましい生物学的特性を保持してヒト化されることが一般に好ましい。この目的を達成するために、一方法では、親の配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び様々な概念上のヒト化産物を分析するプロセスにより、ヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当技術分野の当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の、有望な三次元立体配置的構造を図解及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。このような表示を検査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際に残基が果たすと思われる役割を分析することができ、つまり候補免疫グロブリンの、その抗原に対する結合能に影響する残基を分析することができる。このように、レシピエント及び重要な配列からFR残基を選択して組み合わせることにより、所望の抗体特性、例えば標的とする抗原に対する親和性の増大を達成することができる。一般に、高頻度可変領域残基は、抗原の結合に対する影響に、直接的に且つ最も有意に関わっている。

40

【0152】

ヒト抗体

本発明のヒト抗ポリユビキチン抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択したFvクローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル

50

抗ポリユビキチン抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及びBoerner 等, J. Immunol., 147: 86 (1991)によって記載されている。

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555(1993); Jakobovits等, Nature 362, 255-258(1993)を参照のこと。

【0153】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性および特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、上記のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖/ヒト鎖 scFvないし Fab キメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラ scFvないし Fab が単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日公開のPCT特許出願WO 93/06213を参照)。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

【0154】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒト抗体ないしヒト化抗体である。特定の実施形態では、結合特異性の一つは特定のリジン連鎖を含むポリユビキチンに対するものであり、他は他の任意の抗原に対するものである。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、2つの異なるリジン連鎖を含む2つの異なるポリユビキチンに結合しうる。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えば $F(ab')_2$ 二重特異性抗体)として調製することができる。

【0155】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millsteinら, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が1993年5月13日に公開の国際公報93/08829及びTrauneckerら, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

異なる実施形態によれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は、例えば、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。特定の実施形態では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH

1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0156】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にはしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。界面は抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0157】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公報91/00360、国際公報92/00373及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

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

【0158】

最近の進歩により大腸菌からF(ab')₂-SH断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体を形成する。Shalaby等、J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生について記述している。各々のF(ab')₂断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、HER2を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことがで

きた。

【0159】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelnyら, J.Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b ' 部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v (s F v)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruberら, J.Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

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

【0160】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び／又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(I g Mクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。二量化ドメインは、例えば、F c 領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はF c 領域と、F c 領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。一実施形態では、多価抗体は、例えば、3ないし8、又は4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(例えば2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はV D 1 -(X 1) n -V D 2 -(X 2) n -F c を有し、ここでV D 1 は第1の可変ドメインであり、V D 2 は第2の可変ドメインであり、F c はF c 領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1 及びX 2 はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：V H -C H 1 -柔軟なリンカー-V H -C H 1 -F c 領域鎖；又はV H -C H 1 -V H -C H 1 -F c 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、少なくとも2つ(例えば4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有することができる。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはC L ドメインを更に有する。

【0161】

抗体変異体

一部の実施態様では、ここで記載の抗体のアミノ酸配列の修飾を考察する。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性が改善されることが望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、適当なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び／又は挿入及び／又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終コンストラクトに達するまでなされるが、その最終コンストラクトは所望の特徴を有する。アミノ酸変化は、配列を作製する時点で対象とする抗体のアミノ酸配列に導入してもよい。

突然変異のための好ましい位置にある抗体の特定の残基又は領域の同定のために有用な

方法は、Cunningham及びWells (1989) Science 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され(例えば、arg、asp、his、lys及びglu等の荷電残基)、中性又は負荷電アミノ酸(例えばアラニン又はポリペプチドアニリン)に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。次いで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更に又は他の置換を導入することにより精密にされる。即ち、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、alaスキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

10

【0162】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び／又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基によって置換された抗体分子に少なくとも一つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異について最も対象となる部位は高度可変領域を含むが、FR変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表Aに示す。これらの置換により生物学的活性に変化が生じる場合、表Aに「例示的置換」と称した又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてよい。

20

【0163】

表A

元の残基	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; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; 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

【 0 1 6 4 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))

- ：
- (1) 無極性：Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
 - (2) 無電荷極性：Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
 - (3) 酸性：Asp (D), Glu (E)
 - (4) 塩基性：Lys (K), Arg (R), His(H)

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5)鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；及び

(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。このような置換された残基も、保存的置換部位か、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

【0165】

一つの種類の置換による変異体は、親抗体(例えばヒト化抗体又はヒト抗体)の一以上の高頻度可変領域残基を置換することを含む。一般に、更なる開発用に選択される結果として得られた変異体の生物学的特性は、それらが生成された親抗体と比べて変更(例えば改善)される。このような置換による変異体を生成する便利な方法では、ファージディスプレイを用いた親和性成熟を使用する。簡単には、複数の高頻度可変領域部位(例えば6～7の部位)を変異させることにより、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生じさせる。このようにして生成された抗体は、各粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質(例えば、M13の遺伝子III産物)の少なくとも一部への融合物として、糸状のファージ粒子から表示される。次いで、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書に開示されるように、その生物学的活性(例えば結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、系統の変異導入法(例えばアラニンスキャニング)を行って、抗原結合に有意に貢献する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又は付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することにより、抗体と抗原との接触点を同定することが有効である。このような接触残基隣接残基は、従来技術に既知の技術による置換の候補であり、それにはここに説明するものが含まれる。そのような変異体が生成されたら、本明細書に記載のものを含む従来技術に既知の技術を用いて変異体パネルのスクリーニングを行い、更なる開発のために一以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体を選択することができる。

【0166】

従来技術に既知の様々な方法により、本抗体の、アミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を調製した。これらの方法は、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)突然変異による調製、PCR突然変異誘発、及び前もって調製された変異体又は抗体の非変異バージョンのカセット変異導入法を含むが、これらに限定されない。

本発明の抗体のFc領域に一以上のアミノ酸修飾を導入することにより、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのアミノ酸位置を含む一以上のアミノ酸位置に一のアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含みうる。

本明細書及び従来技術の教示によれば、一部の実施態様では、本発明の抗体は、対応する野生型の抗体と比較した場合、例えばFc領域内に、一以上の変更を有すると考えられる。それでも、これらの抗体は、その野生型の同等物と比較した場合、治療的有効性に必要なほぼ同一の特性を保持している。例えば、国際公開第99/51642号等に記載されているように、Fc領域に、C1q結合及び／又は補体依存性細胞障害性(CDC)に変化(つまり効果の改善又は低減)をもたらす特定の変更を実施することが考慮される。Fc領域の変異体の他の例に関し、Ducan及びWinterによるNature 322:738-40 (1998)；米国特許第5648260号；同第5624821号；及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドのインターフェースに変更を含む抗体を提供し、この場合前記変更によりヘテロ二量体化が促進及び／又は増長される。これらの変更には、第1のFcポリペプチドへの隆起の導入及び第2のFcポリペプチドへの空洞の導入を含み、前記隆起が前記空洞に配置可能であることにより、第1及び第2のFcポリペプチドの複合が促進される。このような変更を有する抗体の生成方法は、米国特許第5731168号に記載のように、従来技術に既知である。

【0167】

免疫コンジュゲート

別の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞障害剤にコンジュゲートした抗体を含んでなる、免疫コンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を提供する。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (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等(編), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandler等(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler等(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler等(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第 1 3 9 1 2 1 3 号; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等 (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等 (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

【0168】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリットモマブチウキセタン(ibrutinomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1κモノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等 (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhucd33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 米国特許第 4 9 7 0 1 9 8 号; 同第 5 0 7 9 2 3 3 号; 同第 5 5 8 5 0 8 9 号; 同第 5 6 0 6 0 4 0 号; 同第 5 6 9 3 7 6 2 号; 同第 5 7 3 9 1 1 6 号; 同第 5 7 6 7 2 8 5 号; 同第 5 7 7 3 0 0 1 号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuc242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)を、CanAgを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療について試験する。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療用に試験する。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタ

10

20

30

40

50

チン(MMA E)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体 c B R 9 6 (癌細胞上のルイス Y に特異的)及び c A C 1 0 (血液系悪性腫瘍上の C D 3 0 に特異的)(Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

【0169】

免疫コンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(上記)に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデクシン(modeccin) A 鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及び PAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。抗体及び細胞障害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-

14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びC C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0170】

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の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る(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる

共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0171】

メイタンシノイド薬剤分子の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3及びDM4が含まれる。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等、Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【0172】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗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5208020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述の非特許文献に開示されている。メイタンシノイドは、限定するものではないが、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体を含む。

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235号B1、Chari等、Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960602(2005年8月4日に発行の米国公開2005/0169933)(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に開示されているもの等を含め、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、2004年10月8日に出願の米国公開特許第10/960602号に開示されるように調製されうる。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

【0173】

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(SPPD)、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デートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデ

ヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。カップリング剤には、限定されるものではないが、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。一実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0174】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、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本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分DE及びDFを含み、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国特許第10/983340号(2005年10月27日に発行の米国公開2005/0238649)に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に組み込まれる。

【0175】

例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAE及びMMAFである。それ以外の例示的な実施態様には、MMAE又はMMAF、及び様々なリンカー成分(後述で更に説明)であるAb-MC-vc-PAB-MMAF、Ab-MC-vc-PAB-MMAE、Ab-MC-MMAE及びAb-MC-MMAFが含まれる。

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。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の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬剤成分は、US 5635483; US 5780588; Pettit等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及びPettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863の方法に従って調製されうる。また、Doroni na (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国公開特許第10/983340号も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる(例えば、リンカー及びモノメチルバリン化合物、例えばMMAE及びリンカーにコンジュゲートしたMMAFの調整方法を開示している)。

【0176】

カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-アセチル- γ_1^1 、PSAG及び θ^1_1 (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0177】

他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾisin、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

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

本発明は、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又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【0178】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば tc^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0179】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(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デート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、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等、Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

10

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMP S、EMC S、GMB S、H B V S、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMC S、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyl-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

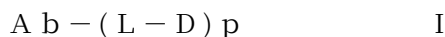
20

【0180】

抗体薬剤コンジュゲートの調製

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態及び試薬を用いて調製される：(1) 共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2) 共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

30



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、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」)、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」)、及び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」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に出願した米国公開特許第10/983340号を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

40

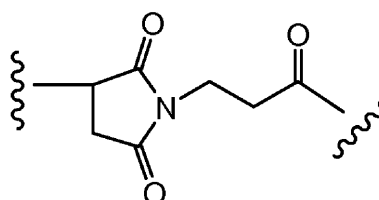
【0181】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(

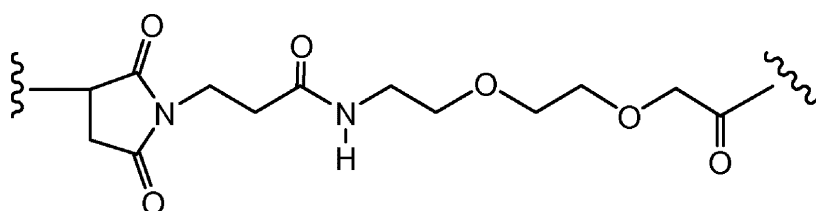
50

【 0 1 8 2 】

10

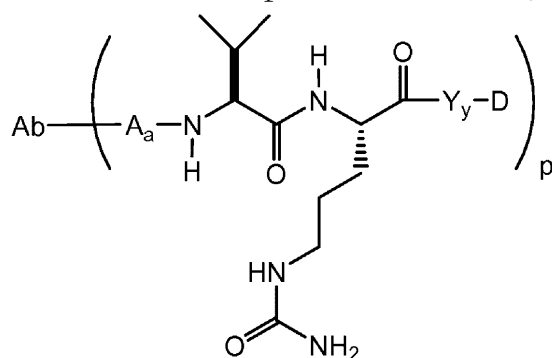


20

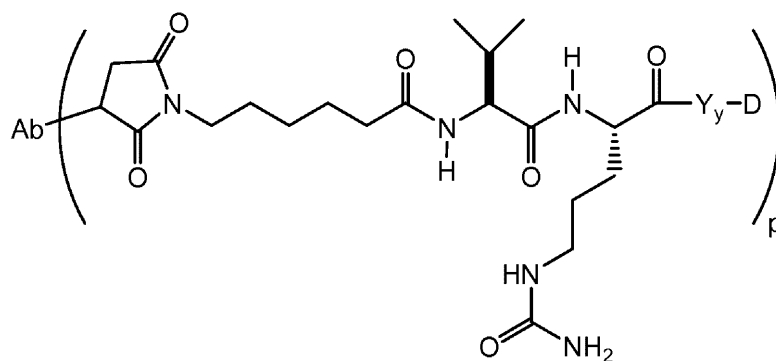


30

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(Ab)及びリンカーが示されており、pは1～約8である)：

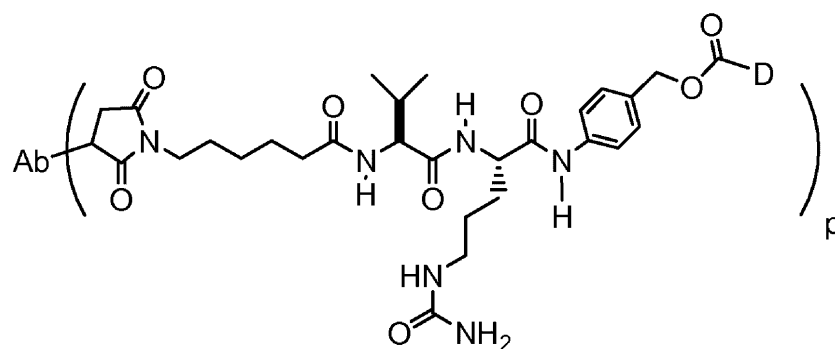


40



MC-val-cit

10



MC-val-cit-PAB

20

【0184】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及びリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド群、が含まれる。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、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。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)を用いてリシン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又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

30

【0185】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。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剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又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、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何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、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & S

40

50

troh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146 ; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

【0186】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合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及びアリールヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えばNHSESTER、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物)；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

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

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

【0187】

抗体(Ab)-MC-MMAEは、本明細書中に提供される何れかの抗体と以下のMC-MMAEとのコンジュゲートにより調製されうる。抗体は、pH8.0の500mM ホウ酸ナトリウムと500mM 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の100mM ジチオトレイトール(DTT)で処理した。37℃で30分インキュベートした後、Sephadex G25樹脂で溶出することによって、バッファーを交換して、1mM DTPAを含むPBSにて溶出した。溶液の280nmの吸光度とDTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて412nmの吸光度の測定によるチオール濃度から減少した抗体濃度を決定することによって、チオール/Ab値を調べる。PBSに溶解した減少した抗体を氷上で冷やす。薬剤リンカー試薬であるマレイミドカプロイル-モノメチルアウリスチンE(MMAE)、すなわちMC-MMAEをDMSOに溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やした減少した抗体2H9を含むPBSに添加する。およそ1時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって、濃縮し、2H9-MC-MMAEを精製して、PBSのG25樹脂による溶出によって、脱塩して、無菌条件下で0.2mmのフィルターに濾過して、保存のために凍結した。

【0188】

抗体-MC-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAEは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAEと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-SMCC-DM1は、以下のSMCC-DM1と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、(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, Pierce Biotechnology, Inc)で誘導体化して、SMCCリンカーを導入する。具体的には、50mM リン酸カリウム/50mM 塩化ナトリウム/2mM EDTA、pH6.5中で、7

． 5モル等量のSMCC(DMSO中に20mM、6.7mg/ml)にて20mg/mlの抗体を処理した。室温のアルゴン下で2時間攪拌した後に、反応混合物を、50mMリン酸カリウム/50mM塩化ナトリウム/2mMEDTA、pH6.5にて平衡化したSephadex G25カラムにてろ過する。抗体を含有する分画をプールして、アッセイする。

【0189】

このようにして調製される抗体-SMCCは、50mMリン酸カリウム/50mM塩化ナトリウム/2mMEDTA、pH6.5で希釈して、最終濃度およそ10mg/mlとし、10mMのDM1の溶液を含むジメチルアセトアミドにて反応させる。反応は、16.5時間に亘り、室温、アルゴン下にて攪拌して行う攪拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、pH6.5の1×PBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5×4.9cm)にろ過する。252nmと280nmの吸光度で測定されるように、抗体に対するDM1薬剤の比率(p)はおよそ2～5でありうる。

Ab-SPP-DM1は、本明細書中で提供される何れかの抗体と以下のSPP-DM1とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、ジチオピリジル基を導入するために、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエートによって、誘導体化される。NaCl(50mM)及びEDTA(1mM)を含有する44.7mlの50mMリン酸カリウムバッファー(pH6.5)中の抗体(376.0mg、8mg/ml)を、SPP(2.3mlエタノール中に5.3のモル等量)にて処理した。室温、アルゴン下にて90分間インキュベートした後、反応混合物を、35mMのクエン酸ナトリウム、154mM NaCl、2mMEDTAバッファーにて平衡化したSephadex G25カラムにろ過する。抗体含有分画をプールして、アッセイした。抗体の修飾の程度は、上記の通りに決定される。

【0190】

抗体-SPP-Py(およそ10mmolの解放可能な2-チオピリジン基)を上記の35mMクエン酸ナトリウムバッファー、pH6.5にて希釈して、およそ2.5mg/mlの終濃度にした。次いで、DM1(1.7等量、17mmole)を含む3.0mMのジメチルアセトアミド(DMA、最終反応混合物中3%v/v)を抗体溶液に添加する。およそ20時間、室温、アルゴン下にて反応を行う。反応物を、35mMクエン酸ナトリウム、154mM NaCl、pH6.5にて平衡化したセファクリルS300ゲル濾過カラム(5.0cm×90.0cm、1.77L)に流す。流速はおよそ5.0ml/分で行く、65の分画(各々20.0ml)を回収する。抗体分子当たりの結合されるDM1薬剤分子の数(p')は、252nm及び280nmの吸光度を測定して決定し、抗体当たりのDM1薬剤成分をおよそ2～4としてもよい。

抗体-BMPEO-DM1は、本明細書中に示される何れかの抗体と以下のBMPEO-DM1とのコンジュゲートにより調製される。抗体を、ビスマレイミド試薬BM(PEO)4(Pierce Chemical)にて修飾して、抗体の表面上の反応していないマレイミド基を除去する。これは、BM(PEO)4を50%のエタノール/水混合液に10mMの濃度になるまで溶解して、およそ1.6mg/ml(10マイクロモル)の濃度でリン酸緩衝食塩水に抗体を含有する溶液に10倍のモル過剰量を加え、1時間反応させて、抗体-リンカー中間生成物である2H9-BMPEOを形成させることにより達成される。150mMのNaClバッファーと0mMのクエン酸塩、pH6のゲル濾過(HiTrap column, Pharmacia)によって、過剰なBM(PEO)4を取り除く。およそ10倍のモル過剰DM1を、ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解して、2H9-BMPEO中間生成物に加える。また、ジメチルホルムアミド(DMF)を用いて薬剤成分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させて、PBSでゲル濾過ないし透析を行って反応していないDM1を取り除く。PBSのS200カラムによるゲル濾過を用いて、高分子量凝集塊を取り除いて、精製された2H9-BMPEO-DM1に供給する。

【0191】

抗体誘導体

10

20

30

40

50

本発明の抗体を更に変更し、従来技術に既知で容易に入手可能な非タンパク質性成分を更に含有させる。一実施態様では、抗体の誘導体化に適した成分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されないが、ポリエチレングリコール(P E G)、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、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-トリオキサン、エチレン／マレイン無水物共重合体、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムな共重合体)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、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、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレ
10
ングリコールプロピオンアルデヒドは、水に対する適性を有しており、製造するのに有利である。ポリマーは任意の分子量を有することができ、分枝していてもしていなくともよい。抗体に付着しているポリマーの数は変動し、複数のポリマーが付着している場合、それらは同じ分子であるか、又は異なる分子である。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が決まった条件の下に治療に使用されるかどうか等を含むがこれらに限定されない検討材料に基づいて決定される。

別の実施形態では、放射線照射に暴露することにより選択的に加熱することができる非タンパク質性部分と抗体とのコンジュゲートが提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分はカーボンナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-1
20
1605 (2005))。照射はどのような波長のものでもよく、限定するものではないが、通常の細胞を傷つけないが、非タンパク質性の部分を抗体-非タンパク質性部分に近接する細胞が死滅する温度まで加熱する波長を含む。

【0192】

薬学的製剤

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharm
30
aceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(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；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子
40
量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0193】

ここでの製剤は、限定しないが、互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものを含め、治療される特定の徴候のために必要ならば一以上の活性化化合物も含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒
50

子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0194】

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の免疫グロブリンを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37℃の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【0195】

使用

本発明の抗体を、例えば、インビトロ、エクスビボ及びインビボの治療法に用いてもよい。本発明の抗体をアンタゴニストとして使用し、インビトロ、エキソビボ及び／又はインビボにおいて、特定の抗原活性を部分的又は完全に遮断することができる。更に、本発明の少なくともいくつかの抗体は、他の種由来の抗原活性を中和することができる。従って、本発明の抗体を使用することにより、抗原を含む細胞培養物、或いはヒト被験者又は本発明の抗体と交差反応する抗原を有する他の哺乳類の被験体(例えばチンパンジー、ヒヒ、マモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)において特定の抗原活性を阻害することができる。一実施態様では、本発明の抗体は、抗体に抗原を接触させて抗原活性を阻害することにより、抗原活性を阻害するために使用することができる。一実施態様では、抗原はヒトタンパク質分子である。

一実施態様では、本発明の抗体は、抗原活性が有害な疾患に罹患している被験体の抗原を阻害する方法に使用することができる。この方法では、本発明の抗体を被験体に投与することにより、被験体の抗原活性を阻害する。一実施態様では、抗原はヒトタンパク質分子であり、被験体はヒト被験者である。或いは、被験体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現している哺乳動物とすることができる。更には、対象は、(例えば、抗原の投与によるか、又は抗原導入遺伝子の発現により)抗原が導入された哺乳動物でもよい。本発明の抗体は、治療的目的のためにヒト被験者に投与することができる。更に、獣医学的な目的のために、又はヒトの疾病の動物モデルとして、当該抗体に交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳動物(例えば霊長類、ブタ又はマウス)に本発明の抗体を投与することができる。動物モデルに関して言えば、このようなモデルは、本発明の抗体の治療有効性を評価するために有用であり得る(例えば、投与量及び時間経過の試験)。本発明の抗体は、ポリユビキチン及びポリユビキチン化したタンパク質の異常発現及び／又は活性に関連する疾病、障害又は症状を、治療、阻害、進行を遅延、再発を予防／遅延、寛解、或いは予防に使用することができ、前記疾病、障害又は症状には、癌、筋疾患、ユビキチン経路に関連する遺伝的疾患、免疫異常／炎症性疾患、神経障害、及びその他ユビキチン経路に関連す

る疾患が含まれるがこれらに限定されない。

【0196】

一態様では、本発明の阻止抗体は、特定のリジン連鎖を有するポリユビキチンに特異的であり、特定のリジン連鎖を有するポリユビキチンと、ポリユビキチンと相互作用するタンパク質との相互作用による遮断又は妨害により、正常なポリユビキチン活性を阻害し、それによって対応するシグナル伝達経路及びその他関連分子又は細胞イベントを阻害する。

ある実施態様では、一の細胞障害性剤とコンジュゲートした抗体を含んでなる免疫コンジュゲートを患者に投与する。いくつかの実施態様では、免疫コンジュゲート及び／又はそれが結合する抗原が細胞に内在化されていると、結合する標的細胞を殺す際の免疫コンジュゲートの治療効果が増す。一実施態様において、細胞障害性剤は標的細胞内の核酸を標的とするか又は妨げる。このような細胞障害性剤の例には、本明細書に記載の何れかの化学療法剤(例えばメイトンシノイド、又はカリケアマイシン)、放射性同位元素、又はRNA分解酵素ないしDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

【0197】

本発明の抗体は、単独で、又は、他の組成物と組み合わせて治療に用いることができる。例えば、本発明の抗体は、他の抗体、及び／又はアジュバント／治療薬(例えばステロイド)と同時に投与してもよい。例えば、本発明の抗体は、治療計画において、例えば癌、筋疾患、ユビキチン経路に関連する遺伝的疾患、免疫異常／炎症性疾患、神経障害、及びその他ユビキチン経路に関連する疾患を含む、本明細書に記載するいずれかの疾病の治療において、抗炎症薬及び／又は消毒薬と組み合わせてもよい。上記の併用治療には、併用投与(2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に包含される)及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体は補助治療(一又は複数)の前及び／又はその後に投与することができる。

本発明の抗体(及び補助治療薬)は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、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好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体を、特に抗体の用量を減少して、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、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

【0198】

抗体の調製及び投与において、本発明の抗体の結合標的の位置を考慮することができる。結合標的が細胞内分子である場合、本発明の特定の実施形態では、結合標的が位置する細胞に導入される抗体又はその抗原結合断片が提供される。一実施形態では、本発明の抗体は、細胞内に細胞内抗体として発現させることができる。本明細書で使用する「細胞内抗体(intrabody)」という用語は、Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); U.S. Patent Nos. 6,004,940 and 6,329,173; U.S. Patent Application Publication No. 2003/0104402, and PCT Publication No. WO2003/077945に記載のように、標的分子に特異的に結合することができる、細胞内で発現される抗体又はその抗原結合タンパク質を指す。細胞内抗体の細胞内発現は、標的細胞内に、所望の抗体をコードする核酸又はその抗原結合タンパク質(当該抗体又は抗原結合断片をコードする遺伝子に通常関連付けられる野生型リーダー配列及び分泌性シグナルを欠いている)を導入することにより達成することができる。細胞に核酸を導入するための何らかの標準的方法を使用することができ、これらの方法には、限定するものではないが、微量注入、弾道的注入、電気泳動、リン酸カルシウム沈降、リポソーム、及び対象の核酸を有するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス及びワクシニアベクターによる形質移入が含まれる。本発明の抗ポリユビキチン抗体の全部又は一部をコードする一以上の核酸を標的細胞に送達することにより、ポリユビキチンに細胞内で結合し、一以上のポリユビキチン媒介性細胞経路を調節できる、一以上の細胞内抗体を発現させることができる。

別の実施形態では、内部移行する抗体が提供される。抗体は、細胞内への抗体の送達を増強する特定の特徴を有することができるか、又はそのような特徴を有するように修飾することができる。これを達成する技術は従来技術に既知である。例えば、抗体のカチオン化は、細胞内へのその取り込みを容易にすることが知られている（例えば、米国特許第6703019号参照）。リポフェクション又はリポソームも、細胞内に抗体を送達するために使用することができる。抗体断片を使用する場合、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抑制性断片が一般に有利である。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的のタンパク質配列に対する結合能を有するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成することができる、及び／又は組換えDNA技術によって製造することができる。例えば、Marasco等、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 90: 7889-7893 (1993)を参照されたい。

10

【0199】

標的細胞への修飾因子ポリペプチドの移入は、従来技術に既知の方法によって増強することができる。例えば、HIV Tat又はアンテナペディアホメオドメインタンパク質由来の配列のような特定の配列は、細胞膜全体に異種タンパク質の効率的な取り込みを導くことができる。例えば、Chen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329参照。

結合標的が脳に位置する場合、本発明の特定の実施形態は、血液脳関門を横切る抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の神経変性疾患は、血液脳関門の透過性の増大に関連しており、これにより抗体又は抗原結合断片を脳に容易に導入できる。血液脳関門が完全に保持されているとき、そこに分子を搬送するための複数の従来技術に既知の手法が存在し、それらには、限定するものではないが、物理的方法、脂質に基づく方法、及びレセプターとチャンネルに基づく方法が含まれる。

20

【0200】

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送する物理的方法には、限定するものではないが、血液脳関門を完全に包囲すること、又は血液脳関門に開口部を形成することが含まれる。包囲法には、限定するものではないが、脳への直接注入（例えば、Papanastassiou等、Gene Therapy 9: 398-406 (2002)）、間質性注入／対流強化送達（例えば、Bobo等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)参照）、及び脳への送達装置の移植（例えば、Gill等、Nature Med. 9: 589-595 (2003)；及びGliadel WafersTM, Guildford Pharmaceutical参照）が含まれる。関門に開口を形成する方法には、限定するものではないが、超音波（例えば、米国特許出願公開第2004/0038086号参照）、浸透圧（例えば、高浸透圧性マンニトールの投与による（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)））、例えば、ブラジキニン又はパーミアライザーA-7による透過性化（例えば、米国特許第5112596号、同第5268164号、同第5506206号、及び同第5686416号参照）、及び抗体又は抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門にまたがるニューロンの形質移入（例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号）が含まれる。

30

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送する脂質に基づく方法には、限定されるものではないが、血液脳関門の血液内皮上のレセプターに結合する抗体結合断片に連結されるリポソームに抗体又は抗原結合断片を封入すること（例えば、米国特許出願公開第2002/0025313号参照）、及び低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開第2004/0204354号参照）、又はアポリポタンパク質E（例えば、米国特許出願公開第2004/0131692号参照）中の抗体又は抗原結合断片をコーティングすることが含まれる。

40

【0201】

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送するレセプター及びチャンネルに基づく方法には、限定するものではないが、グリコシルコイド遮断薬を用いて血液脳関門の透過性を増大させること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、同第200

50

3/0162695号、及び同第2005/0124533号参照)、カリウムチャネルを活性化させること(例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号参照)、ABC薬の搬送を抑制すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0073713号参照)、抗体をトランスフェリンでコーティングし、一以上のトランスフェリンレセプターの活性を調節すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号参照)、及び抗体のカチオン化(例えば、米国特許第5004697号参照)が含まれる。

本発明の抗体組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1~99%で、或いは経験的/臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

【0202】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体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、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$)の抗体を、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与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 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の一以上の用量を(又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、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

【0203】

製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療、予防及び/又は診断するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択された症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、(a)本発明の抗体を含有する組成物の中に収容する第一の容器；と(b)更なる細胞障害剤又はそれ以外の治療薬を含有する組成物の中に収容する第二の容器とを含む。本発明のこの実施態様における製造品は、組成物を特定の症状の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくはは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容

器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0204】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上記に示す一般的な説明により、様々な他の実施態様が実施しうることは理解される。

【実施例】

【0205】

実施例1：第一世代抗ポリユビキチン抗体の単離と性質決定

A) ライブラリ分類

ナイーブ抗体ライブラリからのファージを、K48-連鎖性ポリユビキチン又はK63-連鎖性ポリユビキチンを模倣するイソペプチド結合を含む固定した合成ペプチドに対して結合選別を行った。6ラウンドの選別の後に濃縮は観察されなかった。合成ペプチドを長くして、ナイーブ抗体ライブラリを再びスクリーニングした。またしても6ラウンドの結合選別の後に濃縮は観察されなかった。

ナイーブY S-B抗体ライブラリからのファージを、異なる公知のユビキチンイソペプチド結合を有するポリユビキチン鎖に対して、4ラウンドの結合選別を行った。Y S-B抗体ライブラリは、3つすべての重鎖CDRと軽鎖CDR3にランダムなアミノ酸を含有し(米国公開特許第2005-0106667号を参照)、ヒト化抗体4D5をベースとしている。

【0206】

酵素的に合成した3〜7ユニット長の完全長K48-連鎖性又はK63-連鎖性のポリユビキチン鎖(Boston Biochem)を、96ウェルMaxisorpイムノプレート(NUNC)に固定した。5µg/mlのK48-連鎖性又はK63-連鎖性のポリユビキチンを含む50mM炭酸バッファ、pH9.6にてプレートを終夜をかけてコートした。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にてコートプレートを洗浄し、PBSにて0.2%の濃度のウシ血清アルブミン(BSA)又はカゼインにて反応を止めた。その後、0.05% Tween20を含有するPBS(PBST)にて25℃でプレートを洗浄した。100µlの10¹²ファージ/mlの分類バッファ(BSA又はカゼイン、0.2%のPBST)とともに各ウェルを室温で2時間インキュベートした。各ウェルをPBSTにて8回洗浄して非結合ファージを除去した。結合したファージは0.1M HClとともに10分間インキュベートして溶出し、溶離液を2M トリス塩基にて中和した。溶出したファージを、M13-KO7ヘルパーファージ(New England Biolabs)を添加した大腸菌XL1-ブルー(Stratagene)において増やした。

前のラウンドで用いた同じ標的に対する更なる選別ラウンドに、増幅したファージを用いた。選別ラウンド2〜4では、対抗選択として分類バッファに10µg/ml ユビキチンを含めた。また、ラウンド3および4は付加的な対抗選択がある場合とない場合の両方で分類した：K48-連鎖性ポリユビキチン選別では10µg/ml K63-連鎖性ポリユビキチン又はK63-連鎖性ポリユビキチン選別では10µg/ml K48-連鎖性ポリユビキチンのいずれか。

【0207】

選別ラウンド2〜4がポリユビキチン対抗選択を欠いた場合のそれらのクローンでは、個々のクローンを、カルベニシリンおよびM13-KO7ヘルパーファージを添加した400µlの2YT培養液を含む96ウェルフォーマットにて生育させた。それらの培養物の上清をハイスループットファージELISAに用いて、K48-連鎖性ポリユビキチン、K63-連鎖性ポリユビキチン、ユビキチンおよびBSAに対する結合についてクローンをスクリーニングした。すべてのクローンはDNA配列分析を行った。HVRを含む一部の重鎖を配列決定し、重鎖高頻度可変領域の分析を行った。K48-連鎖性ポリユビキチン又はK48-連鎖性及びK63-連鎖性の両方のポリユビキチンを認識するクローンの重鎖高頻度可変領域を図2A-Cに示す。K63-連鎖性ポリユビキチン又はK48-連鎖性及びK63-連鎖性の両方のポリユビキチンを認識するクローンの重鎖高頻度可変領域

を図3Aおよび3Bに示す。各クローンの軽鎖HVRは配列決定しなかったが、Y S-Bライブラリの性質に基づき、HVR-L1及びHVR-L2の配列は不変であると予測されたのに対して、HVR-L3配列はクローン特異的であることが予測された。ライブラリ設定に従うと、HVR-L1配列はR A S Q S V S S A V A (配列番号：79)であり、HVR-L2配列はS A S S L Y S (配列番号：80)である。すべてのクローンは、同じ重鎖および軽鎖フレームワーク配列を有した(図6を参照)。

選別ラウンド2～4において、クローンの異なる一群は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の異なるリジン連鎖のポリユビキチン(K48-連鎖性ポリユビキチン又はK63-連鎖性ポリユビキチン)による対抗選択を含んだ。14選別ラウンドから溶出したファージの $10\mu\text{l}$ を用いて、20分間の大腸菌CJ236の成長に影響を与え、次いでカルベニシリンを含有する固形アガー上で終夜生育させた。カルベニシリンおよびクロラムフェニコールを添加した15ミリリットルの2YT培養液をプレートに加え、ファジミドを含有するCJ236細胞を再懸濁した。M13-KO7ヘルパーファージを加えた。攪拌しながら 37°C で1時間インキュベートした後、2.5mlの懸濁液をカルベニシリンおよびカナマイシンを添加した250mlの2YT培養液に加えた。懸濁液を終夜生育させた。

【0208】

ファージはポリエチレングリコール沈殿にて回収し、キュンケルDNAはM13スピニングキット(Qiagen)を用いて単離した。 $1\mu\text{g}$ のキュンケル鋳型を、オリゴヌクレオチドF1560-2(TCTTGTGACAAAACCTACCATCACCATCACCATCACTA GGGCGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTT) (配列番号：150)によるキュンケル突然変異誘発法に用いた(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)を参照)。突然変異誘発反応物を大腸菌XL1-Blueに形質転換させ、カルベニシリンを含有する固形アガー上で終夜生育させた。次いで、個々のクローンをピックアップし、上記のように生育し、上記の通りにファージELISAにおいてK48-連鎖性及びK63-連鎖性のポリユビキチン、モノユビキチン、BSA、及び抗ペンタHis抗体(Qiagen)に対してスクリーニングした。K48-連鎖性ポリユビキチンに特異的である、又はK63-連鎖性ポリユビキチンに特異的であることが同定されたクローンをDNA配列分析した。高頻度可変領域HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3のアミノ酸配列を図8A-C(K48-連鎖性ポリユビキチンに特異的)および図9Aおよび9B(K63-連鎖性ポリユビキチンに特異的)に示す。各クローンの軽鎖HVRは配列決定しなかったが、Y S-Bライブラリの性質に基づき、HVR-L1及びHVR-L2の配列は不変であると予測されたのに対して、HVR-L3配列はクローン特異的であることが予測された。ライブラリ設定に従うと、HVR-L1配列はR A S Q S V S S A V A (配列番号：79)であり、HVR-L2配列はS A S S L Y S (配列番号：80)である。すべてのクローンは、同じ重鎖および軽鎖フレームワーク配列を有した(図6を参照)。

【0209】

(B) Fab産生

Fab産生のために、ペンタヒスチジンタグ陽性の特定のクローンからのファージ上清を用いて大腸菌FF34B8に感染させた。この大腸菌FF34B8はXL1と交配させて選択固形培地にて培養することによって34B8株にF'エピソームを付加した細胞株である。感染した細胞をカルベニシリンを含有する固形アガー上に塗り広げ、終夜生育させた。ファジミドを含有するFF34B8の単一クローンをプレートからピックアップし、カルベニシリンを含有するLB中で 37°C で終夜生育させた。次いで、これらの培養物を用いて500mlのカルベニシリンを含有する完全CRAP培地($3.57\text{g}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 0.71g クエン酸ナトリウム・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、 1.07g KCl、 5.36g 酵母抽出物(certified)、 5.36g Hycase SF (Sheffield)、KOHを加えてpHを7.3に調整し、超純水にて872mlに量を調節し、オートクレーブにかけ、 55°C まで冷まし、L当たり110mlの1M MOPS pH7.3、11mlの50% グルコース、及び7mlの1M MgSO_4 を加えた)に播き、攪拌しながら 30°C で24時間生育した。遠心分離を行って細胞を回収し、細胞ペレットを -20°C で保存した。各細胞ペレットを $0.2\text{mg}/\text{ml}$ ライソザイム及び $0.3\text{U}/\text{ml}$ DNアーゼIを含有する35mlの

冷却洗浄バッファ(PBS+150mM NaCl)に再懸濁してFabを精製した。再懸濁した細胞ペレットを50mlの遠心チューブに移し、素早くボルテックスにかけ、25℃に45分置いた。ペレットを遠心分離して、溶菌液を4℃の洗浄バッファにて予め平衡化した1mlのプロテインG-セファロースカラムに添加した。50mlの冷却洗浄バッファにてカラムを洗浄し、3mlの0.1M 酢酸にて溶出し、150μlの2M トリス塩基にて中和した。溶出したFabをPBSにバッファ交換し、Centriprep 10遠心フィルター(Millipore)を用いて濃縮した。結果として生じたFab濃度を分光光度的に決定した($1\text{OD}_{280\text{nm}} = 1.55\text{mg/ml}$)。濃縮したFabを4℃で保存した。

【0210】

各FabをELISAタンパク質アッセイに含め、上記のように、K48-連鎖性及びK63-連鎖性のポリユビキチンに対する相対的な親和性を決定し、Fabがモノユビキチン又はBSAと反応しないことを確認した。Fabapu01-15は、K63-連鎖性ポリユビキチンに対するよりK48-連鎖性ポリユビキチンに対してより大きな特異性を有していた。Fabapu17-apu24は、ELISAにおいてK48-連鎖性ポリユビキチンに対するよりK63-連鎖性ポリユビキチンに対してより大きな特異性を示した。Apul6はFabとして産生されなかった。

すべてのFabをDNA配列分析した。K48-連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合した各々のFabの高頻度可変領域HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3のアミノ酸配列を図10A-Cに示す。K63-連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合した各々のFabの高頻度可変領域HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3のアミノ酸配列を図11A-Cに示す。各Fabの重鎖および軽鎖フレームワーク配列を図6に示す。ライブラリ設定(上で、配列番号:79および80が、知る)に記載の、第一2の軽鎖高度変異部(HVR-L1およびHVR-L2)は、各々のクローンで同一だった。

【0211】

(C) 単離したFabの親和性分析

ユビキチンおよびそのリジン-連鎖性型に対する選択されたFab(上記のセクション(B)を参照)の親和性は、BIACORE(登録商標)3000システム(Biacore)を用いた表面プラスモン共鳴で測定した。およそ100共鳴単位のユビキチン、K48-連鎖性ないしはK63-連鎖性ジユビキチン、又はK48-連鎖性ないしはK63-連鎖性ポリユビキチン(鎖長3~7)を、製造業者が提供するアミンカップリングプロトコルを用いたCM5チップの異なるフローセルに固定した。各実験において、フローセル1を活性化し、タンパク質を固定せずにエタノールアミンにて反応を止め、参照、減算に用いた。apu01からapu24それぞれのFabタンパク質の段階希釈物(1.6-100nM)を各フローセルに対して注入した(総量50μl、流速25μl/分)。各フローセルのシグナルを記録し、参照シグナルを減算した。解離期間(5分)の後、チップ表面を13μlの20mM HClにて再生した。Fabapu09およびapu18の例示的な結合曲線を図12および13に示す。図12に示すように、Apu09はK48-連鎖性ポリユビキチンに結合するが、K63-連鎖性ポリユビキチンには結合しない。図13Aは、K48-連鎖性ポリユビキチンに対するapu18の結合曲線を示す。いくつかの結合が観察されるが、それは実質的に、K63-連鎖性ポリユビキチンに観察される結合よりも少ない(図13B)。各Fabについて同様の分析を行った。

反応速度定数と結合定数は製造業者によって提供されるソフトウェアを用いた非線形回帰分析によって同時に算出し、表Bに示した。表Bの「NB」なる文字は示した相互作用に結合が検出されなかったことを示す。表Bの「nd」なる文字は示した相互作用にデータが測定されなかったことを示す。結果から、ジユビキチンへの結合についての特定のFabの反応速度定数がポリユビキチンへの結合についてのものと非常に類似していることが示される。ゆえに、Fabは、2つのユビキチン成分間の特定のイソペプチド結合を認識するように思われる。

【0212】

表B：B I A C O R E (登録商標)分析によって測定される抗ポリユビキチン F a b の反応速度定数

	K48-連鎖性ポリユビキチン			K63-連鎖性ポリユビキチン			K48-連鎖性ジユビキチン			K63-連鎖性ジユビキチン		
	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)
Apu01	1.92×10^6	3.49×10^{-3}	1.82			NB	3.28×10^6	1.38×10^{-2}	4.20			NB
Apu02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5.46×10^5	6.96×10^{-3}	12.70			NB
Apu03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.79×10^5	5.33×10^{-3}	11.10	8.27×10^4	0.0112	135.00
Apu04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5.38×10^5	5.89×10^{-3}	10.90	3.70×10^5	0.0232	62.70
Apu05	1.69×10^6	4.16×10^{-3}	2.46			NB	3.70×10^6	1.46×10^{-2}	3.94			NB
Apu06	1.04×10^6	6.58×10^{-3}	6.31			NB	2.60×10^6	2.20×10^{-2}	8.5			NB
Apu07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.05×10^6	9.93×10^{-3}	9.49			NB
Apu08	9.04×10^5	8.71×10^{-3}	9.64			NB	1.12×10^6	0.0127	11.30			NB
Apu09	1.05×10^6	9.79×10^{-3}	9.36			NB	1.81×10^6	0.0169	9.32			NB
Apu 10	8.45×10^5	5.62×10^{-3}	6.65			NB	1.12×10^6	0.016	14			NB
Apu 11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.04×10^5	0.0177	19.60			NB
Apu 12	5.73×10^5	7.07×10^{-3}	12.30			NB	3.13×10^5	0.0108	34.50			NB
Apu 13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.15×10^5	0.016	139.00			NB
Apu 14	1.58×10^6	1.08×10^{-2}	6.85			NB	3.18×10^6	2.66×10^{-2}	8.35			NB
Apu 15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.91×10^5	7.31×10^{-3}	10.60	1.28	0.0212	1650.00
Apu 16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Apu 17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NB	nd	nd	NB
Apu 18	2.32×10^5	0.0169	72.80	1.09×10^6	8.17×10^{-3}	7.53	1.73×10^6	1.95×10^{-2}	11.30	1.69×10^6	1.75×10^{-2}	10.40
Apu18*							3.16×10^5	1.48×10^{-2}	46.90	1.01×10^6	1.54×10^{-2}	15.30
Apu 19			NB			NB			NB			NB
Apu 20	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB			NB
Apu21	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB			NB
Apu22	nd	nd	nd	1.53×10^5	0.0191	125.00	6.19×10^5	1.28×10^{-2}	20.70	nd	nd	nd
Apu23	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB			NB
Apu24	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB			NB

※既に得られたK 6 3 -連鎖性ジユビキチン相互作用の反応速度定数を確認したA p u 1 8 の2回目のB i s c o r e 分析。

【0 2 1 3】

(D) ウェスタンブロット

テトラユビキチン(必要に応じてK 4 8 -連鎖性又はK 6 3 -連鎖性)とジユビキチン(K 4 8 -連鎖性又はK 6 3 -連鎖性)(Boston Biochem)をポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロースメンブレンに電氣的ブロッキングにより転移させた。0. 5 % Qiagen ブロッキング試薬(Qiagen)中でメンブレンを4℃で終夜インキュベートして、メンブレン上の非特異的結合部位をブロックした。ブロックしたメンブレンをminiblotter装置にお配置した。F a b クローン(1 μ g /ml)を、0. 5 % Qiagen ブロッキング試薬(Qiagen)中のメンブレンの連続切片にアプライした。1時間のインキュベート期間の後、メンブレンを洗浄した。メンブレンに結合した抗ユビキチン抗体を、製造業者の指示に従ってH R P -コンジュゲート抗ペンタヒスチジン抗体(Qiagen)を用いて明らかにした。

クローンa p u 0 1 からa p u 1 5 から産生されたK 4 8 -連鎖性ポリユビキチン特異的F a b は、ニトロセルロースに固定したK 4 8 -連鎖性テトラユビキチンに特異的に結合した(図19Bを参照)。クローンa p u 1 7 からa p u 2 4 から産生されたK 6 3 -連鎖性ポリユビキチン特異的F a b の、ニトロセルロースメンブレン上に固定したK 6 3 -連鎖性ポリユビキチンへの結合は観察されなかった(図19Aを参照)。

【0 2 1 4】

実施例2：第二世代抗ポリユビキチン抗体の単離と性質決定

F a b ディスプレイの第二世代ライブラリは、予め同定されたクローンa p u 0 5 (K

48-連鎖性ポリユビキチン選別)およびapu18(K63-連鎖性ポリユビキチン選別)をコードするファジミドから構築した(図10および11を参照)。これらのクローンからのファージを用いてCJ236細胞に感染させ、キュンケルDNA鋳型を調製した。その後、それらの鋳型に停止コドン挿入するように突然変異させ、以下のように停止含有鋳型をライブラリ構築に用いた。

【0215】

2つの異なるスキームに従ってFabapu05を突然変異させて、2つの異なるapu05-由来のライブラリを作製した。第一ライブラリではHVR-H3のみを突然変異させた。まず、HVR-H3をキュンケル鋳型に停止コドンを含むように修飾し、その後4つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを利用した突然変異誘発を行った。すべての場合での停止コドンコード化オリゴヌクレオチドはCGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTC AAGG (配列番号: 365)であった。初めの3つの突然変異原性オリゴヌクレオチドは3つの順列の同じ所望の配列であり、その1チロシン残基を固定し、各々の残るチロシン残基をNNS混合コドンセットを用いてランダム化した(このときNはG、C、A又はTに対応し、SはG又はCに対応する)。位置100bのアミノ酸は、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンから選択し、位置100aのアミノ酸は、グリシンおよびアラニンから選択し、そして、残りのアミノ酸はソフトランダム化した。この場合のソフトランダム化は、特定のヌクレオチド位は示した塩基が占める頻度の70%であり、他の3塩基のうちの1つが占める頻度の10%であったことを示す。このようなソフトランダム化が特定の塩基に含まれるオリゴヌクレオチドでは、ソフトランダム化の存在は塩基の位置での数字によって示す。「5」なる数は、塩基アデニンがその位置で70%の頻度で存在し、一方塩基グアニン、シトシン及びチミジンがそれぞれ10%の頻度で存在することを示す。同様に、「6」なる数はグアニン、「7」はシトシン、「8」はチミジンを指し、それぞれの場合において、他の3つの塩基それぞれは10%の頻度でしか存在しない。初めの3つの突然変異原性オリゴヌクレオチド配列は、CGTCTATTATTGTGCTCGC567TAC567NNSNNS567GSTWTSGACTA CTGGGGTCAAGG (配列番号: 367)、CGTCTATTATTGTGCTCGC567NNS567TACNNS567 GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 368)、及びCGTCTATTATTGTGCTCGC567 NNS567NNSTAC567GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 369)であった。4つ目の突然変異原性オリゴヌクレオチドには、NNS混合コドンセットを用いた位置96、98及び99のチロシンのランダム化;位置100bのアミノ酸のフェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンからの選別;位置100aのアミノ酸のグリシン及びアラニンからの選別、そして上記のソフトランダム化命名法に従った、他のそれぞれの位置でのソフトランダム化を含めた。4つ目のオリゴヌクレオチドの配列はCGTCTATTATTGTGCTCGC567NNS567NNSNNS567GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 370)であった。

【0216】

第二apu05ライブラリでは、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3を突然変異させた。HVR-H1を修飾して、位置30及び33のセリンをNNS混合コドンセットを用いてランダム化した(NはG、C、A又はTに対応し、SはG又はCに対応する);位置29のアミノ酸は、アミノ酸フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンおよびバリンから選択しそして位置34のアミノ酸は、イソロイシンおよびメチオニンから選択した。apu05HVR-H1を突然変異させるために用いたオリゴヌクレオチドは、GCAGCTTCTGGCTTCAACTAATAACACTGGGTGCGTCAGG (配列番号: 371)及びGCAGCTTCTGGCTTCAACNTCNSTACTCTNNSATSCACTGGGTGC GTCAGG (配列番号: 372)であった。HVR-H2を修飾して、位置52をNNS混合コドンセットを用いてランダム化し、位置52aのアミノ酸はプロリン及びセリンから選択した。HVR-H2を突然変異させるために用いたオリゴヌクレオチドは、GGCCTGGAATGGGTTGCATAATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号: 373)及びGGCCTGGAATGGGTTGCATCTATCNSYCTTACTACTCTTACACCTCTTATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号: 374)であった。HVR-H3を修飾して、位置99のチロシン及び位置100のセリンをNNS混合コドンセットを用いてランダム化し、位置100aのアミ

ノ酸はグリシンおよびアラニンから選択し、そして位置100bのアミノ酸はフェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンから選択した。HVR-H3を突然変異させるために用いたオリゴヌクレオチドは、CGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 365) 及びCGTCTATTATTGTGCTCGCTCTTACTCTTACNNSNNSGSTWTSGACTACTGGGTCAAGG (配列番号: 375) であった。HVR-L3を修飾して、NNS混合コドンセットに従って位置S91をランダム化し、位置I96はフェニルアラニン、イソロイシン及びバリンから選択した。HVR-L3を突然変異させるために用いたオリゴヌクレオチドは、CGCAACTTATTACTGTCAGCAATAATAAACGTTCCGACAGGGTACC (配列番号: 376) 及びCGCAACTTATTACTGTCAGCAANNSTCTTACTCTTCTCTGDTTACGTTCCGACAGGGTACC (配列番号: 378) であった。

10

【0217】

6つの異なるapu18-由来のライブラリは、apu18の6つの異なる突然変異誘発スキームによって作製した。第一ライブラリでは、HVR-H3のみを突然変異させた。まず、HVR-H3をキュンケル鋳型に停止コドンを含むように修飾し、その後7つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを利用した突然変異誘発を行った。すべての場合での停止コドンコード化オリゴヌクレオチドは、CGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 366) であった。初めの6つの突然変異原性オリゴヌクレオチドは6つの順列の同じ所望の配列であり、その2つのチロシン又はトリプトファン残基を固定し、各々の残るチロシン及びトリプトファン残基をNNS混合コドンセットを用いてランダム化した(このときNはG、C、A又はTに対応し、SはG又はCに対応する)。位置100cのアミノ酸はフェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンから選択し、位置100bのアミノ酸はグリシンおよびアラニンから選択し、そして上記のソフトランダム化命名法に従って残りのアミノ酸はソフトランダム化した初めの6つの突然変異原性オリゴヌクレオチド配列は、CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACTAC565NNSNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 379)、CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSNNS565TGGTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 380)、CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACBBS565NNSTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 381)、CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSTAC565TGGNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 382)、CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACNNS565TGGNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 383)、及びCGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSTAC565NNSTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 384) であった。7つ目の突然変異原性オリゴヌクレオチドには、NNS混合コドンセットを用いた位置96、97及び100のチロシンのランダム化; 位置100bのアミノ酸のフェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンからの選別; 位置100cのアミノ酸のフェニルアラニン、メチオニン、ロイシンおよびイソロイシンからの選別; 位置100bのアミノ酸のグリシン及びアラニンからの選別、そして上記のソフトランダム化命名法に従った他のそれぞれの位置でのソフトランダム化を含めた。7つ目のオリゴヌクレオチドの配列は、CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSNNS565NNSNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (配列番号: 385) であった。

20

30

【0218】

第二apu18ライブラリでは、HVR-H2のみを突然変異させた。まず、HVR-H2をキュンケル鋳型に停止コドンを含むように修飾し、その後4つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを利用した突然変異誘発法を行った。すべての場合での停止コドンコード化オリゴヌクレオチドは、GGCCTGGAATGGGTTGCATAATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号: 373) であった。初めの3つの突然変異原性オリゴヌクレオチドは3つの順列の同じ所望の配列であり、その1チロシン残基を固定し、各々の残るチロシン残基と位置52のセリンをNNS混合コドンセットを用いてランダム化し(このときNはG、C、A又はTに対応し、SはG又はCに対応する)、位置52aのアミノ酸はプロリンおよびセリンから選択し、位置55のアミノ酸はグリシンおよびセリンから選択し、位置51のイソロイシンと位置57のスレオニンを固定し、そして上記のソフトランダム化命名法に従って、残りのアミノ酸をソフトランダム化した。初めの3つの突然変異原性オリゴヌクレオチド配列

40

50

は、GGCCTGGAATGGGTTGCATACATCNSYCTNNSNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：386)、GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTTACNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：387)、及びGGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTNNSACRGC567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：388)であった。4つ目の突然変異原性オリゴヌクレオチドには、NNS混合コドンセットを用いた位置50、53及び54のチロシンのランダム化；位置52aのアミノ酸のフェニルアラニンおよびセリンからの選別；位置55のアミノ酸のグリシンおよびセリンからの選別；位置51および57それぞれのイソロイシンおよびスレオニン残基の固定；そして上記のソフトランダム化命名法に従った他のそれぞれの位置でのソフトランダム化を含めた。4つ目のオリゴヌクレオチドの配列は、GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTNNSNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：389)であった。

10

第三apu18ライブラリでは、HVR-H2およびHVR-H3を突然変異させた。第二apu18ライブラリにおいてHVR-H2に行った修飾と同様に、同じ4つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H2を修飾した。第一apu18ライブラリにおいてHVR-H3に行った修飾と同様に、同じ初めの6つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H3を修飾した。

【0219】

第四apu18ライブラリでは、HVR-H3およびHVR-L3を突然変異させた。第一apu18ライブラリにおいてHVR-H3に行った修飾と同様に、同じ初めの6つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H3を修飾した。まず、HVR-H3をキューンケル鋳型に停止コドンを含むように修飾し、その後1つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いた突然変異誘発を行った。HVR-L3内の、位置91及び94のチロシンと位置95aのセリンをNNS混合コドンセットを用いてランダム化し、位置95bのロイシンはフェニルアラニン、イソロイシンおよびバリンから選択し、位置92、93及び95のセリンは上記のソフトランダム化命名法に従ってソフトランダム化した。HVR-L3の突然変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドは、CGCAACTTATTACTGTCAGCAATAATAAACGTTCCGACAGGGTACC (配列番号：376)及びCGCAACTTATTACTGTCAGCAANNS567567NNS567NNSCTGDTTACGTTCCGACAGGGTACC (配列番号：390)であった。

20

第五apu18ライブラリでは、HVR-H1およびHVR-H2を突然変異させた。第二apu18ライブラリにおいてHVR-H2に行った修飾と同様に、同じ4つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H2を修飾した。HVR-H1は停止コドンを含むように修飾し、位置30のセリンと位置33のチロシンをNNS混合コドンセットを用いてランダム化し、位置29のアミノ酸はフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンおよびバリンから選択し、位置34のアミノ酸はイソロイシン及びメチオニンから選択し、位置31と32のアミノ酸は、上記のソフトランダム化命名法に従ってソフトランダム化した。HVR-H1の突然変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドは、GCAGCTTCTGGCTTCACTAATAACACTGGGTGCGTCAGG (配列番号：371)及びGCAGCTTCTGGCTTCAACNTCNNS567567NNSATSCACTGGGTGCGTCAGG (配列番号：391)であった。

30

第六apu18ライブラリでは、HVR-H1、HVR-H2およびHVR-L3を突然変異した。第五apu18ライブラリにおいてHVR-H1に行った修飾と同様に、同じ突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H1を修飾した。第二apu18ライブラリにおいてHVR-H2に行った修飾と同様に、同じ4つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H2を修飾した。第四apu18ライブラリにおいてHVR-L3に行った修飾と同様に、同じ突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-L3を修飾した。

40

【0220】

各々の2つのapu5-由来のライブラリと各々の6つのapu18-由来のライブラリの突然変異誘発反応物を、電気穿孔法によってエレクトロコンピテント大腸菌XL-1に形質転換させた。細胞を、SOC培地中で攪拌しながら37℃で30分間かけて回復させた。20μlの細胞含有SOC培地を用意し形質転換体の数を決定し、次いで残りをカル

50

ベニシリンと 10^{10} /ml の M13K07 ヘルパーファージを含有する 500 ml の 2YT に移した。攪拌しながら 37°C に 45 分間置いた後、培養物にカナマイシンを添加して、攪拌しながら 37°C で終夜生育させた。各ライブラリに対する形質転換体の数は 10^9 より多かった。ファージを回収して、遠心及び PEG 沈殿により培養物から濃縮し、その後選別のラウンドに用いた。

【0221】

実施例 1 (A) に記載のように、K48-連鎖性ポリユビキチンと K63-連鎖性ポリユビキチンを異なる Maxisorp プレート (NUNC) に固定した。分類バッファに $3\text{ }\mu\text{M}$ のモノユビキチンを加えた 1 ラウンドでは、各ライブラリをそのそれぞれの標的 (2 つの apu05-由来のライブラリでは K48-連鎖性ポリユビキチン、6 つの apu18-由来のライブラリでは K63-連鎖性ポリユビキチン) に対して別々に分類した。溶出したファージを増幅して、更なる分類ラウンドのためにプールした (2 プール、1 つは各々のリジン-連鎖性ポリユビキチン標的のためのもの)。

その後の選別ラウンドは溶液-段階分類とした。ファージプールを、溶液-分類バッファ (0.05% Superblock (Pierce) を含む PBST) 中でビオチン化 (スルホ-NHS-ビオチン、Pierce) ポリユビキチン鎖とともに室温で 1~2 時間インキュベートした。混合物を溶液-分類バッファにて 5 倍から 10 倍に希釈し、ビオチン化ポリユビキチンを短い間 (5 分) 捕獲するためにニュートラビジン-コートウェルに加えた。非ビオチン化ポリユビキチン鎖を含有する反応は、バックグラウンドファージ結合をモニターするためのコントロールとした。プレートを PBST にて洗浄し、 0.1 M HCl にて 10 分間溶出した。

【0222】

ストリンジェンシーは 3 つの方法：ビオチン化ポリユビキチンの濃度によって；過剰な非ビオチン化ポリユビキチンを添加してニュートラビジン-コートウェル上に捕獲する前に結合について競合させることによって；及び、競合の継続期間によって調節した。各分類ラウンドでは、 $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度の他の結合のポリユビキチンとモノユビキチンを第一インキュベーション工程の間の分類バッファに加えた。溶液分類の第一ラウンドは、ファージと室温で 1 時間インキュベートした 20 nM のビオチン化ポリユビキチンを用いた。次いで、混合物を溶液-分類バッファにて 10 倍に希釈し、ニュートラビジン-コートウェルを用いて 5 分間捕獲した。第二ラウンドでは、ラウンド 1 のようにファージを 20 nM のビオチン化ポリユビキチンにて平衡化したが、15 分の解離速度選別のために $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ の非ビオチン化ポリユビキチン (K48 選別では K48-連鎖性、K63 選別では K63-連鎖性) を含む溶液-分類バッファにて 10 倍に希釈し、その後ニュートラビジンコートウェル上で捕獲した。溶液分類の第三ラウンドは第 2 ラウンドに記載のように行ったが、さらに、 5 nM ビオチン化ポリユビキチンと 30 分の解離速度選別を含んだ。1 ラウンドのプレート分類と 3 ラウンドの溶液分類の後、記載のように、第二世代から選択される個々のクローンを 96 ウェルフォーマットで生育させた。ファージ ELISA にて個々のクローンをスクリーニングし、配列決定した。

溶液分類の第一ラウンドの後、apu05 ベースのライブラリでは 40 倍以下の濃縮が、apu18 ベースのライブラリでは 7 倍以下の濃縮が観察された (表 C を参照)。第二選別の後には、K48-特異的クローンではさらに 11 倍、K63-特異的クローンではさらに 3 倍濃縮された (緩慢な解離速度の場合には溶液分類) (表 C を参照)。3 回目の選別により (親和性分類と解離速度分類)、K48-特異的クローンでは 18 倍濃縮し、K63-特異的クローンでは 4 倍濃縮した (表 C 参照)。

【0223】

表 C：第二世代抗ポリユビキチン抗体ライブラリ溶液分類の結果

第一選別（親和性についての溶液分類）						
	5 nM		10 nM		20 nM	
	サイズ	濃縮	サイズ	濃縮	サイズ	濃縮
apu05 に 基づく	2.00x10 ⁴	20.00	3.00x10 ⁴	30.00	4.00x10 ⁴	40
apu18 に 基づく	2.20x10 ³	1.83	2.00x10 ³	1.67	8.40x10 ³	7
第二選別（緩慢な解離速度についての溶液分類）						
	5 分		10 分		15 分	
	サイズ	濃縮	サイズ	濃縮	サイズ	濃縮
apu05 に 基づく	4.00x10 ⁴	17.78	4.00x10 ⁴	17.78	2.50x10 ⁴	11.11
apu18 に 基づく	5.50x10 ³	4.07	7.00x10 ³	5.19	4.50x10 ³	3.33
第三選別（親和性及び緩慢な解離速度の両方についての溶液分類）						
	5 nM 及び 30 分					
	サイズ	濃縮				
apu05 に 基づく	4.70x10 ³	18.60				
apu18 に 基づく	1.00x10 ²	4.25				

【0224】

K48-連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合した異なるクローンが68個同定された；これらのクローンをDNA配列分析した。これらのクローンのHVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3配列を図14A-Fに示す。K63-連鎖性ポリユビキチンに特異的に結合した異なるクローンが31個同定された；これらのクローンもまた、配列分析を行った。これらのクローンのHVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3配列を図15A-Cに示す。K48-連鎖性ポリユビキチンとK63-連鎖性ポリユビキチンの特異的クローンそれぞれの軽鎖HVRは配列決定しなかったが、apu05とapu18と同様に、HVR-L1とHVR-L2の配列は不変であることが予測され、HVR-L3配列はクローン特異的であることが予測される。ライブラリ設定に従うと、HVR-L1配列はRASQSVSSAVA(配列番号：79)であり、HVR-L2配列はSASSLYS(配列番号：80)である。すべてのクローンは、同じ重鎖および軽鎖フレームワーク配列を有した(図6参照)。

実施例1に記載のように、最も大きな結合が観察された20のクローン(10のK48-連鎖性ポリユビキチン-特異的及び10のK63-連鎖性ポリユビキチン-特異的)をFabとして産生した。Fab apu2.01からapu2.20をDNA配列分析した。これらのクローンのHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3およびHVR-L3配列を図16AおよびB(K48-特異的Fab)および図17AおよびB(K63-特異的Fab)に示す。

【0225】

Fab apu2.01からapu2.20をELISAタンパク質アッセイに含め、K48-連鎖性及びK63-連鎖性のポリユビキチンに対する相対的な親和性を決定し、Fabがモノユビキチン又はBSAと反応しないことを確認した(図18参照)。このアッセイにおいて、Apukローン2.11および2.12は、K63-連鎖性ポリユビキチンに対して、K48-連鎖性ポリユビキチンに対する親和性の300倍の親和性を示した。K48-連鎖性ポリユビキチンと比較してK63-連鎖性ポリユビキチンに対する親和性において、Apu2.20および2.16はわずかではあるが明らかに異なっていた(それぞれおよそ30倍とおおよそ10倍)。K63-連鎖性ポリユビキチン又はジユビキチンへのクローンapu2.01-apu2.10の結合は検出されなかった。

既に実施例 1 (C) に記載のように、各 F a b も B I A c o r e によって分析した。得られた反応速度定数と結合定数を表 D に示す。表 D の「NB」なる文字は、示した相互作用について結合が検出されなかったことを示す。

【0226】

表 D : B I A c o r e 分析によって測定される抗ポリユビキチン F a b の反応速度定数

	K63-連鎖性ポリユビキチン			K48-連鎖性ジユビキチン			K63-連鎖性ジユビキチン		
	k_{on} (1/M · s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M · s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M · s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)
Apu2.01			NB	6.33×10^5	1.49×10^{-2}	23.5			NB
Apu2.02			NB	1.11×10^6	1.01×10^{-2}	9.16			NB
Apu2.03			NB	8.67×10^5	2.66×10^{-3}	3.07			NB
Apu2.04			NB	6.22×10^5	9.39×10^{-3}	15.10			NB
Apu2.05			NB	1.20×10^6	6.09×10^{-3}	5.06			NB
Apu2.06			NB	1.28×10^6	2.40×10^{-3}	1.87			NB
Apu2.07			NB	2.70×10^6	3.18×10^{-3}	1.18			NB
Apu2.08			NB	1.25×10^6	7.21×10^{-3}	5.76			NB
Apu2.09			NB	7.15×10^5	4.78×10^{-3}	6.69			NB
Apu2.10			NB	3.28×10^6	3.99×10^{-3}	1.21			NB
Apu05			NB	2.44×10^6	1.07×10^{-2}	4.37			NB
Apu2.11	2.49×10^5	7.11×10^{-3}	28.6	1.68×10^4	1.24×10^{-2}	738	3.12×10^5	1.02×10^{-2}	32.7
Apu2.12	4.76×10^5	9.68×10^{-3}	20.3	5.66×10^3	7.88×10^{-3}	1390	5.49×10^5	1.51×10^{-2}	27.5
Apu2.13	4.89×10^5	2.41×10^{-3}	4.93	2.08×10^5	2.15×10^{-2}	103	5.83×10^5	4.11×10^{-3}	7.05
Apu2.14	2.09×10^5	7.08×10^{-3}	34.0	4.97×10^3	1.15×10^{-2}	2310	2.14×10^5	1.06×10^{-2}	49.6
Apu2.15	9.07×10^5	9.98×10^{-3}	11.0	1.43×10^4	1.23×10^{-2}	856	1.10×10^6	1.55×10^{-2}	14.0
Apu2.16	1.68×10^5	1.80×10^{-2}	107	4.11×10^1	1.73×10^{-3}	42000	1.38×10^5	1.27×10^{-2}	92.1
Apu2.17	1.19×10^6	1.35×10^{-2}	11.3	6.90×10^3	2.73×10^{-3}	396	1.13×10^6	2.89×10^{-2}	25.6
Apu2.18	1.48×10^5	1.89×10^{-2}	128	4.98×10^3	5.36×10^{-3}	1080	2.66×10^5	2.53×10^{-2}	95.0
Apu2.19	8.97×10^5	8.47×10^{-3}	9.44	2.54×10^5	1.24×10^{-2}	48.9	8.76×10^5	1.41×10^{-2}	16.1
Apu2.20	2.93×10^5	1.77×10^{-2}	60.7	4.02×10^3	3.77×10^{-3}	939	4.19×10^5	2.50×10^{-2}	59.7
Apu18	1.09×10^6	8.17×10^{-3}	7.53	3.16×10^5	1.48×10^{-2}	46.9	1.01×10^6	1.54×10^{-2}	15.3

【0227】

a p u 0 5 に基づく F a b のいくつかは K 4 8 -連鎖性ジユビキチンに対する a p u 0 5 に対応する F a b より低い K_d を有し、ポリユビキチンに強い結合を示した。各々の a p u 2 . 1 1 - 2 . 2 0 F a b は K 6 3 -連鎖性ポリユビキチンだけでなく、程度は小さいが K 4 8 -連鎖性ジユビキチンにも結合した。a p u 2 . 1 3 のみは a p u 1 8 より低い K_d を有していたが、K 4 8 -連鎖性ジユビキチンに対する K_d は a p u 1 8 の K_d よりも大きかった。a p u 2 . 1 1 、2 . 1 2 、2 . 1 6 および 2 . 2 0 の各々は、K 4 8 -連鎖性ジユビキチンに対する K_d と、K 6 3 -連鎖性ポリユビキチンに対する K_d の比率が a p u 1 8 より良好であった。K 6 3 -連鎖性ポリユビキチンに対する a p u 1 8 ベースの F a b の結合について観察された反応速度定数は、K 6 3 -連鎖性ジユビキチンへの結合について観察されたものと類似していた。

【0228】

また、ニトロセルロースメンブレンに固定したポリユビキチンに特異的に結合する各 F a b の能力は、既に実施例 1 (D) に記載のようにウェスタンブロットによって評価した。K 4 8 及び K 6 3 のいずれかの結合を含むテトラユビキチン、テトラユビキチンと逆のリジン連鎖を含むジユビキチン(例えば、K 4 8 -連鎖性テトラユビキチンを用いる場合には K 6 3 -連鎖性ジユビキチン、又は K 6 3 -連鎖性テトラユビキチンを用いる場合には K 4 8 -連鎖性ジユビキチン)、及びモノユビキチンをニトロセルロースメンブレンに固定し、F a b a p u 2 . 0 1 - 2 . 2 0 を 3 つすべての固定した分子を認識する能力について評価した(図 2 0 A 及び 2 0 B)。モノユビキチンを特異的に認識した F a b はなかった。a p u 2 . 0 1 - a p u 2 . 1 0 のそれぞれは固定した K 4 8 -連鎖性テトラユビキチンを特異的に認識したが、固定した K 6 3 -連鎖性ジユビキチンを認識しなかった(図 2 0 A 参照)。K 4 8 -連鎖性テトラユビキチン調製物にトリユビキチン、ペンタユビキチン及びオクタユビキチン種の混合を示すプロットには様々な他の結合が見られた。a p u 2 . 0 1 - a p u 2 . 1 0 は固定した K 6 3 -連鎖性テトラユビキチンを特異的に認識したが、固定した K 4 8 -連鎖性ジユビキチンを認識しなかった(図 2 0 B 参照)。

【0229】

実施例 3：内因性ポリユビキチン化タンパク質への抗ポリユビキチン抗体の結合

今までの実験によって、近位のTNFレセプター1(TNFR1)シグナル伝達複合体の140kDの必須メディエーターであるレセプター共役タンパク質(RIP)の活性がポリユビキチン化によって調節されていることが示されていた(Wertz等, Nature 430: 694-699 (2004))。RIPがK63-連鎖性ポリユビキチン鎖とポリユビキチン化される場合、TNFR1によるシグナル伝達が促される。A20のN末端の脱ユビキチン化によるRIPからのK63-連鎖性ポリユビキチン鎖の除去と、A20 C末端のユビキチンリガーゼ機能によるK48-連鎖性ポリユビキチン鎖への置換により、RIPが不活性化され、プロテアソームの分解のためにそれを標的とする。このメカニズムは、K48-連鎖性又はK63-連鎖性のポリユビキチンのみを形成することができる変異ユビキチンを発現する細胞株を用いて解明された。

本発明の2つの抗K48-連鎖性及び抗K63-連鎖性のポリユビキチン結合タンパク質が持つ、TNF処理後の異なる時点でHeLa S3細胞に存在するRIPの異なるポリユビキチン化型を特異的に認識する能力を評価した。4リットルのおよそ 1.5×10^6 細胞/mlのHeLa S3細胞を21 μ M MG-132で処理した。処理後すぐに、主な培養物から1リットルの細胞を取り出し、遠心分離によって回収し、200mlのPBSにて洗浄し、再び遠心分離した。この試料をゼロ時間点として用いた。細胞培養物の残りの3リットルは100ng/mlのTNFで処理した。1リットルの細胞を取り出し、回収して、200mlのPBSにて洗浄し、TNFによる処理後5、15及び25分それぞれ再び遠心分離した。各時点の細胞を30mlのIP溶解バッファ(LB)(20mM トリスpH7.5、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA、25 μ M MG-132、10mM NEM、各々30 μ lの脱リン酸化酵素インヒビター混合液1及び2(Sigma)、及び完全プロテアーゼインヒビタータブレット(Roche))中で溶解し、回転させながら4℃で20～60分インキュベートした。各々の溶解物を50mlの遠心チューブに移し、10000 $\times$ gで5分間、2回繰り返してペレット化した。各時点からの溶解物のタンパク質濃度を概算した。各溶解物(規準化したタンパク質濃度の各時点ごとに30ml)を1mlのブロックしていないプロテインA/Gビーズとともに4℃で1.25～1.5時間インキュベートした。ビーズおよび細片を、2000回転数/分で5分間遠心分離して溶解物から分離した。直接的なウェスタンブロット分析のために各溶解物から試料を取り出し、残りの量を-80℃で凍結させた。

【0230】

4つの16mlの各溶解物を得た。各試料に、25mM MG-132と20 μ l NEMを加えた。2つの試料をそれぞれ、2.4 μ g/mlの抗TNFR1抗体と組み合わせた。他の2つの試料をそれぞれ、2.4 μ g/mlのコントロール抗体(抗myc)と組み合わせた。すべての試料を回転させながら4℃で2時間インキュベートし、その後150 μ lのブロックしていないプロテインAビーズの50%スラリーを加えた。試料を回転させながら4℃でさらに5時間インキュベートした。試料を遠心分離によってペレット状にし、15mlのLBにて1回、10mlの1M NaCl含有LBにて2回、10mlのLBにて2回ビーズを洗浄した。洗浄したビーズを1.25mlのLBに再懸濁し、微量遠心管チューブに移した。チューブに総量950 μ lが含まれるように各試料を吸引し、尿素中6Mの各試料の終濃度となるように360mgの固形尿素を各試料に加えた。試料を緩やかに攪拌しながら室温で15分間インキュベートした。各試料のビーズを遠心分離によってペレット状にした。各上清の一部をウェスタンブロット分析のために取っておき、各試料の残りの上清(およそ1ml/試料)を解離希釈バッファ(1% Triton-X100、0.5% デオキシコール酸、120mM NaCl、50mM HEPES pH7.2、及び完全プロテアーゼインヒビター混合液(Roche))にて10mlに希釈した。

【0231】

各試料を2つの5ml用量に分けた。一部を、fab型からIgG型に再編成してあった2.5 μ gのapu2.16にて処理し、他方を、fab型からIgG型に再編成してあった2.5 μ gのapu2.07にて処理した。両方の試料に50 μ lのプロテインA

ビーズを加え、試料を4℃で5時間インキュベートした。プロテインAビーズをペレット化し、TNFR1 LBに3回洗浄し、洗浄工程の間微量遠心管に移した。試料バッファをすべての試料に加え、各試料(既にウェスタンブロット分析のために取っておいた試料を含む)を還元し、10% トリス/gly 1.5 mm 10 ウェルNovex(登録商標)ゲル(Invitrogen)に流した。流した後、製造業者の指示に従ってゲルのタンパク質をInvitrolonTMP VDFメンブレン(Invitrogen)に移した。5% PBS-Tにてメンブレンをブロックし、抗RIPモノクローナル抗体(Becton Dickinson)にて室温で終夜プローブした。次いで、ブロットを洗浄し、HRP-コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体(Cappel)にてプローブし、洗浄し、試薬に曝して化学発光を活性化し、フィルムに露光させた。結果を図21Aおよび21Bに示す。図21Aは、初めにTNFR1又は抗mycにて免疫沈降し、その後apu2.16 IgG(K63-連鎖性ポリユビキチン選択)にて免疫沈降した試料を含有するブロットを表す。図21Aに示すように、RIPは抗mycコントロール試料においてもゼロ時点試料においても可視化されない。RIPバンドは、5分の試料において最も強く、次いで15分および25分の試料において有意に減少していた。図21Bは、初めにTNFR1又は抗mycにて免疫沈降し、その後apu2.07 IgG(K48-連鎖性ポリユビキチン選択)にて免疫沈降した試料を含有するブロットを表す。図12Bに示すように、抗mycコントロールレーンにおいてはRIPが観察されなかった。このブロットのRIPレベルは時間につれて増加し、25分時点の試料において最も強かった。このデータは、TNFR1によるシグナル伝達の際に、RIPはまずK63-連鎖性ポリユビキチン化して、続いてジユビキチン化されてA20によってK48-連鎖性ポリユビキチン化されるという以前の結論と一致する。ゆえに、本発明の抗体は特異的に結合して、細胞においてポリユビキチン化していたK63-連鎖性ポリユビキチン化ポリペプチドとK48-連鎖性ポリユビキチン化ポリペプチドとを区別することが可能であった。

【0232】

実施例4：第三世代抗ポリユビキチン抗体の単離と性質決定

Fabディスプレイの第三世代のライブラリは、既に同定されたクローンapu2.16(K63-連鎖性ポリユビキチン-選択)をコードするファジミドから構築した(実施例2と図17A及び17Bを参照)。クローンからのファージを用いてCJ236細胞に感染させ、キュンケルDNA鋳型を調製した。その後、その鋳型に停止コドン挿入するように突然変異させ、以下のように停止含有鋳型をライブラリ構築に用いた。

3つの異なるスキームに従ってFab apu2.16を突然変異させて、3つの異なるapu2.16-由来のライブラリを作製した。第一ライブラリでは、HVR-H1およびHVR-H2を突然変異させた。HVR-H1をキュンケル鋳型に停止コドンを含むように修飾し、その後1つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを利用した突然変異誘発を行った。停止コドンコード化オリゴヌクレオチド配列は、GCAGCTTCTGGCTTCAACTAATAACACTGGGTGCGTCAGG(配列番号：371)であった。突然変異原性オリゴヌクレオチドにより、NNS混合コドンセットを用いて、位置29のイソロイシンはフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン及びバリンから選択され、位置34のイソロイシンはメチオニン及びイソロイシンから選択され(このときNはG、C、A又はTに対応し、SはG又はCに対応する)、そして、アミノ酸K30、T31、G32およびL33がソフトランダム化された。この場合のソフトランダム化は、特定のヌクレオチド位は示した塩基が占める頻度の70%であり、他の3塩基のうちの1つが占める頻度の10%であったことを示す。このようなソフトランダム化が特定の塩基に含まれる以下のオリゴヌクレオチドでは、ソフトランダム化の存在は塩基の位置での数字によって示す。「5」なる数は、塩基アデニンがその位置で70%の頻度で存在し、一方塩基グアニン、シトシン及びチミジンがそれぞれ10%の頻度で存在することを示す。同様に、「6」なる数はグアニン、「7」はシトシン、「8」はチミジンを指し、それぞれの場合において、他の3つの塩基それぞれは10%の頻度でしか存在しない。apu3.16 HVR-H1を突然変異させるために用いるオリゴヌクレオチド配列は、GCAGCTTCTGGCTTCAACNTC556577668788ATSCACTGGGTGCGTCAGG(配列番号：785)であった。

10

20

30

40

50

【0233】

また、HVR-H2をキュンケル鑄型に停止コドンを含むように修飾し、その後3つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを利用した突然変異誘発を行った。すべての場合での停止コドンコード化オリゴヌクレオチドは、GGCCTGGAATGGGTTGCATAATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：373)であった。3つの突然変異原性オリゴヌクレオチドは2つの順列の第一所望の配列であり、1つは第二所望の配列であった。第一所望の配列には、NNS混合コドンセット(上記)を用いて位置50及び54のいずれかを1つ固定し1つランダム化したチロシン残基；位置51(イソロイシン)、52a(プロリン)、53(チロシン)、55(グリシン)および57(スレオニン)の固定した残基；そして、位置S52、S56およびS58のソフトランダム化(上記のソフトランダム化スキームに従う)を含めた。第二所望の配列には、位置51(イソロイシン)、52a(プロリン)、53(チロシン)、55(グリシン)および57(スレオニン)の固定した残基；NNS混合コドンセット(上記)を用いた位置50及び54のチロシンのハードランダム化、そして、位置S52、S56およびS58のソフトランダム化(上記のソフトランダム化スキームに従う)を含めた。

10

apu2.16 HVR-H2を突然変異するために用いたオリゴヌクレオチドは、GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATC567CCGTACTACGGT567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：786)、GGCCTGGAATGGGTTGCATACATC567CCGTACNNSGGT567 ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：787)、及びGGCCTGGAATGGGTTGCANNS ATC567CCGTACNNSGGT567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (配列番号：788)であった。

20

【0234】

第二apu2.16ライブラリでは、HVR-H2およびHVR-H3を突然変異させた。第一apu2.16ライブラリにおいてHVR-H2に行った修飾と同様に、同じ停止コドン含有オリゴヌクレオチドと同じ3つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H2を突然変異させた。第一apu1.8ライブラリにおいてHVR-H3に行った修飾(実施例2に記載)と同様に、同じ停止コドン含有オリゴヌクレオチドと同じ6つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H3を突然変異させた。

第三apu2.16ライブラリでは、HVR-H1およびHVR-H3を突然変異させた。第一apu2.16ライブラリにおいてHVR-H1に行った修飾と同様に、同じ停止コドン含有オリゴヌクレオチドと突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H1を突然変異させた。第一apu1.8ライブラリにおいてHVR-H3に行った修飾(実施例2に記載)と同様に、同じ停止コドン含有オリゴヌクレオチドと同じ6つの突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いてHVR-H3を突然変異させた。

30

【0235】

3つそれぞれのapu2.16-由来ライブラリの突然変異誘発反応物を、電気穿孔法によってエレクトロコンピテント大腸菌XL-1に形質転換させた。細胞を、SOC培地中で攪拌しながら37℃で30分間かけて回復させた。20μlの細胞含有SOC培地を用意し形質転換体の数を決定し、次いで残りをカルベニシリンと 10^{10} /mlのM13KO7ヘルパーファージを含有する500mlの2YTに移した。攪拌しながら37℃で45分間インキュベートした後、培養物にカナマイシンを添加して、攪拌しながら37℃で終夜生育させた。各ライブラリに対する形質転換体の数は 10^9 より多かった。ファージを回収して、遠心及びPEG沈殿により培養物から濃縮し、その後選別のラウンドに用いた。

40

実施例1(A)に記載のように、Maxisorpプレート(NUNC)に固定したK63-連鎖性ポリユビキチンに対して別々に分類した。ストリンジェンシーは3つの方法：ビオチン化ポリユビキチンの濃度によって；過剰な非ビオチン化ポリユビキチンを添加してニュートラビジン-コートウェル上に捕獲する前に結合について競合させることによって；及び、競合の継続期間によって調節した。各分類ラウンドでは、3μM モノユビキチンと30μg/ml K48-連鎖性ポリユビキチンをインキュベーション工程の間の分類バッファに加えた。溶出したファージを増やして、分類の更なるラウンドのためにプールした。その後の選別ラウンドは溶液-段階であった。溶液分類の第一ラウンドには、室温で1

50

時間ファージプールとインキュベートした100 nM ビオチン化(スルホ-NHS-ビオチン、Pierce)ポリユビキチンを含めた。次いで、混合物を溶液-分類バッファ(0.05% Superblock (Pierce)を含むPBST)にて10倍に希釈し、ニュートラビジンコートウェルを用いて5分間キャプチャした。非ビオチン化ポリユビキチン鎖を含有する反応は、バックグラウンドファージ結合をモニターするためのコントロールとした。プレートをPBSTにて洗浄し、0.1M HClにて10分間溶出した。第二溶液-分類ラウンドでは、ラウンド1のようにファージを30 nMのビオチン化ポリユビキチンにて平衡化したが、5分の解離速度選別のために30 µg/mlの非ビオチン化ポリユビキチン(K63-連鎖性)を含む溶液-分類バッファにて10倍に希釈し、その後ニュートラビジンコートウェル上で捕獲した。

10

溶液分類の第一ラウンドの後、apu2.16ベースの組み合わせライブラリに関して6.5倍の濃縮が観察された(表Eを参照)。緩慢な解離速度についての第二溶液分類の後、さらに10倍の濃縮が観察された(表Eを参照)。

【0236】

表E：第三世代抗ポリユビキチン抗体ライブラリ溶液分類の結果

	プレート分類		溶液分類			
	ラウンド1		ラウンド2 (100 nM)		ラウンド3 (30 nM)	
	ライブラリ サイズ	濃縮	ライブラリ サイズ	濃縮	ライブラリ サイズ	濃縮
16-1	1.06e+06	ND	1.04e+05	6.5	1.00e+05	10
16-2	5.98e+05	ND				
16-3	1.76e+05	ND				

20

【0237】

1ラウンドのプレート分類と2ラウンドの溶液分類の後、第三世代から選択される個々のクローンを96ウェルフォーマットで生育させ、実施例2に記載のようにファージELISAによってスクリーニングした。配列決定によって72の異なるクローンが同定された。これらのクローンのうちの12は、ファージELISAアッセイにおいてK63-連鎖性ポリユビキチンに対して最も大きな特異性を示した(図22)。これら12のクローンをapu3.01-3.12と称し、これらのHVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3配列を図23Aおよび23Bに示す。K63-連鎖性ポリユビキチン特異的クローンそれぞれの軽鎖HVRは配列決定しなかったが、HVR-L1とHVR-L2の配列は不変であることが予測され、HVR-L3配列はapu2.16のものと同一であることが予測された。ライブラリ設定に従うと、HVR-L1配列はRASQSVSSAVA(配列番号：79)であり、HVR-L2配列はSASSLYS(配列番号：80)であった。すべてのクローンは、同じ重鎖および軽鎖フレームワーク配列を有した(図6を参照)。

30

Apu2.07(実施例2と図16Aおよび16Bを参照)とapu3.07(上記と図23Aおよび23Bを参照)はヒトIgGのように、CHO細胞又は293細胞において発現された。ヒトIgGの重鎖および軽鎖をコードする適当なpRK哺乳動物発現ベクターのクエンケル突然変異誘発によって発現コンストラクトを作製した(Gorman等, DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10(1990))。標準的な方法を用いた親和性クロマトグラフィによってIgGを精製した。

40

【0238】

ニトロセルロースメンブレンに固定した適当な結合のポリユビキチンに特異的に結合する各IgGの能力は、ウェスタンブロットによって評価した。K48-又はK63-連鎖性のポリユビキチンとモノユビキチン(Boston Biochem)を、4-20%のトリス-グリシンポリアクリルアミドゲル(Invitrogen)に流した。ゲルの内容物をエレクトロブロッティングによってニトロセルロースに移した。ニトロセルロースメンブレン上の非特異的結合部位は、0.1% Tween-20を含有するトリス緩衝生理食塩水(TBST)に溶解した5% 無脂粉乳中で1時間ブロックした。次いで、K48-特異的又はK63-特異的抗体を、2 µg/ml(apu2.07 IgG)又は1 µg/ml(apu3.07 IgG)の

50

濃度でブロットに加え、結合を促すために1時間インキュベートした。ポジティブコントロールとして、1ブロットはウサギ抗ユビキチン抗体(Sigma)とともにインキュベートした。ブロットをTBS Tにて洗浄して、5%無脂粉乳を含有するTBS Tにて1:10000に希釈したペルオキシダーゼ-コンジュゲートヤギ抗ヒトIg Fc(ICN)又はペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗ウサギIg(Amersham)によって結合した抗体を検出した。1時間後に、ブロットをTBS Tで洗浄して、ペルオキシダーゼ活性を明らかにするためにSuper Signal West Dura試薬(Pierce)を用いて反応させた。結果を図24A-24Dに示す。

【0239】

予測されたように、apu2.07 IgGは、固定したK48-連鎖性テトラユビキチンとK48-連鎖性のトリユビキチンからヘプタユビキチンを特異的に認識したが(図24A)、固定したK63-連鎖性ポリユビキチン試料のいずれかには結合しなかった。同様に、apu3.07 IgGは、固定したK63-連鎖性テトラユビキチンとK63-連鎖性のトリユビキチンからヘプタユビキチンを特異的に認識したが(図24B)、固定したK48-連鎖性ポリユビキチン試料のいずれにも結合しなかった。固定されたモノユビキチンに結合したIgGもなかった。各IgGの感受性を評価するために、様々な濃度の固定したK48-連鎖性及びK63-連鎖性のテトラユビキチン(25~1000 ng/レーン)を用いて更なるウェスタンブロット分析を行った(図24C及び24D)。50 ngの固定したK48-連鎖性テトラユビキチンと同じくらいわずかなapu2.07 IgGしか検出されず、さらに、固定したK63-連鎖性テトラユビキチンには特異的に結合しなかった(図24C)。50 ngの固定したK63-連鎖性テトラユビキチンと同じくらいわずかなapu3.07 IgGしか検出されず、さらに、固定したK48-連鎖性テトラユビキチンには特異的に結合しなかった(図24D)。いずれの場合においても、固定されたテトラユビキチンの量が増加すると、観察される結合が増えた。

【0240】

IgGが内因性ポリユビキチン化タンパク質を検出することが可能だったかどうかを決定するために、タンパク質溶解物を、20 μMのプロテアソームインヒビターVelcade(登録商標)(ボルテゾミブ)による4時間の処理を行った場合と行わなかった場合のヒト胚性腎細胞株である293Tから調製した。4-20% トリス-グリシンポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEによって溶解物を分解し、上記のようにウェスタンブロットを行った。結果を図25に示す。Velcade(登録商標)処理のある場合とない場合の両方においてポリクロナル抗ユビキチン抗体(Sigma)により、多くの高分子量タンパク質(最も左のレーン)が検出された。apu2.07 IgGは異なる分子量の多くのタンパク質に結合し(最も右のレーン)、固定した未処理の溶解物に対するよりも固定したベルケイド(velcade)処理溶解物に対してより多くの結合が観察された。apu3.07 IgGでは全体的に有意に少ない結合が観察された(中央のレーン)。これはK63-ポリユビキチン化タンパク質に結合することが予測され、ベルケイド処理と未処理のレーンとの間に見かけの結合の違いはなかった。K48-連鎖性ポリユビキチン化は、タンパク質分解のために細胞内タンパク質を標的とすることが知られている(Chau等, Science 243: 1576-1583 (1989); Finley等, Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick等, Nat. Cell Biol. 6: 634-641 (2004))。ゆえに、apu2.07 IgGの結果は、タンパク質分解性プロセッシングが阻害された場合、溶解物中に残るK48-ポリユビキチン化タンパク質の量が増加し、これによって未処理の試料よりもapu2.07 IgGによる結合が増加したと解釈できた。K63-連鎖性ポリユビキチン化は分解のためにタンパク質を標的とすることが知られていない(Pickart and Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004); Hicke and Dunn, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 141-172 (2003); Spece等, Mol. Cell Biol. 15: 1265-1273 (1995); Ulrich, Eukaryot. Cell 1: 1-10 (2002); Spence等, Cell 102: 67-76 (2000); Seibenhener等, Mol. Cell. Biol. 24(18): 8055-8068 (2004))。ゆえに、apu3.07 IgGの結果は、プロテアソームの阻害によりK63-ポリユビキチン化タンパク質が集積されなかったと解釈できた。

【0241】

実施例5：抗K63-連鎖性ポリユビキチンに対するFab結合の構造的解析

ポリユビキチンと抗K63-連鎖性ポリユビキチン Fabの相互作用をさらに理解するために、抗K63-連鎖性ポリユビキチン Fab apu2.16を、K63-連鎖性ジユビキチンと共結晶化した。1 μ lのapu2.16溶液(10mM トリス、75mM NaCl pH8.0中15mg/ml)と1 μ lのウェル溶液(0.1M LiCl、0.1M トリスpH8.2、1M クエン酸塩)を用いた懸滴において結晶を大きくした。各滴下に0.5 μ lの0.1Mの塩化第二銅を加え、各滴下を線状に播いた。数日にわたって結晶クラスターを大きくし、単一の回析用結晶が得られるように操作してもよい。分子置換により構造を測定した。100Kで生データを集め、HKL2000によって処理した。結晶は、 $a = 177.7 \text{ \AA}$ 、 $b = 94.9 \text{ \AA}$ 、 $c = 97.9 \text{ \AA}$ 、そして $\beta = 107$ の細胞寸法と、非対称性ユニットの2つの複合体を有するC2空間群に属した。プログラムPhaserとヒト化4d5 Fab断片の変異体の配位を用いた分子置換により構造を解析した(4D5ではPDB:PDBコード1FVE)。プログラムCootにモデル構築を行い、Refmac5を用いて構造を改良した。構造の分解は $3.1 \text{ \AA}$ である。複合体は24.5%のRおよび30.4%の R_{free} に改善した。

10

apu2.16とK63-連鎖性ジユビキチンとの間の相互作用を図26A-26Cに示す。構造的エピトープは、Fabを結合する際に溶媒にアクセス可能な表面領域の少なくとも25%を埋没する、および/またはFabの重鎖又は軽鎖の $4.5 \text{ \AA}$ の範囲内に複数のある原子を有する残基の組合せである。K63を呈するユビキチン鎖は鎖Aであり、C末端を呈するユビキチン鎖は鎖Bである。Fab軽鎖残基は鎖Lに属し、Fab重鎖残基は鎖Hに属する。以下の表の残基番号の前に鎖番号を付し、Fab残基を順に番号付けする。

20

【0242】

表F：apu2.16-K63-連鎖性ジユビキチン結合境界面に位置する残基

ユビキチン残基	Fab 残基
A 18 Glu	
A 19 Pro	L 31 Ser
A 20 Ser	L 49 Tyr
A 21 Asp	L 50 Ser
A 55 Thr	L 51 Ala
A 56 Leu	L 52 Ser
A 57 Ser	L 53 Ser
A 58 Asp	L 66 Arg
A 60 Asn	L 98 Phe
A 61 Ile	
A 62 Gln	H 30 Lys
	H 31 Thr
B 8 Leu	H 32 Gly
B 9 Thr	H 33 Leu
B 34 Glu	H 50 Tyr
B 35 Gly	H 52 Ser
B 36 Ile	H 54 Tyr
B 37 Pro	H 55 Tyr
B 39 Asp	H 99 Glu
B 40 Gln	H 100 Tyr
B 71 Leu	H 101 Tyr
B 72 Arg	H 102 Arg
B 73 Leu	H 104 Tyr
B 74 Arg	H 105 Thr
B 75 Gly	

10

20

30

【0243】

表F及び、図26Bに濃い灰色で示すように、apu2.16に結合した場合に、apu2.16の4.5 Åの範囲内に位置した残基は、K63-ジユビキチンB鎖に13残基、K63-ジユビキチンA鎖に11残基あった。表F及び、図26Cに濃い灰色で示すように、K63-連鎖性ジユビキチン分子に結合した場合に、K63-連鎖性ジユビキチンの3.5 Åの範囲内に位置した残基は、apu2.16重鎖に14残基、apu2.16軽鎖に8残基あった。このデータから、K63-連鎖性ジユビキチン上の2つの間の相互作用を媒介すると思われる残基には、A鎖ではGlu-18、Ser-20、Leu-57及びAsp-58が含まれ、B鎖ではPro-37、Arg-74及びGly-75が含まれる。興味深いことに、抗体はK63-Gly76結合と親密に相互作用することなく、結合に隣接するジユビキチン複合体の表面の相互作用を介して特異性を導いている。

40

【図面の簡単な説明】

【0244】

【図1】ユビキチンの一次構造および特定のポリユビキチンイソペプチド結合の略図を示す。図1Aは、ヒトのユビキチンのアミノ酸配列(配列番号：377)を示し、リジン残基を太字で下線を引いて示した。図1Bは、第一ユビキチン分子のリジン-48又はリジン-63と第二ユビキチン分子のC末端グリシン残基との間で形成される結合の模式図を示す。

。

【図2A-C】実施例1(A)に記載の、K48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識す

50

る抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。識別子「48」は、抗体分子がK48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識したことを示す。識別子「both」は、抗体分子がK48-連鎖性ポリユビキチンとK63-連鎖性ポリユビキチンの両方を認識したことを示す。識別子「all」は、抗体分子がK48-連鎖性ポリユビキチンとK63-連鎖性ポリユビキチンの両方並びにモノユビキチンを認識したことを示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図3A-B】実施例1(A)に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識する抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。識別子「63」は、抗体分子がK63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識したことを示す。識別子「both」は、抗体分子がK63-連鎖性ポリユビキチンとK48-連鎖性ポリユビキチンの両方を認識したことを示す。識別子「all」は、抗体分子がK63-連鎖性ポリユビキチンとK48-連鎖性ポリユビキチンの両方並びにモノユビキチンを認識したことを示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図4A-B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を表す。 可変重鎖(VH)コンセンサスフレームワーク(図4Aおよび4B)：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カバットCDR(配列番号：111、839、858および877)。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展した高頻度可変領域(配列番号：112-114、840-842、859-861および878-880)。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カバットCDR(配列番号：115、843、862および881)。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展した高頻度可変領域(配列番号：116-118、844-846、863-865および882-884)。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カバットCDR(配列番号：119、847、866および885)。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展した高頻度可変領域(配列番号：120-122、848-850、867-869および886-888)。ヒトVHアクセプターフレームワークマイナスカバットCDR(配列番号：123、851、870および889)。ヒトVHアクセプターフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：124-125、852-853、871-872および890-891)。ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナスカバットCDR(配列番号：126、854、873および892)。ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：127-129、855-857、874-876および893-895)。

【図5】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を表す。 可変軽鎖(VL)コンセンサスフレームワーク(図5)：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：130、896、900および904)。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：131、897、901および905)。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：132、898、902および906)。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：133、899、903および907)。

【図6】huMAb4D5-8軽鎖および重鎖のフレームワーク領域配列を表す。上付／太字の番号はカバットに従ったアミノ酸位を示す。

【図7】huMAb4D5-8軽鎖および重鎖の修飾／変異フレームワーク領域配列を表す。上付／太字の番号はカバットに従ったアミノ酸位を示す。

【図8A-C】実施例1(A)に記載の、K48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識す

10

20

30

40

50

る抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図9A-B】実施例1(A)に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識する抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図10A-C】実施例1(B)に記載の、K48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識し、ペントヒスチジンに特異的な抗体によって認識された抗ポリユビキチン抗体分子apu01-apu15の重鎖及び軽鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3と、軽鎖HVR配列であるL3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図11A-C】実施例1(B)に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識し、ペントヒスチジンに特異的な抗体によって認識された抗ポリユビキチン抗体分子apu17-apu24の重鎖及び軽鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3と、軽鎖HVR配列であるL3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図12】実施例1(C)に記載のように、BIACORE(登録商標)分析を用いて観察した、様々な濃度の抗ポリユビキチンFab apu09とK48-連鎖性ないしはK63-連鎖性のポリユビキチンとの間の結合相互作用を示す。

【図13A-B】実施例1(C)に記載のように、BIACORE(登録商標)分析を用いて観察した、様々な濃度の抗ポリユビキチンFab apu18とK48-連鎖性ないしはK63-連鎖性のポリユビキチンとの間の結合相互作用を示す。

【図14A-F】実施例2に記載の、K48-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識する、Fab apu05の配列に基づいた第二世代の抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。陰を付けた部分は、配列がFab apu05の対応するHVR配列のアミノ酸配列と同一であることを示す。太字は、抗体が実施例2に記載するファージELISAアッセイにおいて強い結合を示したことを示す。

【図15A-C】実施例2に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチンを特異的に認識する、Fab apu18の配列に基づいた第二世代の抗ポリユビキチン抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。陰を付けた部分は、配列がFab apu18の対応するHVR配列のアミノ酸配列と同一であることを示す。太字は、抗体が実施例2に記載するファージELISAアッセイにおいて強い結合を示したことを示す。

【図16A-B】実施例2に記載の、K48-連鎖性ポリユビキチン(apu2.01-apu2.10)を特異的に認識し、ペントヒスチジンに特異的な抗体によって認識された、突然変異させたapu05由来のFab分子の重鎖高頻度可変領域のアミノ酸配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3と、軽鎖HVR配列であるL3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。陰を付けた部分は、配列がFab apu05の対応するHVR配列のアミノ酸配列と同一

10

20

30

40

50

であることを示す。

【図17A-B】実施例2に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチン(apu2.11-apu2.20)を特異的に認識し、ペンタヒスチジンに特異的な抗体によって認識された、突然変異させたapu18由来のFab分子の重鎖高頻度可変領域のアミノ酸配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3と、軽鎖HVR配列であるL3を示す。識別子「n. p.」は、あるクローンが示す位置のアミノ酸を有さなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。陰を付けた部分は、配列がFab apu18の対応するHVR配列のアミノ酸配列と同一であることを示す。

【図18】K48-連鎖性ポリユビキチン、K63-連鎖性ポリユビキチン、モノユビキチンおよびウシ血清アルブミンに対する各々の第二世代のFab apu2.01-2.20の結合が評価された実施例2に記載のファージELISAアッセイの結果を表す。

【図19A】実施例1に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。固定したK48-連鎖性テトラユビキチンに対する、クローンapu01からapu15から産生されたFabの結合を示す。

【図19B】実施例1に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。固定したK63-連鎖性ポリユビキチンに対する、クローンapu18からapu24から産生されたFabの結合の欠如を示す。

【図20】実施例2に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。図20Aは、固定したK48-連鎖性テトラユビキチンに対するapu2.01-apu2.10の結合と、固定したK63-連鎖性ジユビキチンに対する結合の欠如を示す。図20Bは、固定したK63-連鎖性テトラユビキチンに対するapu2.11-apu2.20の結合と、固定したK48-連鎖性ジユビキチンに対する結合の欠如を示す。

【図21】実施例3に記載の、RIPのユビキチン化状態を検出するための免疫沈降実験からのウェスタンブロットを示す。図21Aのプロットは、K63-連鎖性ポリユビキチン化タンパク質を捕獲するためにapu2.16 IgGによって免疫沈降した試料を含む。図21Bのプロットは、K48-連鎖性ポリユビキチン化タンパク質を捕獲するためにapu2.07 IgGによって免疫沈降した試料を含む。両方のプロットは抗RIP抗体にて染色した。

【図22】K48-連鎖性ポリユビキチン、K63-連鎖性ポリユビキチン、モノユビキチンおよびウシ血清アルブミンに対する各々の第三世代のクローンapu3.01-3.12の結合が評価された実施例4に記載のファージELISAアッセイの結果を表す。

【図23A-B】実施例4に記載の、K63-連鎖性ポリユビキチン(apu3.01-apu3.12)を特異的に認識する突然変異させたapu2.16由来のクローンの重鎖高頻度可変領域のアミノ酸配列を示す。図は、重鎖HVR配列であるH1、H2およびH3を示す。識別子「ND」は配列が決定されなかったことを示す。アミノ酸位は本明細書中に示すカバット番号付けシステムに従って番号付けする。陰を付けた部分は、配列がapu2.16の対応するHVR配列のアミノ酸配列と同一であることを示す。

【図24A-B】実施例4に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。図24Aは、固定したK48-連鎖性トリユビキチンからヘプタユビキチンに対するapu2.07の結合と、固定したK63-連鎖性トリユビキチンからヘプタユビキチン又はモノユビキチンに対する結合の欠如を示す。図24Bは、固定したK63-連鎖性トリユビキチンからヘプタユビキチンに対するapu3.07 IgGの結合と、固定したK48-連鎖性トリユビキチンからヘプタユビキチン又はモノユビキチンに対する結合の欠如を示す。

【図24C-D】実施例4に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。図24Cは、固定したK48-連鎖性テトラユビキチンに対するapu2.07の濃度依存的な結合と、固定したK63-連鎖性テトラユビキチンに対する結合の欠如を示す。図24Dは、固定したK63-連鎖性テトラユビキチンに対するapu3.07 IgGの濃度依存的な結合と、固定したK48-連鎖性テトラユビキチンに対する結合の欠如を示す。

【図25】実施例4に記載のウェスタンブロッティング実験の結果を表す。図は、ベルケ

10

20

30

40

50

イド(登録商標)で処理した293T細胞(+)又は未処理の293T細胞(-)の固定した溶解物に対する抗ユビキチンポリクローナル抗体、apu2.07 IgG、およびapu3.07 IgGの結合を示す。

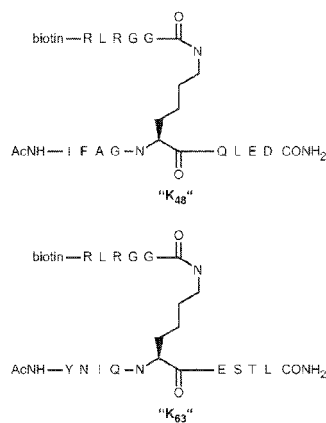
【図26A】結晶学的分析によって測定した、本発明のK63-連鎖性ポリユビキチン特異的fabとK63-連鎖性ポリユビキチンとの間の相互作用を示す。K63-連鎖性ポリユビキチン特異的fabであるapu2.16とK63-連鎖性ジユビキチンとの間で形成された複合体を示す。Apu2.16は図の下方にリボン線図で示し、K63-連鎖性ジユビキチンは図の上方に球状形状で示す。

【図26B-C】結晶学的分析によって測定した、本発明のK63-連鎖性ポリユビキチン特異的fabとK63-連鎖性ポリユビキチンとの間の相互作用を示す。図26Bは、K63-連鎖性ジユビキチンの表面を表し、fabの4.5 Å内の残基を濃い灰色で着色し、対象の残基を標識した。図26Cは、apu2.16の表面を表し、K63-連鎖性ユビキチンダイマーの4.5 Å内の残基を濃い灰色で着色した。CDRを標識した。

10

【図1】

1 MET GLN ILE PHE VAL **LYS** THR LEU THR GLY **LYS** THR ILE THR
15 LEU GLU VAL GLU PRO SER ASP THR ILE GLU ASN VAL **LYS** ALA
29 **LYS** ILE GLN ASP **LYS** GLU GLY ILE PRO PRO ASP GLN GLN ARG
43 LEU ILE PHE ALA GLY **LYS** GLN LEU GLU ASP GLY ARG THR LEU
57 SER ASP TYR ASN THR GLN **LYS** GLU SER THR LEU HIS LEU VAL
71 LEU ARG LEU ARG GLY GLY

A**B**

【図2A】

HVR-H1

クローン	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	結合先
48-1	1	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H	48
48-2	2	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	48
48-3	3	G	F	N	I	Y	Y	S	S	I	H	48
48-4	4	G	F	N	I	S	Y	Y	Y	I	H	48
48-5	5	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	M	H	48
48-6	6	G	F	N	F	Y	S	S	Y	M	H	48
48-7	7	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H	48
48-8	8	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-9	9	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	H	48
48-10	10	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-11	11	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H	48
48-12	12	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H	48
48-13	13	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-14	14	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H	48
48-15	15	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	48/BOTH
48-16	16	G	F	N	F	Y	Y	Y	Y	I	H	48/BOTH
48-17	17	G	F	N	V	S	S	Y	S	I	H	48
48-18	18	G	F	N	V	S	S	Y	S	M	H	48/BOTH
48-19	19	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H	48/BOTH
48-20	20	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H	ALL
48-21	21	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H	BOTH
48-22	22	G	F	N	V	S	Y	Y	S	I	H	BOTH
48-23	23	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	H	BOTH
48-24	24	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	BOTH
48-25	25	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H	NONE/BOTH
コンセンサス	26	G	F	N	L/V/I	S/Y	Y/S	S/Y	S/Y	M/I	H	

【図 2 B】

HVR-H1		HVR-H2	
クローン#		クローン#	
63-1	81	48-1	27
63-2	82	48-2	28
63-3	83	48-3	29
63-4	84	48-4	30
63-5	85	48-5	31
63-6	86	48-6	32
63-7	87	48-7	33
63-8	88	48-8	34
63-9	89	48-9	35
コンセンサス	90	48-10	36
		48-11	37
		48-12	38
		48-13	39
		48-14	40
		48-15	41
		48-16	42
		48-17	43
		48-18	44
		48-19	45
		48-20	46
		48-21	47
		48-22	48
		48-23	49
		48-24	50
		48-25	51
		コンセンサス	52

【図 3 A】

HVR-H1		HVR-H2	
クローン#		クローン#	
63-1	81	48-1	27
63-2	82	48-2	28
63-3	83	48-3	29
63-4	84	48-4	30
63-5	85	48-5	31
63-6	86	48-6	32
63-7	87	48-7	33
63-8	88	48-8	34
63-9	89	48-9	35
コンセンサス	90	48-10	36
		48-11	37
		48-12	38
		48-13	39
		48-14	40
		48-15	41
		48-16	42
		48-17	43
		48-18	44
		48-19	45
		48-20	46
		48-21	47
		48-22	48
		48-23	49
		48-24	50
		48-25	51
		コンセンサス	52

HVR-H2		HVR-H3	
クローン#		クローン#	
63-1	81	48-1	27
63-2	82	48-2	28
63-3	83	48-3	29
63-4	84	48-4	30
63-5	85	48-5	31
63-6	86	48-6	32
63-7	87	48-7	33
63-8	88	48-8	34
63-9	89	48-9	35
コンセンサス	90	48-10	36
		48-11	37
		48-12	38
		48-13	39
		48-14	40
		48-15	41
		48-16	42
		48-17	43
		48-18	44
		48-19	45
		48-20	46
		48-21	47
		48-22	48
		48-23	49
		48-24	50
		48-25	51
		コンセンサス	52

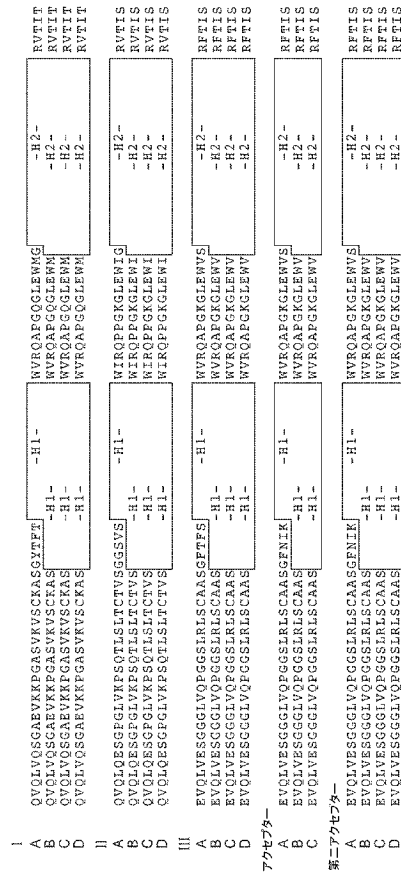
【図 2 C】

HVR-H3		HVR-H4	
クローン#		クローン#	
63-1	81	48-1	27
63-2	82	48-2	28
63-3	83	48-3	29
63-4	84	48-4	30
63-5	85	48-5	31
63-6	86	48-6	32
63-7	87	48-7	33
63-8	88	48-8	34
63-9	89	48-9	35
コンセンサス	90	48-10	36
		48-11	37
		48-12	38
		48-13	39
		48-14	40
		48-15	41
		48-16	42
		48-17	43
		48-18	44
		48-19	45
		48-20	46
		48-21	47
		48-22	48
		48-23	49
		48-24	50
		48-25	51
		コンセンサス	52

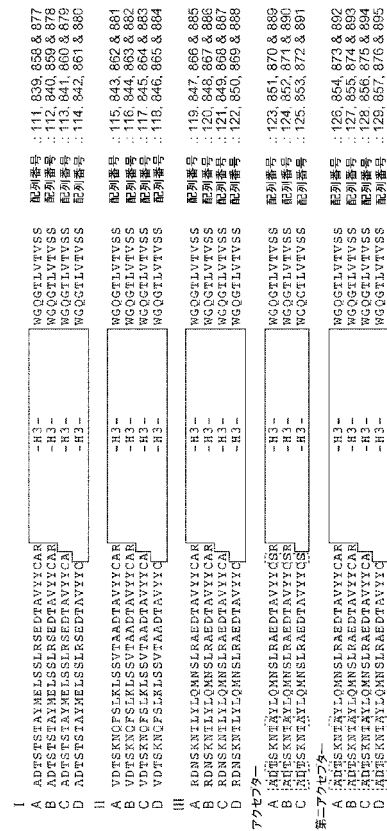
【図 3 B】

HVR-H3		HVR-H4	
クローン#		クローン#	
63-1	81	48-1	27
63-2	82	48-2	28
63-3	83	48-3	29
63-4	84	48-4	30
63-5	85	48-5	31
63-6	86	48-6	32
63-7	87	48-7	33
63-8	88	48-8	34
63-9	89	48-9	35
コンセンサス	90	48-10	36
		48-11	37
		48-12	38
		48-13	39
		48-14	40
		48-15	41
		48-16	42
		48-17	43
		48-18	44
		48-19	45
		48-20	46
		48-21	47
		48-22	48
		48-23	49
		48-24	50
		48-25	51
		コンセンサス	52

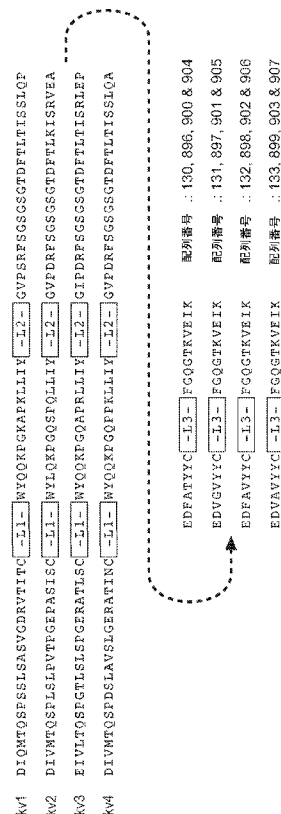
【図 4 A】



【図 4 B】



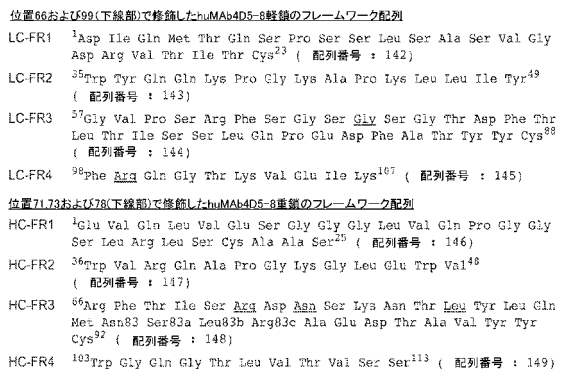
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8 B】

HVR-H1												
クローン#	配列番号:											
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
48-26	151	G	F	N	V	Y	Y	S	S	Y	I	H
48-27	152	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	I	H
48-28	153	G	F	N	F	S	Y	Y	S	M	I	H
48-29	154	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	I	H
48-30	155	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	I	H
48-31	156	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	I	H
48-32	157	G	F	N	L	S	Y	S	Y	I	I	H
48-33	158	G	F	N	F	Y	Y	Y	Y	I	I	H
48-34	159	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	I	H
48-35	160	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	I	H
48-36	161	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	I	H
48-37	162	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	I	H
48-38	163	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	I	I	H
48-39	164	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	I	H
48-40	165	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	I	H
48-41	166	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	I	H
48-42	167	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	M	I	H
48-43	168	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	I	H
48-44	169	G	F	N	I	S	Y	S	S	I	I	H
48-45	170	G	F	N	V	S	Y	S	S	M	I	H
48-46	171	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	I	H
48-47	172	G	F	N	V	S	Y	Y	S	I	I	H
48-48	173	G	F	N	I	S	Y	S	S	I	I	H
48-49	174	G	F	N	F	S	Y	Y	S	I	I	H
48-50	175	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	I	H
コンセンサス	176	G	F	N	V/F L/I	Y/S	Y	S/Y	S/Y	I/M	I	H

[illegible]

【図 9 A】

HVR-H3												
クローム #	配列 番号											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
48-26	203	E	G	Y	S	Q	G	G	F		D	Y
48-27	204	S	Y	S	Y	Y	S	A	I		D	Y
48-28	205	S	Y	S	Y	S	Y	C	M		D	Y
48-29	206	S	Y	S	Y	S	Y	G	I		D	Y
48-30	207	S	Y	S	Y	Y	S	A	M		D	Y
48-31	208	G	Y	K	Y	W	S	A	F		D	Y
48-32	209	E	S	F	Y	Y	S	P	A	F	D	Y
48-33	210	E	Y	Y	S	Y	L	G	A	I	D	Y
48-34	211	G	Y	E	G	G	M	A	M		D	Y
48-35	212	S	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
48-36	213	G	Y	M	W	Y	G	G	I		D	Y
48-37	214	D	C	Y	Y	x	A	A	F		D	Y
48-38	215	E	N	Y	W	W	A	I			D	Y
48-39	216	S	Y	S	Y	Y	S	A	F		D	Y
48-40	217	D	Y	Y	F	F	S	A	I		D	Y
48-41	218	S	Y	S	Y	S	S	A	L		D	Y
48-42	219	E	G	Y	I	S	G	D	A	I	D	Y
48-43	220	S	Y	S	S	Y	S	A	I		D	Y
48-44	221	G	Y	F	E	G	W	Y	G	L	D	Y
48-45	222	E	Y	S	Y	Y	G	G	F		D	Y
48-46	223	E	S	Y	W	S	Y	A	M		D	Y
48-47	224	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
48-48	225	Y	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
48-49	226	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
48-50	227	S	Y	S	Y	S	Y	G	M		D	Y
コンセ ンサス	228	E/S/ G/D/ Y	G/Y/ S/C/ N	Y/S/ K/F/ E/M	S/Y/ G/W/ F/H	Q/Y/ S/W/ G/O/ F	G/S/ Y/L/ M/W/ A/W	G/A P/I/ D/Y	F/I/ M/L/ G/G/ O.O.	F/I/ L/ n.p.	D	Y

[illegible]

クローム #	配列番号
63-10	241
63-11	242
63-12	243
63-13	244
63-14	245
63-15	246
63-16	247
63-17	248
63-18	249
63-19	250
63-20	251
63-21	252
63-22	253
63-23	254
63-24	255
63-25	256
63-26	257
63-27	258
63-28	259
63-29	260
63-30	261
63-31	262
63-32	263
63-33	264
63-34	265
63-35	266
63-36	267
63-37	268
63-38	269
63-39	270
63-40	271
63-41	272
63-42	273
63-43	274
63-44	275
63-45	276
63-46	277
63-47	278
63-48	279
63-49	280
63-50	281
63-51	282
63-52	283
63-53	284
63-54	285
63-55	286
63-56	287
63-57	288
63-58	289
63-59	290
63-60	291
63-61	292
63-62	293
63-63	294
63-64	295
63-65	296
63-66	297
63-67	298
63-68	299
63-69	300
63-70	301
63-71	302
63-72	303
63-73	304
63-74	305
63-75	306
63-76	307
63-77	308
63-78	309
63-79	310
63-80	311
63-81	312
63-82	313
63-83	314
63-84	315
63-85	316
63-86	317
63-87	318
63-88	319
63-89	320
63-90	321
63-91	322
63-92	323
63-93	324
63-94	325
63-95	326
63-96	327
63-97	328
63-98	329
63-99	330
63-100	331
63-101	332
63-102	333
63-103	334
63-104	335
63-105	336
63-106	337
63-107	338
63-108	339
63-109	340
63-110	341
63-111	342
63-112	343
63-113	344
63-114	345
63-115	346
63-116	347
63-117	348
63-118	349
63-119	350
63-120	351
63-121	352
63-122	353
63-123	354
63-124	355
63-125	356
63-126	357
63-127	358
63-128	359
63-129	360
63-130	361
63-131	362
63-132	363
63-133	364
63-134	365
63-135	366
63-136	367
63-137	368
63-138	369
63-139	370
63-140	371
63-141	372
63-142	373
63-143	374
63-144	375
63-145	376
63-146	377
63-147	378
63-148	379
63-149	380
63-150	381
63-151	382
63-152	383
63-153	384
63-154	385
63-155	386
63-156	387
63-157	388
63-158	389
63-159	390
63-160	391
63-161	392
63-162	393
63-163	394
63-164	395
63-165	396
63-166	397
63-167	398
63-168	399
63-169	400
63-170	401
63-171	402
63-172	403
63-173	404
63-174	405
63-175	406
63-176	407
63-177	408
63-178	409
63-179	410
63-180	411
63-181	412
63-182	413

【図 9 B】

クローン #	配列番号:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	100m	101	102
apu01	253	E	G	Y	R	W	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu02	254	S	G	Y	F	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu03	255	S	G	Y	F	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu04	256	G	S	I	M	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu05	257	E	Y	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu06	258	W	Q	Y	Y	G	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu07	259	S	Y	S	Y	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu08	260	E	S	Y	F	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu09	261	G	I	M	F	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu10	262	G	I	M	F	S	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu11	263	E	S	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu12	264	E	S	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu13	265	E	S	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu14	266	E	S	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
apu15	267	E	S	Y	W	Y	Y	Q	Y	T	A	I	W	Y	Y	G	Y	Y	Y	D	Y	D
コンセンサス	268	E/S/G	I/Y/M	W/Y	F/Y	S/Y	Y	Q/Y	Y	T/Y	A/Y	I/Y	W/Y	Y	Y	G/Y	Y	Y	Y	D/Y	Y	D/Y

【図 10 A】

HVR-H1

クローン #	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu01	285	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu02	286	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu03	287	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu04	288	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu05	289	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu06	270	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu07	271	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu08	272	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu09	273	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu10	274	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu11	275	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu12	276	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu13	277	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu14	278	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu15	279	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
コンセンサス	280	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H

HVR-H2

クローン #	配列番号:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu01	281	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu02	282	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu03	283	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu04	284	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu05	285	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu06	286	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu07	287	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu08	288	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu09	289	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu10	290	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu11	291	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu12	292	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu13	293	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu14	294	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu15	295	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
コンセンサス	296	S	S	S	P	Y	Y	Y	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

【図 10 B】

HVR-H3

クローン #	配列番号:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
apu01	297	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu02	298	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu03	299	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu04	300	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu05	301	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu06	302	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu07	303	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu08	304	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu09	305	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu10	306	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu11	307	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu12	308	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu13	309	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu14	310	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
apu15	311	E	G	Y	Q	Y	Q	G	F		D	Y
コンセンサス	312	E/S/G	Y/N	Y/S/K	Y/E	Y/W	Y/S	G/Y/M	A	F/I/L/n.p.	F/n.p.	Y

【図 11 A】

クローン #	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu17	329	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu18	330	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu19	331	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu20	332	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu21	333	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu22	334	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu23	335	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
apu24	336	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y
コンセンサス	337	G	E	N	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y

HVR-H1

クローン #	配列番号:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu17	338	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu18	339	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu19	340	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu20	341	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu21	342	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu22	343	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu23	344	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu24	345	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
コンセンサス	346	S	Y	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

HVR-H2

【図 10 C】

HVR-L3

クローン #	配列番号:	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
apu01	313	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu02	314	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu03	315	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu04	316	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu05	317	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu06	318	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu07	319	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu08	320	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu09	321	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu10	322	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu11	323	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu12	324	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu13	325	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu14	326	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
apu15	327	Q	Q	S	S	Y	S	S	F	P	F	T
コンセンサス	328	Q	Q	S/Y	S/Y	Y/S	S/Y	S/Y	L/S/P/Y	P/n.p.	F/V/L	T

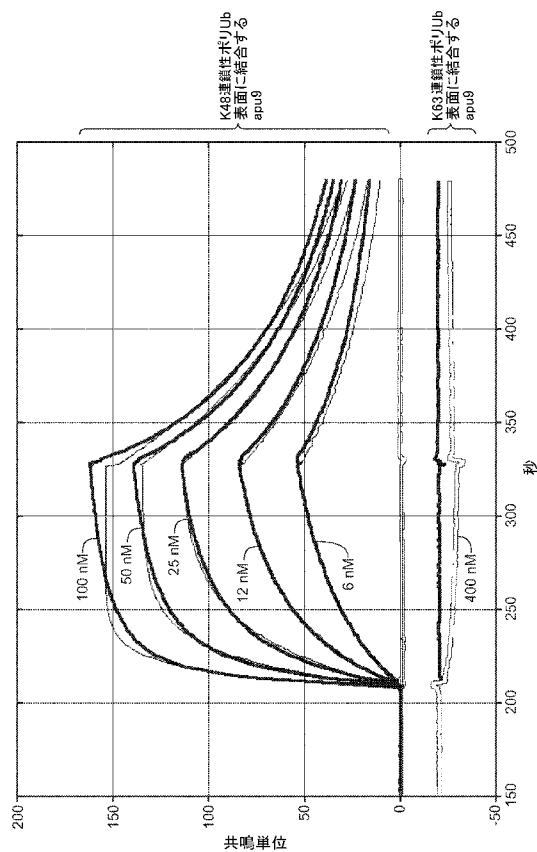
【図 1 1 B】

[illegible]

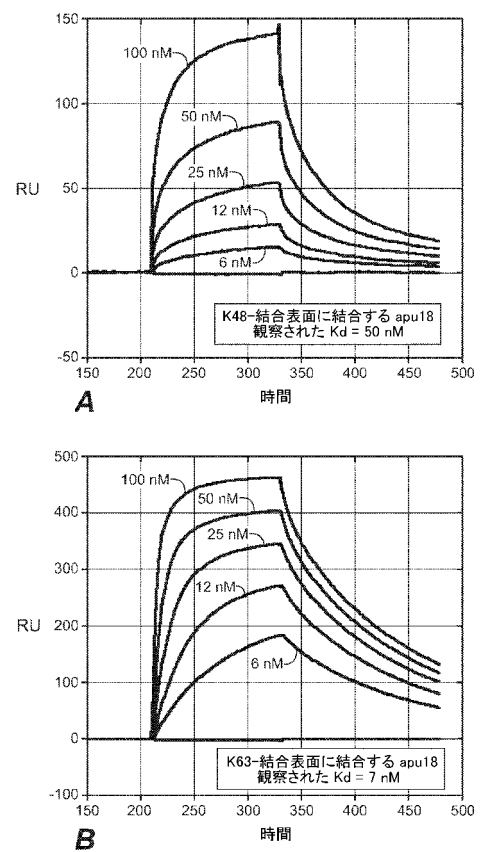
【図 1 1 C】

HVR-L3												
クローム #	配列 番号:											
		89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
apu17	356	Q	Q	Y	S	Y	Y	P			F	R
apu18	357	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu19	358	Q	Q	Y	S	S	S	L			V	T
apu20	359	Q	Q	Y	S	S	S	S	P	F	T	F
apu21	360	Q	Q	S	S	Y	S	P			I	T
apu22	361	Q	Q	Y	Y	Y	S	S	Y	L	I	T
apu23	362	Q	Q	S	Y	Y	S	P			F	T
apu24	363	Q	Q	Y	Y	S	S	L			V	T
コン サス	364	Q	Q	Y/S	S/Y	Y/S	Y/S	P/S/ L	S/P/ Y/n.p.	L/F n.p.	F/T/ T/I	R/T/ F

【図 1 2】



【图 13】



【図 1 4 A】

HVR-H1

クローン #	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
48-51	392	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-52	393	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-53	394	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-54	395	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-55	396	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-56	397	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-57	398	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-58	399	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-59	400	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-60	401	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-61	402	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-62	403	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-63	404	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-64	405	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-65	406	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-66	407	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-67	408	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-68	409	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-69	410	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-70	411	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-71	412	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-72	413	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-73	414	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-74	415	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-75	416	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-76	417	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-77	418	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-78	419	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-79	420	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-80	421	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-81	422	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-82	423	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-83	424	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-84	425	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-85	426	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-86	427	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-87	428	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-88	429	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-89	430	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-90	431	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-91	432	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-92	433	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-93	434	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-94	435	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-95	436	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-96	437	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H

【図 1 4 B】

HVR-H1 (Con't.)

クローン #	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
48-97	438	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-98	439	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-99	440	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-100	441	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-101	442	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-102	443	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-103	444	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-104	445	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-105	446	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-106	447	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-107	448	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-108	449	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-109	450	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-110	451	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-111	452	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-112	453	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-113	454	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-114	455	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-115	456	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-116	457	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-117	458	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-118	459	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
コンセンサス	460	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H

【図 1 4 C】

HVR-H2

クローン #	配列番号:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
48-51	461	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-52	462	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-53	463	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-54	464	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-55	465	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-56	466	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-57	467	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-58	468	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-59	469	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-60	470	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-61	471	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-62	472	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-63	473	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-64	474	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-65	475	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-66	476	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-67	477	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-68	478	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-69	479	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-70	480	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-71	481	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-72	482	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-73	483	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-74	484	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-75	485	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-76	486	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-77	487	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-78	488	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-79	489	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-80	490	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-81	491	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-82	492	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-83	493	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-84	494	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-85	495	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-86	496	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-87	497	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-88	498	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-89	499	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-90	500	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-91	501	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-92	502	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-93	503	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

【図 1 4 D】

クローン #	配列番号:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
48-94	504	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-95	505	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-96	506	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-97	507	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-98	508	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-99	509	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-100	510	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-101	511	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-102	512	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-103	513	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-104	514	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-105	515	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-106	516	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-107	517	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-108	518	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-109	519	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-110	520	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-111	521	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-112	522	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-113	523	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-114	524	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-115	525	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-116	526	S	I	Y	S	Y	Y	T	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-117	527	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-118	528	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
コンセンサス	529	S	I	Y/A	S/P	Y	Y	S/T	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

【図 14 E】

HVR-H3

クローン #	配列番号:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102
48-51	530	S	Y	N	N	T	T	S	I	D	Y
48-52	531	G	Y	S	W	Y	N	A	M	D	Y
48-53	532	G	Y	S	W	F	N	A	I	D	Y
48-54	533	G	Y	Y	W	F	D	A	M	D	Y
48-55	534	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-56	535	S	Y	S	Y	R	E	T	M	D	Y
48-57	536	S	Y	S	Y	R	E	T	M	D	Y
48-58	537	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-59	538	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-60	539	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-61	540	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-62	541	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-63	542	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-64	543	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-65	544	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-66	545	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-67	546	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-68	547	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-69	548	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-70	549	S	Y	S	Y	S	F	G	M	D	Y
48-71	550	S	Y	S	Y	F	M	G	M	D	Y
48-72	551	S	Y	S	Y	H	V	A	F	D	Y
48-73	552	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-74	553	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-75	554	S	Y	S	Y	H	L	A	F	D	Y
48-76	555	S	Y	S	Y	S	L	A	F	D	Y
48-77	556	S	Y	S	Y	Y	I	A	M	D	Y
48-78	557	S	Y	S	Y	Y	M	G	M	D	Y
48-79	558	S	Y	S	Y	S	M	G	M	D	Y
48-80	559	S	Y	S	Y	H	V	A	M	D	Y
48-81	560	S	Y	S	Y	H	M	G	M	D	Y
48-82	561	S	Y	S	Y	H	L	G	M	D	Y
48-83	562	S	Y	S	Y	Y	Q	G	F	D	Y
48-84	563	S	Y	S	Y	S	M	G	M	D	Y
48-85	564	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-86	565	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-87	566	S	Y	S	Y	S	E	A	L	D	Y
48-88	567	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-89	568	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-90	569	S	Y	S	Y	F	M	G	M	D	Y
48-91	570	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-92	571	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-93	572	S	Y	S	Y	Y	L	A	M	D	Y
48-94	573	S	Y	S	Y	F	I	G	M	D	Y
48-95	574	S	Y	S	Y	H	L	G	M	D	Y

【図 14 F】

クローン #	配列番号:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102
48-96	575	S	Y	S	Y	T	E	A	F	D	Y
48-97	576	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-98	577	S	Y	S	Y	T	Y	G	L	D	Y
48-99	578	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-100	579	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-101	580	S	Y	S	Y	W	V	G	M	D	Y
48-102	581	S	Y	S	Y	T	L	A	M	D	Y
48-103	582	S	Y	S	Y	T	M	G	L	D	Y
48-104	583	S	Y	S	Y	F	L	G	M	D	Y
48-105	584	S	Y	S	Y	H	M	G	F	D	Y
48-106	585	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-107	586	S	Y	S	Y	Y	E	A	F	D	Y
48-108	587	S	Y	S	Y	R	M	A	F	D	Y
48-109	588	S	Y	S	Y	H	I	A	F	D	Y
48-110	589	S	Y	S	Y	S	V	G	M	D	Y
48-111	590	S	Y	S	Y	T	L	G	M	D	Y
48-112	591	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-113	592	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-114	593	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-115	594	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-116	595	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-117	596	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-118	597	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
コンセンサス	598	S/G	Y	S/N/Y	Y/N/W	T/Y/F/R/S/H/W	T/N/D/S/E/F/M/Y/L/I/Y	S/A/T/G	I/M/F/L	D	Y

【図 15 A】

HVR-H1

クローン #	配列番号:	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
63-21	599	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-22	600	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-23	601	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-24	602	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-25	603	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-26	604	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-27	605	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-28	606	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-29	607	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-30	608	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-31	609	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-32	610	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-33	611	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-34	612	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-35	613	G	F	N	F	S	S	S	Y	I	H
63-36	614	G	F	N	I	K	G	S	L	I	H
63-37	615	G	F	N	I	K	G	S	I	M	H
63-38	616	G	F	N	I	K	S	S	I	M	H
63-39	617	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-40	618	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-41	619	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-42	620	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-43	621	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-44	622	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-45	623	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-46	624	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-47	625	G	F	N	L	A	S	S	F	M	H
63-48	626	G	F	N	L	V	S	S	L	M	H
63-49	627	G	F	N	V	K	T	G	L	I	H
63-50	628	G	F	N	V	K	W	N	Y	I	H
63-51	629	G	F	N	V	V	S	S	F	I	H
コンセンサス	630	G	F	N	I/F/L/V	S/K/A/V	S/G/T/W	S/G/N	Y/L	I/M	H

【図 15 B】

HVR-H2

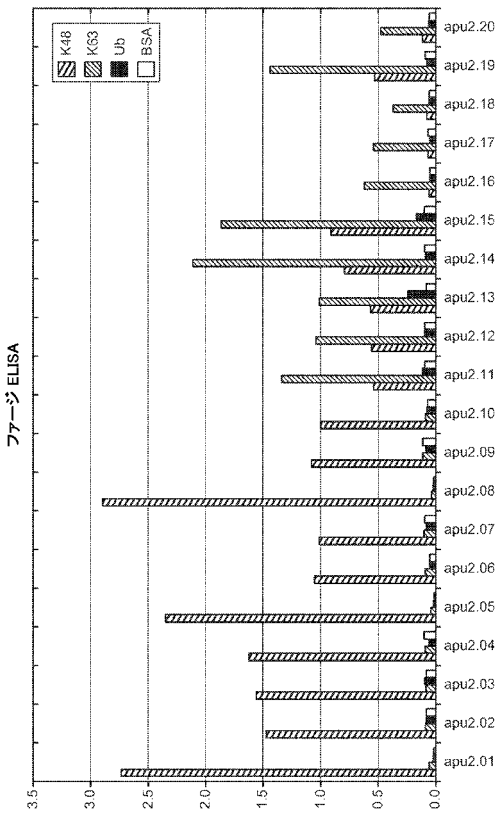
クローン #	配列番号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
63-21	631	A	I	A	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-22	632	A	I	P	P	F	Y	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-23	633	A	I	Q	P	Y	F	G	W	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
63-24	634	A	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-25	635	D	I	A	P	Y	L	G	T	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
63-26	636	D	I	S	P	W	Y	G	G	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-27	637	D	I	S	S	Y	T	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
63-28	638	F	I	Q	P	Y	Y	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
63-29	639	F	I	S	P	Y	L	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
63-30	640	G	I	T	P	Y	L	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-31	641	H	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-32	642	I	I	S	P	Y	L	G	S	T	G	Y	A	D	S	V	K	G
63-33	643	S	I	T	P	Y	Y	G	W	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
63-34	644	W	I	S	P	Y	L	G	R	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-35	645	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-36	646	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-37	647	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-38	648	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-39	649	Y	I	G	P	F	T	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
63-40	650	Y	I	S	P	F	L	S	T	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-41	651	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-42	652	Y	I	S	P	Y	S	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
63-43	653	Y	I	S	P	Y	Y	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-44	654	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-45	655	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-46	656	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-47	657	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-48	658	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-49	659	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-50	660	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-51	661	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
コンセンサス	662	A/D/I/F/G/H/S/W/Y	I	A/P/Q/S/T/G	P/S	Y/F	L/Y/FIT	G/S	S/W/T/GR	T	S/I/K/D/N/G/R	Y	A	D	S	V	K	G

【図 1 7 B】

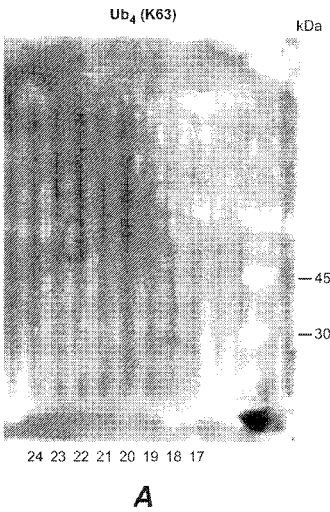
HVR-L3

クローン #	配列番号	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
apu2.11	772	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.12	773	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.13	774	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.14	775	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.15	776	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.16	777	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.17	778	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.18	779	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.19	780	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.20	781	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
コンセンサス	782	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T

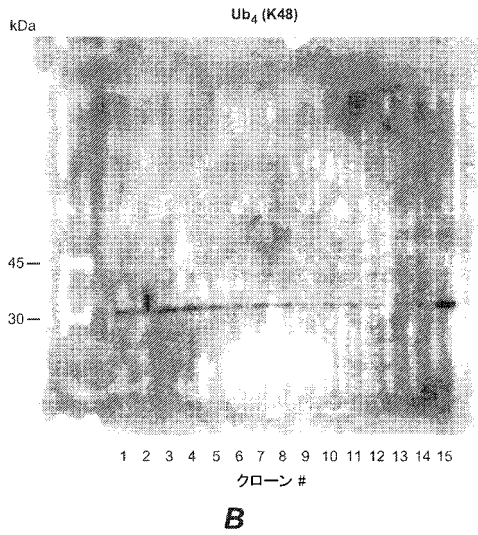
【図 1 8】



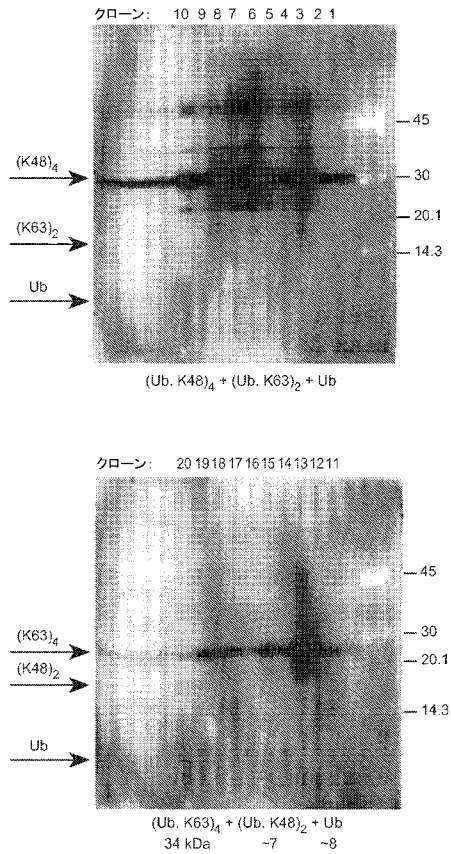
【図 1 9 A】



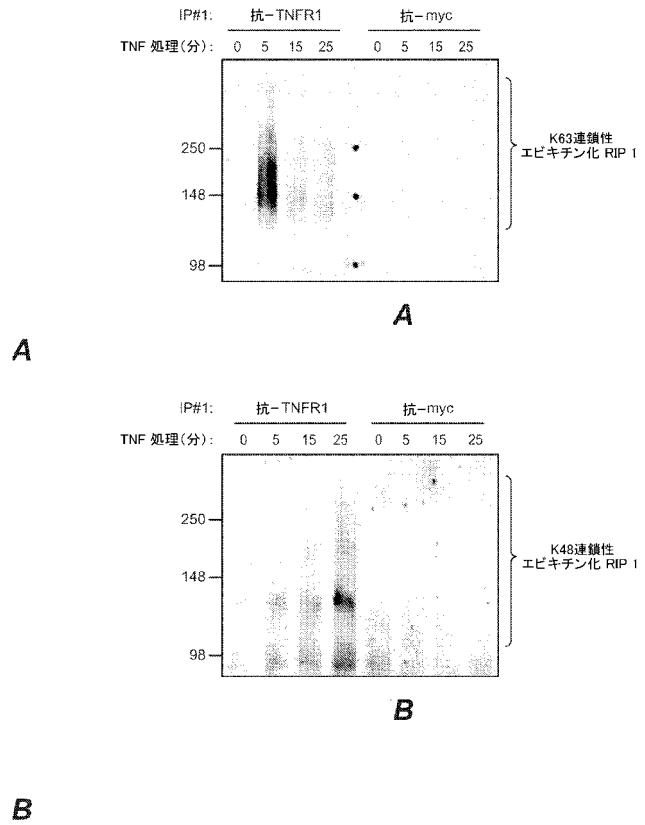
【図 1 9 B】



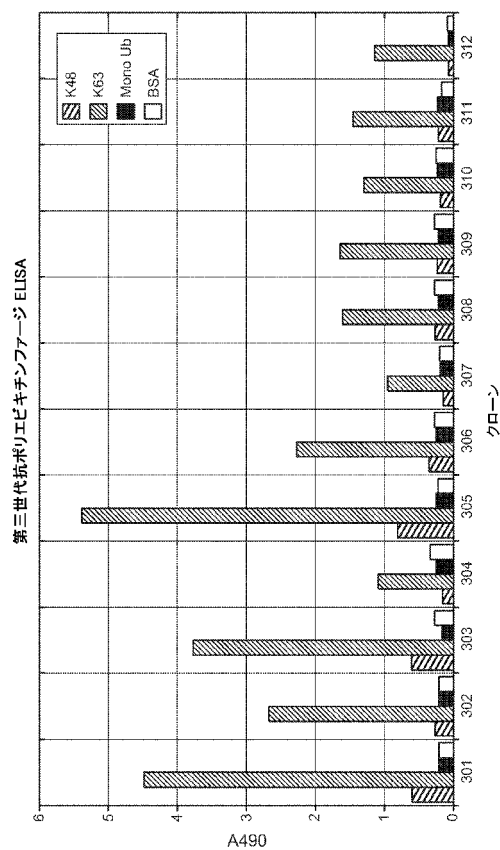
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【図 23 A】

HVR-H1

クローン #	配列番号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu3.01	789	G	F	N	V	K	T	G	F	M	H
apu3.02	790	G	F	N	V	K	T	G	F	I	H
apu3.03	791	G	F	N	I	K	M	V	F	M	H
apu3.04	792	G	F	N	V	K	N	F	I	I	H
apu3.05	793	G	F	N	V	K	T	G	F	M	H
apu3.06	794	G	F	N	V	K	R	G	F	M	H
apu3.07	795	G	F	N	L	K	T	G	F	I	H
apu3.08	796	G	F	N	V	K	T	G	Y	M	H
apu3.09	797	G	F	N	V	K	T	G	L	I	H
apu3.10	798	G	F	N	V	M	I	G	I	I	H
apu3.11	799	G	F	N	I	K	T	G	F	M	H
apu3.12		ND									
コンセンサス	800	G	F	N	V/L	K/M	T/M	G/V	F/I	M/I	H

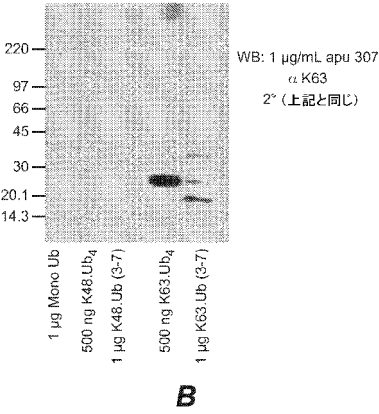
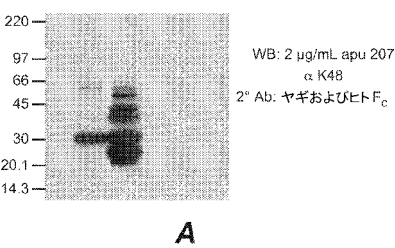
HVR-H2																		
クローン #	配列番号:																	
			50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
apu3.01	801	Y	I	S	P	Y	Y	G	W	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.02	802	Y	I	S	P	Y	L	G	V	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.03	803	Y	I	S	P	Y	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.04	804	Y	I	I	P	Y	S	G	N	T	V	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.05	805	Y	I	S	P	Y	S	G	R	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.06	806	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.07	807	Y	I	S	P	Y	W	G	S	T	T	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.08	808	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.09	809	Y	I	S	P	Y	F	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.10	810	Y	I	I	P	Y	S	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.11	811	Y	I	T	P	Y	W	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.12		ND																
コンセンサス	812	Y	I	S/I/T	P	Y	Y/L/D/S/W	G	W/V/S/N/R/Y	T	R/N/V/T/S/K	Y	A	D	S	V	K	G

【図 2 3 B】

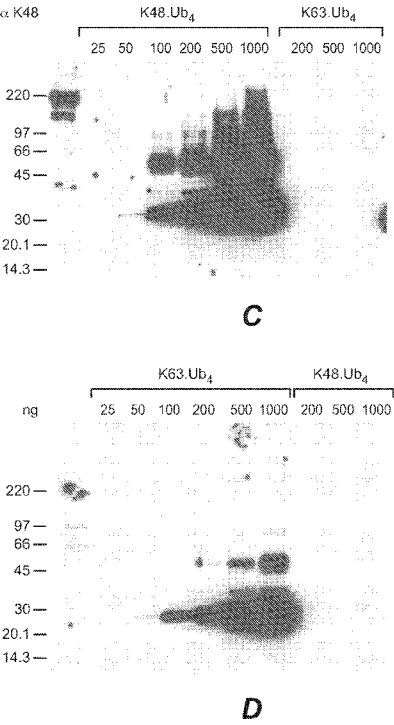
HVR-H3

クローン #	配列番号:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
apu3.01	813	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.02	814	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.03	815	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.04	816	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.05	817	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.06	818	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.07	819	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.08	820	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.09	821	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.10	822	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.11	823	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.12						ND						
コンセンサス	824	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y

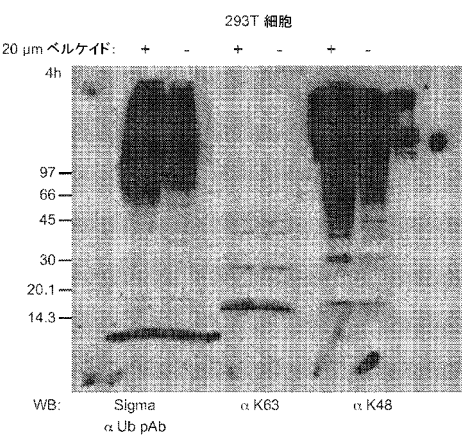
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



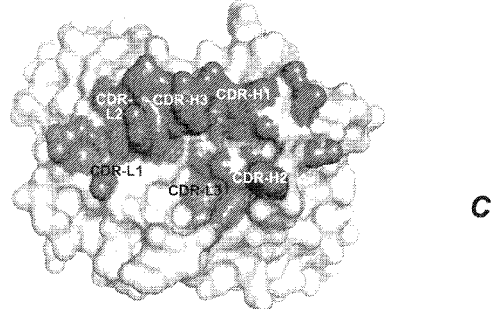
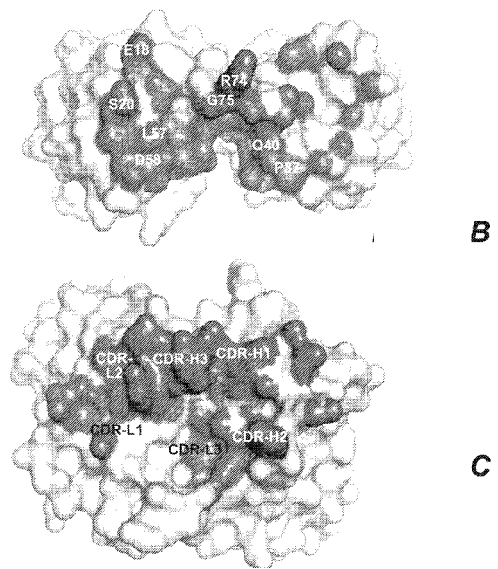
【図 2 5】



【図 26 A】



【図 26 B】



【配列表】

0005358187000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 ケリー, ロバート エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94066, サン ブルーノ, サン フェリペ アベニュー 1029

(72)発明者 ファム, アン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91801, アルハンブラ, 102号, ノース チャペル アヴェニュー 400

(72)発明者 ハイモヴィッツ, サラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109, サン フランシスコ, フランシスコ ストリート 1050

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特開平07-238096 (JP, A)
FEBS Lett., 1994年 8月 1日, Vol.349, No.2, pp.173-180
Genes Cells, 2004年10月, Vol.9, No.10, pp.865-875

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/90
C 0 7 K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed