

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5523345号
(P5523345)

(45) 発行日 平成26年6月18日 (2014. 6. 18)

(24) 登録日 平成26年4月18日 (2014. 4. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18

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

請求項の数 34 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-543287 (P2010-543287)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月16日 (2009. 1. 16)
 (65) 公表番号 特表2011-511624 (P2011-511624A)
 (43) 公表日 平成23年4月14日 (2011. 4. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/031310
 (87) 国際公開番号 W02009/126350
 (87) 国際公開日 平成21年10月15日 (2009. 10. 15)
 審査請求日 平成24年1月11日 (2012. 1. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/011, 577
 (32) 優先日 平成20年1月18日 (2008. 1. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/127, 862
 (32) 優先日 平成20年5月16日 (2008. 5. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (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 940
 66, サン ブルーノ, サン フェリ
 ペ アベニュー 1029

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K 6 3 結合型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】

K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンと特異的に結合しない抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2】

配列番号 6 0 - 1 1 0 の H V R - H 2 アミノ酸配列、及び 8 - 5 8 の H V R - L 2 アミノ酸配列から選択される一の超可変 (H V R) アミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 3】

配列番号 6 0 - 1 1 0 の H V R - H 2 アミノ酸配列から選択される H V R - H 2 アミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 4】

配列番号 6 0、6 3 及び 6 6 の H V R - H 2 アミノ酸配列から選択される H V R - H 2 アミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 5】

配列番号 8 - 5 8 の H V R - L 2 アミノ酸配列から選択される H V R - L 2 アミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 6】

配列番号 8、1 1 及び 1 4 の H V R - L 2 アミノ酸配列から選択される H V R - L 2 ア

10

20

ミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 7】

配列番号 60 - 110 の HVR - H2 アミノ酸配列 から選択される HVR - H2 アミノ酸配列、及び配列番号 8 - 58 の HVR - L2 アミノ酸配列 から選択される HVR - L2 アミノ酸配列 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 8】

配列番号 60、63 及び 66 の HVR - H2 アミノ酸配列 から選択される HVR - H2 アミノ酸配列、及び配列番号 8、11 及び 14 の HVR - L2 アミノ酸配列 から選択される HVR - L2 アミノ酸配列 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 9】

表 B の Apu3 . A8 - Apu3 . H10 の何れか一つに示される、配列番号 60 - 110 及び配列番号 8 - 58 に各々記載の HVR - H2 及び HVR - L2 アミノ酸配列 から選択される HVR アミノ酸配列 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 10】

表 B の Apu3 . A8、Apu3 . A12 及び Apu3 . B3 の何れか一つに示される、配列番号 60 及び 8、63 及び 11、並びに 66 及び 14 に各々記載の HVR - H2 及び HVR - L2 アミノ酸配列 から選択される HVR アミノ酸配列 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 11】

配列番号 5 の HVR - H1 アミノ酸配列、配列番号 6 の HVR - H3 アミノ酸配列、配列番号 3 の HVR - L1 アミノ酸配列 及び配列番号 4 の HVR - L3 アミノ酸配列 から選択される少なくとも一つの HVR アミノ酸配列 を含む、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 12】

配列番号 5 の HVR - H1 アミノ酸配列、配列番号 6 の HVR - H3 アミノ酸配列、配列番号 3 の HVR - L1 アミノ酸配列 及び配列番号 4 の HVR - L3 アミノ酸配列 から選択される少なくとも 2 つの HVR アミノ酸配列 を含む、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 13】

配列番号 5 の HVR - H1 アミノ酸配列、配列番号 6 の HVR - H3 アミノ酸配列、配列番号 3 の HVR - L1 アミノ酸配列 及び配列番号 4 の HVR - L3 アミノ酸配列 から選択される少なくとも 3 つの HVR アミノ酸配列 を含む、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 14】

配列番号 5 の HVR - H1 アミノ酸配列、配列番号 6 の HVR - H3 アミノ酸配列、配列番号 3 の HVR - L1 アミノ酸配列 及び配列番号 4 の HVR - L3 アミノ酸配列 を含む、請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 15】

配列番号 5 の HVR - H1 アミノ酸配列、配列番号 60 の HVR - H2 アミノ酸配列、配列番号 6 の HVR - H3 アミノ酸配列、配列番号 3 の HVR - L1 アミノ酸配列、配列番号 8 の HVR - L2 アミノ酸配列及び配列番号 4 の HVR - L3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 16】

K63 結合型ポリユビキチンに対する抗体又はその抗原結合性断片の親和性が、配列番号 59 の HVR - H2 アミノ酸配列及び配列番号 7 の HVR - L2 アミノ酸配列を含む親の Fab Apu2 . 16 の親和性に比較して高まっている、請求項 1 から 15 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 17】

K63 結合型ポリユビキチンに対する抗体又はその抗原結合性断片の K_d 値が 10 nM 又はそれ未満である、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合性断

10

20

30

40

50

片。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 7 の何れかの抗体又はその抗原結合性断片と、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又は抗原結合性断片であって、モノユビキチンと特異的に結合しない抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 1 9】

ポリユビキチンへの結合について、請求項 1 から 1 7 の何れかの抗体又はその抗原結合性断片と競合する、単離された抗体又は抗原結合性断片であって、モノユビキチンと特異的に結合しない抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 0】

抗体又は抗原結合性断片が K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質に特異的に結合する、請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 1】

抗体又は抗原結合性断片が K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質の分解を阻害する、請求項 2 0 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 2】

抗体又は抗原結合性断片が少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を調整する、請求項 2 0 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 3】

抗体又は抗原結合性断片は少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を阻害する、請求項 2 0 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 4】

抗体又は抗原結合性断片は少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を刺激する、請求項 2 0 に記載の抗体又は抗原結合性断片。

【請求項 2 5】

請求項 1 から 1 7 の何れか一項の抗体又は抗原結合性断片をコードする核酸分子。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の抗体又は抗原結合性断片を産生することができる細胞株。

【請求項 2 9】

請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の抗体又は抗原結合性断片を産生する方法であって、抗体又は抗原結合性断片が産生される条件下で、抗体又は抗原結合性断片をコードする核酸分子を含む宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 3 0】

試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質の存在を同定する方法であって、請求項 1 から 1 7 の何れかに記載の少なくとも一つの抗体又は抗原結合性断片に、該試料を接触させることを含む方法。

【請求項 3 1】

K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質を含むことが疑われる試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型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 1 7 の何れかの少なくとも一つの抗体又は抗原結合性断片に暴露すること、及び該試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質への少なくとも一つの抗体又は抗原結合性断片の結合性を測定することを含んでなる方法。

【請求項 3 2】

試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質を非 K 6 3 結合型ポリユビキチン化

10

20

30

40

50

タンパク質から分離する方法であって、請求項 1 から 17 の何れかに記載の少なくとも 1 つの抗体又は抗原結合性断片に試料を接触させることを含む方法。

【請求項 33】

細胞中の K63 結合型ポリユビキチンの機能及び / 又は活性を測定する方法であって、請求項 1 から 17 の何れかに記載の少なくとも 1 つの抗体又は抗原結合性断片に細胞を接触させること、及び細胞における該接触工程の効果を評価することを含む方法。

【請求項 34】

試料中の K63 結合型ポリユビキチンの機能及び / 又は活性を測定する方法であって、請求項 1 から 17 の何れかに記載の少なくとも 1 つの抗体又は抗原結合性断片に試料を接触させること、及び試料における該接触工程の効果を評価することを含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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。

【背景技術】

【0002】

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 26S 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 B キナーゼによる I B のリン酸化により、I B のユビキチン化とその後の 26S のプロテアソームによる分解が促される；I B は N K B のインヒビターであるので、I B の分解は N K 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 DNA 修復を媒介する (Sun and Chen, Curr. Opin. Cell Biol. 16:119-126 (2004) を参照)。DNA が損傷されると、増殖性細胞核抗原 (PCNA) のモノユビキチン化により、DNA が破壊されていても DNA 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

【0003】

標的タンパク質への 76 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 E1 は、ATP 依存性反応においてユビキチン-E1 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-E1 チオエステルから、ユビキチン-コンジュゲート酵素 (E2) 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 (E3) 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関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 40 の異なる E2 s、500 の異なる E3、及び 80 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

【0004】

50

ユビキチンは7つのリジン残基(L y s 6、L y s 1 1、L y s 2 7、L y s 3 3、L y s 2 9、L y s 4 8およびL y s 6 3)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つ(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まう。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結合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結合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。

【 0 0 0 5 】

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。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))。

【 0 0 0 6 】

さらに、異なるリジン結合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L y s 4 8-結合理型とL y s 6 3-結合理型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-結合理型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、L y s 4 8-結合理型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、L y s 4 8-結合理型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しう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、L y s 6 3-結合理型ポリユビキチンは、DNA修復(K 6 3 R-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K 6 3-結合理型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K 4 8-結合理型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(Peng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K 6 3-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))。

【 0 0 0 7 】

他のリジン-結合型ポリユビキチンは、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に頼っている。これらの方法のそれぞれは、特定のリジン-結合型ポリユビキチンの正常な生理学的性質の分析に不適當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))、異なるリジン結合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。

【 0 0 0 8 】

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 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))。

【 0 0 0 9 】

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Mycの能力を破壊する突然変異は、c-Myc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))。

【 0 0 1 0 】

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UbcH7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當な凝集が生じる(McNaught等, Nature Rev. Neurosci. 2: 589-594 (2001)を参照)。また、U C H - L 1突然変異は、ハンチントン舞蹈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ッ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))。

【 0 0 1 1 】

リジン結合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ゆうするだけでなく、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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 3 】

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。

一実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体はK 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチオンに特異的に結合しないものを提供する。一態様では、本発明は、それぞれ配列番号 5 9 - 1 1 0 と 1 1 2、及び配列番号 7 - 5 8 と 1 1 1 の任意の H V R - H 2 及び H V R - L 2 から選択される、少なくとも一つの超可変 (H V R) 配列を含む単離された抗体又は抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 1 4 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又は抗原結合性断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合性断片は、K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンと特異的に結合せず、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つの H V R - H 2 配列を含んでなり、H V R - H 2 は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p (配列番号 2 2 1) を含み、ここでアミノ酸 a はアミノ酸チロシン、アスパラギン酸及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 b はイソロイシンであり；アミノ酸 c は、アミノ酸セリン、スレオニン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン及びバリンから選択され；アミノ酸 d はプロリンであり；アミノ酸 e はチロシンであり；アミノ酸 f は、アミノ酸チロシン、フェニルアラニン、ロイシン及びヒスチジンから選択され；アミノ酸 g はグリシンであり；アミノ酸 h は、アミノ酸セリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 i はスレオニンであり；アミノ酸 j はセリンであり；アミノ酸 k はチロシンであり；アミノ酸 l はアラニンであり；アミノ酸 m はアスパラギン酸であり；アミノ酸 n はセリンであり；アミノ酸 o はバリンであり、アミノ酸 p はリジンである。

【 0 0 1 5 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体はK 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチオンに特異的に結合しないものであり、配列番号 5 9 - 1 1 0 及び 1 1 2 の H V R - H 2 配列から選択される少なくとも一つの H V R - H 2 配列を含む抗体または抗原結合性断片を提供する。一態様では、抗体または抗原結合性断片は配列番号 6 0、6 3 及び 6 6 の H V R - H 2 配列から選択される少なくとも一つの H V R - H 2 配列を含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離さ

10

20

30

40

50

れた抗体又は抗原結合性断片を提供し、ここで、抗体又は抗原結合性断片は、K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンと特異的に結合せず、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つのH V R - L 2 配列を含んでなり、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つのH V R - L 2 配列を含んでなり、H V R - L 2 は、アミノ酸配列 q r s t u v w x (配列番号 2 2 2) を含み、ここで、アミノ酸 q は、アミノ酸チロシン及びフェニルアラニンから選択され；アミノ酸 r は、アミノ酸アラニン及びセリンから選択され；アミノ酸 s はアラニンであり；アミノ酸 t は、アミノ酸セリン、アルギニン、バリン、スレオニン、アラニン、アスパラギン及びロイシンから選択され；アミノ酸 u はセリンであり；アミノ酸 v はロイシンであり；アミノ酸 w はチロシンであり、アミノ酸 x はセリンである。

10

【 0 0 1 7 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体又はその抗原結合性断片はK 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンに特異的に結合しないものであり、配列番号 7 - 5 8 及び 1 1 1 のH V R - L 2 配列から選択される少なくとも一つのH V R - L 2 配列を含む抗体または抗原結合性断片を提供する。一態様では、抗体または抗原結合性断片は配列番号 8、1 1 及び 1 4 のH V R - L 2 配列から選択される少なくとも一つのH V R - L 2 配列を含む。

【 0 0 1 8 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片を提供するものであって、該抗体又はその抗原結合性断片はK 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンに特異的に結合しないものであり、抗体または抗原結合性断片はH V R - H 2 及びH V R - L 2 から選択される少なくとも一つの配列を含んでなり、ここでH V R - H 2 は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p (配列番号 2 2 1) を含み、アミノ酸 a は、アミノ酸チロシン、アスパラギン酸及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 b はイソロイシンであり；アミノ酸 c は、アミノ酸セリン、スレオニン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン及びバリンから選択され；アミノ酸 d はプロリンであり；アミノ酸 e はチロシンであり；アミノ酸 f は、アミノ酸チロシン、フェニルアラニン、ロイシン及びヒスチジンから選択され；アミノ酸 g はグリシンであり；アミノ酸 h は、アミノ酸セリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 i はスレオニンであり；アミノ酸 j はセリンであり；アミノ酸 k はチロシンであり；アミノ酸 l はアラニンであり；アミノ酸 m はアスパラギン酸であり；アミノ酸 n はセリンであり；アミノ酸 o はバリンであり、アミノ酸 p はリジンであり；更にH V R - L 2 は、アミノ酸配列 q r s t u v w x (配列番号 2 2 2) を含み、ここで、アミノ酸 q は、アミノ酸チロシン及びフェニルアラニンから選択され；アミノ酸 r は、アミノ酸アラニン及びセリンから選択され；アミノ酸 s はアラニンであり；アミノ酸 t は、アミノ酸セリン、アルギニン、バリン、スレオニン、アラニン、アスパラギン及びロイシンから選択され；アミノ酸 u はセリンであり；アミノ酸 v はロイシンであり；アミノ酸 w はチロシンであり、アミノ酸 x はセリンである。

20

30

40

【 0 0 1 9 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片を提供するものであって、該抗体又はその抗原結合性断片はK 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチンと特異的に結合しないものであり、抗体または抗原結合性断片は少なくとも1つのH V R - H 2 配列及び少なくとも1つのH V R - L 2 配列を含んでなり、ここでH V R - H 2 は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p (配列番号 2 2 1) を含み、ここで、アミノ酸 a は、アミノ酸チロシン、アスパラギン酸及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 b はイソロイシンであり；アミノ酸 c は、アミノ酸セリン、スレオニン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン及びバリンから選択され；アミノ酸 d はプロリンであり；アミ

50

ノ酸 e はチロシンであり；アミノ酸 f は、アミノ酸チロシン、フェニルアラニン、ロイシン及びヒスチジンから選択され；アミノ酸 g はグリシンであり；アミノ酸 h は、アミノ酸セリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びトリプトファンから選択され；アミノ酸 i はスレオニンであり；アミノ酸 j はセリンであり；アミノ酸 k はチロシンであり；アミノ酸 l はアラニンであり；アミノ酸 m はアスパラギン酸であり；アミノ酸 n はセリンであり；アミノ酸 o はバリンであり、アミノ酸 p はリジンであり；更に H V R - L 2 は、アミノ酸配列 q r s t u v w x (配列番号 2 2 2) を含み、ここでアミノ酸 q は、アミノ酸チロシン及びフェニルアラニンから選択され；アミノ酸 r は、アミノ酸アラニン及びセリンから選択され；アミノ酸 s はアラニンであり；アミノ酸 t はアミノ酸セリン、アルギニン、バリン、スレオニン、アラニン、アスパラギン及びロイシンから選択され；アミノ酸 u はセリンであり；アミノ酸 v はロイシンであり；アミノ酸 w はチロシンであり、アミノ酸 x はセリンである。

10

【 0 0 2 0 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体又はその抗原結合性断片は K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチオンと特異的に結合しないものであり、配列番号 5 9 - 1 1 0 と 1 1 2 の H V R - H 2 配列から選択される少なくとも 1 つの H V R - H 2 配列及び配列番号 7 - 5 8 と 1 1 1 の H V R - L 2 配列から選択される少なくとも 1 つの H V R - L 2 配列を含む抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 1 】

20

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体又はその抗原結合性断片は K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチオンと特異的に結合しないものであり、配列番号 6 0、6 3 及び 6 6 の H V R - H 2 配列から選択される少なくとも 1 つの H V R - H 2 配列及び配列番号 8、1 1 及び 1 4 の H V R - L 2 配列から選択される少なくとも 1 つの H V R - L 2 配列を含む抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 2 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンと特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片であって、該抗体又はその抗原結合性断片は K 4 8 結合型ポリユビキチン又はモノユビキチオンと特異的に結合しないものであり、表 B の A p u 3 . A 8 - A p u 3 . H 1 0 の何れか一つに示される H V R - H 2 及び H V R - L 2 アミノ酸配列から選択される H V R アミノ酸配列を含む抗体又はその抗原結合性断片を提供する。一態様では、H V R アミノ酸配列は、表 B の A p u 3 . A 8、A p u 3 . A 1 2 及び A p u 3 . B 3 の何れか一つに示される H V R - H 2 及び H V R - L 2 アミノ酸配列から選択される。一態様では、前記抗体または抗原結合性断片の何れかは、配列番号 5 の H V R - H 1 配列、配列番号 6 の H V R - H 3 配列、配列番号 3 の H V R - L 1 配列及び配列番号 4 の H V R - L 3 配列から選択される少なくとも一つの H V R 配列を含む。一態様では、前記抗体または抗原結合性断片の何れかは、配列番号 5 の H V R - H 1 配列、配列番号 6 の H V R - H 3 配列、配列番号 3 の H V R - L 1 配列及び配列番号 4 の H V R - L 3 配列から選択される少なくとも 2 つの H V R 配列を含む。一態様では、前記抗体または抗原結合性断片の何れかは、配列番号 5 の H V R - H 1 配列、配列番号 6 の H V R - H 3 配列、配列番号 3 の H V R - L 1 配列及び配列番号 4 の H V R - L 3 配列から選択される少なくとも 3 つの H V R 配列を含む。一態様では、前記抗体または抗原結合性断片の何れかは、K 6 3 結合型ポリユビキチンについての親の F a b A p u 2 . 1 6 の親和性に対して、改良された K 6 3 結合型ポリユビキチンに対する親和性を有する。一態様では、前記抗体または抗原結合性断片の何れかは、1 0 n M 又はそれ未満の、K 6 3 結合型ポリユビキチンについての K d 値を有する。

30

40

【 0 0 2 3 】

50

別の実施態様では、本発明は、上記抗体又は抗原結合性断片の何れかと、ポリユビキチン上の同じ抗原決定基に結合する、単離された抗体または抗原結合性断片であって、モノユビキチンと特異的に結合しない抗体または抗原結合性断片を提供する。別の実施態様では、本発明は、上記抗体又は抗原結合性断片の何れかはポリユビキチンとの結合について競合する、単離された抗体または抗原結合性断片であって、モノユビキチンと特異的に結合しない抗体または抗原結合性断片を提供する。ポリユビキチンとの結合について 別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンのエピトープと結合する単離された抗体または抗原結合性断片を提供する。一態様では、エピトープは、K 6 3 結合型ポリユビキチンの第 1 のユビキチンサブユニット及び第 2 のユビキチンサブユニットの残基に含む。別態様では、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 1 のユビキチンサブユニットの少なくとも 1 つの残基を含む。別態様では、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、及び G l y - 7 5 から選択される第 2 のユビキチンサブユニットの少なくとも 1 つの残基を含む。別態様では、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 1 のユビキチンサブユニットの少なくとも 1 つの残基、及び 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 2 のユビキチンサブユニットの少なくとも 1 つの残基を含む。別態様では、H V R H 3 の N 末端部分は、C 末端残基及び供与体ユビキチンの Q 4 0 と接触する。別態様では、H V R H 3 の末端部分は、K 6 3 受容体ユビキチンの 5 0 S ループと接触する。別態様では、H V R H 3 の N 末端部分は C 末端残基 7 2 - 7 4 と供与体ユビキチンの Q 4 0 と接触し、その一方で H V R H 3 の残基 R 1 0 2 及び Y 1 0 3 は K 6 3 受容体ユビキチンの 5 0 S ループと接触する。別態様では、供与体ユビキチンの C 末端残基は、抗体または抗原結合性断片と接触する。別態様では、接触に関係する供与体ユビキチン残基は、L 7 3 と R 7 4 である。

【 0 0 2 4 】

別の実施態様では、本発明は、その軽鎖と K 6 3 受容体ユビキチンの表面との間の改良された荷電相補性を含む、単離された抗体または抗原結合性断片を提供する。一態様では、抗体または抗原結合性断片は、H V R L 2 の位置 5 2 に A r g を含む。別態様では、抗体または抗原結合性断片は、軽鎖フレームワーク領域の位置 6 6 に A r g を含む。別態様では、抗体または抗原結合性断片は、H V R L 2 の位置 5 2 に A r g を、軽鎖フレームワーク領域の位置 6 6 に A r g を含む。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、上記の抗体または抗原結合性断片の何れかは、K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質と特異的に結合する。一態様では、抗体または抗原結合性断片は、K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質の分解を阻害する。別態様では、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を調整する。別態様では、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を阻害する。別態様では、抗体または抗原結合性断片は、少なくとも一つのポリユビキチン介在性シグナル伝達経路を刺激する。

【 0 0 2 6 】

別の実施態様では、本発明は、上記抗体または抗原結合性断片の何れかをコードする核酸分子を提供する。別の実施態様では、本発明は、このような核酸分子を含むベクターを提供する。別の実施態様では、本発明は、このようなベクターを含む宿主細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は、上記抗体または抗原結合性断片の何れかを産生することができる細胞株を提供する。別の実施態様では、本発明は、本発明は、上記抗体または抗

原結合性断片の何れかを産生する方法であって、抗体または抗原結合性断片が産生される条件下で、抗体または抗原結合性断片をコードする核酸分子を含む宿主細胞を培養することを含む方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

別の実施態様では、本発明は、上記抗体または抗原結合性断片の有効量及び薬学的に許容可能な担体を含む組成物を提供する。一態様では、組成物は、2 以上の上記抗体または抗原結合性断片を含む。

【 0 0 2 8 】

別の実施態様では、本発明は、試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質の存在を同定する方法であって、少なくとも 1 つの上記抗体または抗原結合性断片に、該試料を接触させることを含む方法を提供する。

10

【 0 0 2 9 】

別の実施態様では、本発明は、患者のポリユビキチンの調節不全に関連する疾患または状態の治療方法であって、患者に少なくとも 1 つの上記抗体または抗原結合性断片の有効量を投与することを含む方法を提供する。一態様では、患者は、哺乳動物の患者である。別態様では、患者はヒトである。別態様では、疾患は、癌、筋疾患、ユビキチン経路関連遺伝的疾患、免疫性 / 炎症性疾患及び神経疾患から選択される。別態様では、疾患は、癌腫、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、ピック病及びパジェット病から選択される。

20

【 0 0 3 0 】

別の実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンまたは K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質を含むことが疑われる試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチンまたは K 6 3 結合型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、試料を上記抗体または抗原結合性断片のうちの少なくとも 1 つに暴露すること及び試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン又は K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質に少なくとも一つの上記抗体または抗原結合性断片の結合性を測定することを含んでなる方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

別の実施態様では、本発明は、試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質を非 K 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、少なくとも 1 つの上記抗体又は抗原結合性断片に試料を接触させることを含む方法を提供する。

30

【 0 0 3 2 】

別の実施態様では、本発明は、細胞中の K 6 3 結合型ポリユビキチンの機能及び / 又は活性を測定する方法であって、少なくとも 1 つの上記抗体又は抗原結合性断片に細胞を接触させること及び細胞における上記接触工程の効果を評価することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

別の実施態様では、本発明は、試料中の K 6 3 結合型ポリユビキチンの機能及び / 又は活性を測定する方法であって、少なくとも 1 つの上記抗体又は抗原結合性断片に試料を接触させること及び試料における上記接触工程の効果を評価することを含む方法を提供する。

40

【 0 0 3 4 】

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 9 6 / 3 3 7 3 5 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性断片を提供する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 5 】

一般的技術

50

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。

10

【0036】

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11、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結合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結合型ポリユビキチン、K11結合型ポリユビキチン、K27結合型ポリユビキチン、K29結合型ポリユビキチン、K33結合型ポリユビキチン、K48結合型ポリユビキチン及びK63結合型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。

20

【0037】

本明細書において使用する「K*-結合型ポリユビキチン」及び「Lys*結合型ポリユビキチン」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、「K63-結合型ポリユビキチン」は、「Lys63-結合型ポリユビキチン」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。

30

【0038】

本明細書において使用する、第1リジン結合が第2リジン結合と「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リジン結合が、1のユビキチン部分と別のユビキチン部分の間の第2リジン結合とは異なるリジン残基(例えば、K6、K11、K27、K29、K33、K48、及び/又はK63)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。

40

【0039】

「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%を超える抗体、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

50

、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。

【 0 0 4 0 】

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。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する「抗 K 4 8 -結合型ポリユビキチン抗体」とは、K 4 8 -結合型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。

10

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

【 0 0 4 2 】

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。

20

【 0 0 4 3 】

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。

【 0 0 4 4 】

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。

30

【 0 0 4 5 】

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)にて一晩コートして、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)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 を一晩インキュベートする; しかし、インキュベーションは確実に平衡状

40

50

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Tween 20を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μ l / ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 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Fab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(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)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってKd又はKd値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、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10mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 μ g / ml (~0.2 μ M)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 μ l / 分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25 、およそ25 μ l / 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(Kd)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。

【0046】

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10mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 μ g / ml (~0.2 μ M)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 μ l / 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1Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25 、およそ25 μ l / 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(Kd)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。

【0047】

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ド哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)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。

【0048】

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

10

20

30

40

50

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。

【0049】

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。

10

【0050】

「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。

【0051】

「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。

20

【0052】

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、

30

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。

【0053】

40

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。

【0054】

「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結合することができ、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

50

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。集散的に、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 F_v 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。

【0055】

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

10

【0056】

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()及びラムダ()と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0057】

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なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、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。

20

【0058】

「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。

【0059】

「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。

30

【0060】

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、

40

50

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（エピトープ）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、WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 255-258 (1993); Jakobovits等、Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann等、Year in Immunol. 7:33 (1993); 米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 同第5661016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。

【0061】

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4816567号; 及びMorrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

【0062】

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)。

【 0 0 6 3 】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「H V R」又は「H V」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; V Hに3つ(H 1、H 2、H 3)、V Lに3つ(L 1、L 2、L 3)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(C D R)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))。A b M高頻度可変領域は、カバットC D RとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのA b M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	A b M	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

【 0 0 6 4 】

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(L 1)、46 - 56又は50 - 56又は49 - 56(L 2)及び89 - 97又は89 - 96(L 3)と、V Hの26 - 35(H 1)、50 - 65又は49 - 65(H 2)及び93 - 102、94 - 102、又は95 - 102(H 3)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。

【 0 0 6 5 】

「フレームワーク」又は「F R」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F R又はH V R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F R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82 a、82 bおよび82 cなど)と、H 2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52 a)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。

【 0 0 6 6 】

「一本鎖F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、こ

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、 $s c F v$ ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それは $s c F v$ が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。 $s c F v$ 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。

【0067】

「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。

10

「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。

【0068】

「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、 V_H 及び V_L 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。

20

【0069】

「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。

30

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。

【0070】

「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。

40

「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。

【0071】

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

50

、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。

【 0 0 7 2 】

「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态を指す又は表わす。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。

10

【 0 0 7 3 】

「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。

【 0 0 7 4 】

「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・ル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。

20

30

【 0 0 7 5 】

「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髓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

40

50

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、肉芽種症及び血管炎；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。

【0076】

10

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、貪食殺菌機能障害、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。

【0077】

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。

20

【0078】

「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。

30

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。

【0079】

「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。

40

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、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド類(ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素、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

50

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。

【 0 0 8 0 】

「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ピ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(triethylenethiophosphoramid)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 - 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))； - 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(HYCAMTIN(登録商
 標)、C P T - 1 1 (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)；プリオスタチン；カリスタチ
 ン；C C - 1 0 6 5 (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
 、K W - 2 1 8 9 及びC B 1 - T M 1 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；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)
 、チョロホスファミド(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、ノベンピチン(nov
 embichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフ
 オスファミド(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
 1 I 及びカリケアマイシン I 1 (例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1
 994)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)
 、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(authr
 amycin)、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)ドキソルピシン(モルホリノ - ドキソルピシン
 、シアノモルホリノ - ドキソルピシン、2 - ピロリノ - ドキソルピシン及びデオキシドキソ
 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(marc
 ellomycin)、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(mycopheno
 lic 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)、
 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 - F U)；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)
 、トリメトトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabi
 ne)、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
 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)

10

20

30

40

50

、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)；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(frolinic acid)；アセグレートン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；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(diaziqune)；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)；テニユアゾン酸(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；ピンデシン(ELIDISINE(登録商標)、FILDESIN(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(「Ara-C」)；チオテパ；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, 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)ドキシタキセル(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(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボリン；ビノレルピン(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(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMF O)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタピン(capecitabine)(XELODA(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、CHOP(シクロホスファミド、ドキシロピシン、ピンクリスチン、及びブレドニゾロンの併用療法の略称)、及びFOLFOX(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(ELOXATINTM)を用いる治療形態の略称)

が含まれる。

【0081】

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(SERM)、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)、EVISTA(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)、LY117018、オナプリストーン(onapristone)、及びFARESTON(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(ERD)、卵巣を抑制又は停止させる機能を有する薬剤、例えば、LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)等の黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)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、ニルタミド及びピ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ARIMIDEX(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、BONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標)、DIDROCAL(登録商標)エチドロン酸、NE-58095、ZOMETA(登録商標)ゾレドロン酸/ゾレドロン酸、FOSAMAX(登録商標)アレンドロン酸、AREDIA(登録商標)パミドロン酸、SKELID(登録商標)チルドロン酸、又はACTONEL(登録商標)リセドロン酸、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(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PKC-、Ralf、H-Ras、及び上皮成長因子受容体(EGF-R)；THERATOPE(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Er b B-2及びEGFR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。

【0082】

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、K63結合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、異なるリジン結合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。驚くべきことに、本発明の抗体は、K63結合型ポリユビキチンについて、既知の抗体を超える改良された親和性を提供する。この改良された親和性は、免疫沈降反応のようなK63結合型ポリユビキチン化タンパク質に対する抗体のしっかりした結合性が必要条件である様々なアッセイにおける幅広い使用を可能にする。また、本発明の抗体は、以前に同定された抗K63結合型ポリユビキチン特異的抗体よりも治療としての使用によりよく適しており、これは、それらが同じK63結合型ポリユビキチンについてより小さい親和性を有する抗体よりも、低い投与量及び低頻度で投与される可能性を有するためである。

【0083】

一態様において、本発明は、配列番号60-110のうちの少なくとも一つの配列を有するHVR-H2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112の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。

【0084】

一態様において、本発明は、配列番号8-58のうちの少なくとも一つの配列を有するHVR-L2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111の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。

【0085】

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

- (i) 配列番号60-110の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-H2配列；
- (ii) 配列番号8-58の内の少なくとも一つの配列を含むHVR-L2配列。

【0086】

一態様では、本発明は、K63結合型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結合型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又は少なくとも2を含んでなる抗体を提供する：

- (i) 配列番号 60 - 110 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR - H2 配列 ;
 (ii) 配列番号 8 - 58 の内の少なくとも一つの配列を含む HVR - L2 配列。

【0087】

表 B に示すように、配列番号 8 - 112 のアミノ酸配列には個々の HVR (すなわち H2、L2) 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) ~ (ii) の内の 1 又は 2 を含み、配列番号 3 の HVR - L1、配列番号 4 の HVR - L3、配列番号 5 の HVR - H1、及び配列番号 6 の HVR - H3 の少なくとも 1 を含む。

一態様では、本発明は、表 B に示すように、重鎖 HVR H2 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、表 B に示す軽鎖 HVR L2 配列を更に含む。

【0088】

本発明の抗体の一部の実施形態は、下記の配列番号 224 に示すように、ヒト化 4D5 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 6407213 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。

Asp¹ Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (配列番号 224) (HVR 残基を下線で示す)。

【0089】

一実施形態において、huMAb4D5-8 軽鎖可変ドメイン配列は、位置 28、30、31、42、53、66 及び 91 - 96 の一つ以上 (それぞれ、上記に太字及び斜体で示された Asp、Asn、Thr、Lys、Phe、Arg、His、Tyr、Thr、Thr、Pro 及び Pro) 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 28 に Ser、位置 30 に Ser、位置 31 に Ser、位置 42 に Glu、位置 53 に Ser、位置 66 に Gly、位置 91 に Tyr、位置 92 に Ser、位置 93 に Ser、位置 94 に Tyr、位置 95 に Ser、位置 96 に Ser 及び / 又は位置 96 の Ser と位置 97 の Thr の間に Leu と Phe の挿入を含む。別の実施形態において、修飾された huMAb4D5-8 配列は、位置 1 の直前 (すなわちタンパク質の N 末端) に Ser の挿入、位置 28 に Ser、位置 30 に Ser、位置 31 に Ser、位置 42 に Glu、位置 53 に Ser、位置 66 に Gly、位置 91 に Tyr、位置 92 に Ser、位置 93 に Ser、位置 94 に Tyr、位置 95 に Ser、位置 96 に Ser 及び / 又は位置 96 の Ser と位置 97 の Thr の間に Leu と Phe の挿入を含む。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 225 に示される配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

Ser¹ Asp¹ Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (配列番号 225) (HVR 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。

【0090】

本発明の抗体の特定の実施態様は、以下の配列を有する重鎖可変ドメインを含む：

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser

Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser (配列番号 226) (HVR 残基を下線で示す)。

一実施態様では、重鎖可変ドメイン配列は、太字、斜字の位置で修飾されている。別の実施態様では、太字、斜字の Ser は Thr に変えられている。別の実施態様では配列番号 226 に示す重鎖可変ドメイン配列の最初の 3 残基が存在しない。

【0091】

別の実施態様では、本発明の抗体は、以下の配列を有する重鎖可変ドメインを含む：

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser
Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser (配列番号 227) (HVR 残基を下線で示す)。

10

【0092】

別の実施態様では、本発明の抗体は、以下の配列を有する重鎖可変ドメインを含む：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr
Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 (配列番号 228) (HVR 残基を下線で示す)。

20

【0093】

特定のリジン結合を含むポリコピ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 III 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 71、73 及び / 又は 78 に置換を含む。

30

これらの抗体の一部の実施形態において、位置 71 は A であり、73 は T であり、及び / 又は、78 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 6407213 号及び同第 5821337、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。一実施形態において、これらの抗体は、ヒト I 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、配列番号 3、4、8 - 58 及び 111 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) の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0094】

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 113 - 188、209 - 212、及び 217 - 220 の内の少なくとも一つを含み、HVR H1 配列は配列番号 5 であり、HVR H2 配列は配列番号 59 - 110 及び 112 から選択され、HVR H3 配列は配列番号 6 である。一実施形態にお

50

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 189 - 204、205 - 208 及び 213 - 216 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 3 であり、HVR - L2 配列は配列番号 8 - 58 の少なくとも一つから選択され、HVR - L3 配列は配列番号 4 である。

【0095】

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 113 - 188 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 5、60 及び 6 である（クローン Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 113 - 188 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - H1 は配列番号 5 であり、HVR - H2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - H3 は配列番号 6 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 189 - 204 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 3、8 及び 4 である（Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 189 - 204 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - L1 は配列番号 3 であり、HVR - L2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - L3 は配列番号 4 である。

【0096】

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 209 - 212 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 5、60 及び 6 である（クローン Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 209 - 212 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - H1 は配列番号 5 であり、HVR - H2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - H3 は配列番号 6 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 205 - 208 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 3、8 及び 4 である（Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 205 - 208 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - L1 は配列番号 3 であり、HVR - L2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - L3 は配列番号 4 である。

【0097】

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 217 - 220 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 5、60 及び 6 である（クローン Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 217 - 220 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - H1 は配列番号 5 であり、HVR - H2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - H3 は配列番号 6 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 213 - 216 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 3、8 及び 4 である（Apu3 . A8）。同様に、他の実施形態では、本願明細書の表 B に示すクローン Apu3 . A9 - H10 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 213 - 216 の少なくとも一つの配列を含み、HVR - L1 は配列番号 3 であり、HVR - L2 配列は表 B の各クローンについて特に列挙される配列であり、HVR - L3 は配列番号 4 である。

【0098】

別の例では、高い親和性でK 6 3 結合型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 結合型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 3、5 4 及び 5 6 に置換を含む。別の実施例では、高い親和性でK 6 3 結合型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 結合型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 2 アミノ酸位置 4 9、5 0、5 2 及び 5 3 に置換を含む。

【 0 0 9 9 】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 5、8 及び 6 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 3、6 0 及び 4 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 5、8 及び 6 の配列を含む重鎖可変ドメインと、更に、配列番号 3、6 0 及び 4 の配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 5、6 3 及び 6 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 3、1 1 及び 4 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 5、6 3 及び 6 の配列を含む重鎖可変ドメインと、更に、配列番号 3、1 1 及び 4 の配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 5、6 6 及び 6 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 3、1 4 及び 4 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 5、6 6 及び 6 の配列を含む重鎖可変ドメインと、更に、配列番号 3、1 4 及び 4 の配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

【 0 1 0 0 】

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。

本願明細書において示されるように、本発明の抗体は、K 6 3 リジン結合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結合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 2 及び 3 を参照）。

【 0 1 0 1 】

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。

【 0 1 0 2 】

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。

【 0 1 0 3 】

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. (20

10

20

30

40

50

04), 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。

【0104】

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。

【0105】

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IV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。

【0106】

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。

【0107】

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

10

20

30

40

50

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。

【0108】

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。

【0109】

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。

【0110】

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_H及びV_L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。

10

【0111】

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、ファージピ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。

20

【0112】

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、柔軟なペプチドスペ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。

30

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。

40

【0113】

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 $20 \sim 1,000$ 倍に濃縮することができる。更に、濃縮ファージを

50

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。

10

【0114】

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、過剰ピ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ピ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。

20

【0115】

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。

30

【0116】

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。

40

50

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)の種の変域ドメイン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。

10

【0117】

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、親和性成熟をモイネイ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作製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Vド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ド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。

20

30

【0118】

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 Antibodies: 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。

40

【0119】

一般的方法

総じて、本発明は、親和性成熟された抗K63結合型ポリユビキチン抗体を提供する。これらの抗体は、米国特許公開番号第US2007-0218069号(本願明細書において完全に引用したものとする)に記載されている抗体と比較して、K63結合型ポリユビキチンに対して親和性及び特異性を増大している。その刊行物において同定された最も良い抗K63結合型Fab(Apu2.16)は、約 100 nM の K_d 及びK48結合型ポリユビキチンに対する少量の人為的な結合性を有する。本願明細書において提供する改良されたFabと抗体はApu2.16の親和性成熟されたバージョンであり、最も良いバインダー(例えば、Fab Apu3.A8、Apu3.A12及びApu3.B3及

50

びそれらの抗体を参照)はK 6 3 結合型ポリユビキチンに対するA p u 2 . 1 6の親和性において1 0 倍を超える増大、及びK 4 8 結合型ポリユビキチンに対するごくわずかな結合性を有する。この親和性と感受性の増加によって、本発明の分子は、(a) 本発明の分子の中で増大した感受性及び / 又は (b) 本発明の分子によるK 6 3 結合型ポリユビキチンの厳密な結合及び / 又は (c) K 4 8 結合型ポリユビキチンと比較して、親の分子A p u 2 . 1 6と比較してK 6 3 結合型ポリユビキチンについての本発明の分子の増大した特異性によって、恩恵を受けられる適用と方法のために用いられることができる。

【 0 1 2 0 】

一実施態様では、本発明は、K 6 3 結合型ポリユビキチンが介在する疾患であって1又は複数のK 6 3 結合型ポリユビキチン活性の部分的又は全体的遮断が要求される疾患の治療に役立つ抗K 6 3 結合型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K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、癌を治療するために用いられる。別の実施態様では、本願明細書において提供される抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、例えば上記の筋疾患を治療するために用いられる。別の実施態様では、本願明細書において提供される抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、例えば上記の神経疾患を治療するために用いられる。別の実施態様では、本願明細書において提供される抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、遺伝病を治療するために用いられる。別の実施態様では、本願明細書において提供される抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、免疫性 / 炎症性疾患を治療するために用いられる。

【 0 1 2 1 】

本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体のユニークな特性は、扱いにくい高価な遺伝子操作または生物物理学的な方法(例えば質量分析)を用いずに、それらを特に細胞機構のポリユビキチンの異なるリジン結合型形態の間で区別することに役立つ。本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、インビトロ及びインビボの両方でK 6 3 結合型ポリユビキチンの機能と活性を特徴づけるために用いることができる。例えば、本願明細書において示されるように、R I P 及びI R A K 1は、それぞれT N F またはI L - 1 刺激によって、K 4 8 結合型又はK 6 3 結合型ポリユビキチンを有する代替物タギングによって機能と活性において調整される。本発明のK 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、K 6 3 ユビキチンバージョンのR I P 及び / 又はI R A K を、直接に及び免疫沈降、E L I S A または免疫顕微鏡法のようなルーチンの生体分子アッセイで、質量分析または遺伝子操作を必要とせず、感度が高く特異的な検出ができるようにする。次に、これは、これらの経路の中で正常に機能しているものを観察し解明すること及び経路が異常に機能している場合を検出することの両方に相当な利点を提供する。

【 0 1 2 2 】

本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、また、疾患の発現と病因における特異的なリジン結合型ポリユビキチンの役割を決定するために用いることができる。上記の通り、例えば本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチンは、R I P 又はI R A K 1が異常にK 6 3 ユビキチン化されているかどうかを測定するために使用することができ、それは次に、1又は複数の疾病状態と関連している可能性があるT N F またはI L - 1 シグナル伝達の正常又は異常な機能について情報を提供する。

【 0 1 2 3 】

本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、更に1又は複数のK 6 3 結合型ポリユビキチンが異常に調整されるか又は異常に機能している疾患を、本発明の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を妨げずに、治療するために用いることができる。

別の態様では、本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、K 6 3 結合型ポリユビキチンの細胞集団内及び所与の細胞内の密度と分布の測定、及びK 6 3 結合型ポリユビキチンの存在又は量に基づく細胞選別を含むさまざまな細胞型と組織におけるK 6 3 結合型ポリユビキチンの検出のようなK 6 3 結合型ポリユビキチンの検出と隔離のための試薬として有用性を見い出される。本発明の抗体は、特にさまざまな鎖長の単離されたK 6 3 結

合型ポリユビキチンだけでなく、K 6 3 結合型ポリユビキチンによってポリユビキチン化されたタンパク質にも結合することが可能であり、したがって、遊離型（すなわち異種タンパク質にコンジュゲートしていない）又はK 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質（すなわち、異種タンパク質にコンジュゲートされている）および／または両方の検出と結合性は本願明細書において考察される。

さらに他の態様では、本抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、本発明の対象抗体のそれらに類似した遮断活性パターンを有するポリユビキチン・アンタゴニストの発現に役立つ。例えば、本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、同じK 6 3 結合型ポリユビキチン結合特性および／またはK 6 3 結合型ポリユビキチンによって介在される経路を遮断する能力を有する他の抗体を決定し同定するために用いることができる。

10

さらなる例として、本発明の抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、直鎖状及び立体配置のエピトープを含む本願明細書において例証した抗体と実質的に同じK 6 3 結合型ポリユビキチンの抗原決定基を結合する他の抗ポリユビキチン抗体を同定するために用いることができる。

【0124】

本発明の抗ポリユビキチン抗体は、抗体がするように、K 6 3 結合型ポリユビキチンに対する1又は複数の結合パートナーの結合性を遮断することと類似した薬理効果を呈するK 6 3 結合型ポリユビキチンの小分子アンタゴニストを検査するためにK 6 3 結合型ポリユビキチンが関与する生理学的経路に基づくアッセイにおいて用いることができる。例えば、K 6 3 結合型ポリユビキチンはDNA修復に関係していることが知られており（例えばPickart and Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004)を参照）、したがって、DNA修復経路に対抗する抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体の活性はその同じDNA修復経路のK 6 3 結合型ポリユビキチンの1又は複数の潜在的な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、別の例では、K 6 3 結合型ポリユビキチンはパーキンソン病のレヴィー小体の形成に関係していることが知られており（例えばLim et al., J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)参照）、したがって、レヴィー小体の形成を中和する抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体の活性は、レヴィー小体の形成を中和における、K 6 3 結合型ポリユビキチンの1又は複数の潜在的な小分子アンタゴニストの活性と比較されることができる。

20

【0125】

抗体の生成は、本願明細書において記載されているものを含む当該分野の通常の技術、例えばハイブリドーマ技術、バインダー分子のファージ・ディスプレイ・ライブラリーのスクリーニングを使用して行うことができる。これらの方法は、従来技術において確立されている。

30

【0126】

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

40

50

たい。

【0127】

一実施態様では、本発明の抗ポリリ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リビキチン抗体の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。

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。

本発明の抗ポリリ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)。

【0128】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

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。

【0129】

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。

【0130】

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。pB

R 3 2 2、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 p B R 3 2 2 誘導体の例はCarter等の米国特許第 5 6 4 8 2 3 7 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、G E M . T M . - 1 1 のようなバクテリオファージを、大腸菌 L E 3 9 2 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。

【 0 1 3 1 】

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 D N A からプロモーターを除去し、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 D N A 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。

【 0 1 3 2 】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、P h o A プロモーター、ガラクトマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(t r p)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c 又は t r c 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 D N A 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、I p p あるいは熱安定性エンテロトキシン I I (S T I I) リーダー、L a m B、P h o E、P e l B、O m p A 及び M B P 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 S T I I シグナル配列又はその変異体である。

【 0 1 3 3 】

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 t r x

10

20

30

40

50

B⁻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。

【0134】

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。

【0135】

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。

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 marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施形態では、グラム陰性菌が使用される。一実施形態では、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 *fhuA* (*tonA*) *ptr3* *lacIq* *lacL8* *ompT* (*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。

【 0 1 3 6 】

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。

10

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。

【 0 1 3 7 】

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させられうる。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。

20

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。

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 P h o A 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。

30

【 0 1 3 8 】

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。

40

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

50

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。

【0139】

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。

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 (2000) 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。

【0140】

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III、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI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5264365号; Georgiou等, 米国特許第5508192号; Hara等(1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

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。

【0141】

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。

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41kD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。

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。

【0142】

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。

【0143】

(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いてもよい。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。

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。

【0144】

(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。

【0145】

(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。

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。

【0146】

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、まず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキセート(Mtx)を含む培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。

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。

【0147】

(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 A A T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A A T A A A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。

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インターフェロンc DNA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。

【0148】

(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。

【0149】

(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。

【0150】

(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(

10

20

30

40

50

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(Hep G2, 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(Hep G2)である。

10

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。

【0151】

(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)、パッファー(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。

20

30

【0152】

(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。

40

【0153】

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 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に

50

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 3 に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 1657-1575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C_H3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABX^{T M} 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 SEPHAROSE^{T M} 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。

10

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 0.025 M 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。

【0154】

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。

20

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ソ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。

30

【0155】

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FcR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、FcRIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はFcRI、FcRII及びFcRIII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

40

50

:163 (1996)に記載のように、C D C アッセイを行ってもよい。また、F c R n 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。

【 0 1 5 6 】

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、F a b、F v 及びS c F v 抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模産生が容易となる。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、F a b'-S H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 (a b')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 (a b')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F a b及びF (a b')₂断片は米国特許第5 8 6 9 0 4 6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F v断片(s c F V)である。国際公開93/16185; 米国特許第5 5 7 1 8 9 4号; 及び米国特許第5 5 8 7 4 5 8号を参照のこと。F v及びs F v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。s F v融合タンパク質は、s F v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5 6 4 1 8 7 0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。

【 0 1 5 7 】

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4 8 1 6 5 6 7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F R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。

【 0 1 5 8 】

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. N*

atl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta等(1993)J. Immunol., 151:2623)。

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。

【0159】

ヒト抗体

本発明のヒト抗ポリリグニン抗体は、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抗ポリリグニン抗体は、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。

【0160】

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。

【0161】

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結合を含むポリリ

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つの異なるリジン結合を含む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 $F(a b')_2$ 二重特異性抗体)として調製することができる。

【0162】

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、 C_H2 及び C_H3 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(C_H1)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。

【0163】

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。

【0164】

二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 $F(a b')_2$ 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 $F a b'$ 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。 $F a b'$ -TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $F a b'$ -チオールに再転換し、他の $F a b'$ -TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

10

【0165】

最近の進歩により大腸菌から $F a b'$ -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に形成する。Shalaby 等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) は、完全なヒト化二重特異性抗体 $F(a b')_2$ 分子の産生について記述している。各々の $F a b'$ 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。

【0166】

20

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。Kostelnýら, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $F a b'$ 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

30

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。

【0167】

多価抗体

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

40

50

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。

【 0 1 6 8 】

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。

【 0 1 6 9 】

アミノ酸配列挿入は、1 残基から 1 0 0 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 A D E P T)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、F R 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。

【 0 1 7 0 】

表 A

10

20

30

40

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

10

20

30

【 0 1 7 1 】

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))

40

(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 ;

50

(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。

【0172】

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II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、系統的変異導入法(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。

【0173】

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。

【0174】

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は含まれる(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。

【0175】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツ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IgG1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ゲット(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(MMAE)、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。

【 0 1 7 6 】

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・アメリカーナ(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 9 3 / 2 1 2 3 2 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、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y 及び ¹⁸⁶Re 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(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン等)、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 9 4 / 1 1 0 2 6 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CC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【 0 1 7 7 】

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 3 8 9 6 1 1 1 号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第 4 1 5 1 0 4 2 号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第 4 1 3 7 2 3 0 号; 同 4 2 4 8 8 7 0 号; 同 4 2 5 6 7 4 6 号; 同 4 2 6 0 6 0 8 号; 同 4 2 6 5 8 1 4 号; 同 4 2 9 4 7 5 7 号; 同 4 3 0 7 0 1 6 号; 同 4 3 0 8 2 6 8 号; 同 4 3 0 8 2 6 9 号; 同 4 3 0 9 4 2 8 号; 同 4 3 1 3 9 4 6 号; 同 4 3 1 5 9 2 9 号; 同 4 3 1 7 8 2 1 号; 同 4 3 2 2 3 4 8 号; 同 4 3 3 1 5 9 8 号; 同 4 3 6 1 6 5 0 号; 同 4 3 6 4 8 6 6 号; 同 4 4 2 4 2 1 9 号; 同 4 4 5 0 2 5 4 号; 同 4 3 6 2 6 6 3 号; 及び同 4 3 7 1 5 3 3 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。

【0178】

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。

【0179】

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日出願の米国特許出願番号10/960,602(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。

【0180】

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。

【0181】

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日に出願の米国公開特許第10/983340号に開示される。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。

【0182】

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 (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に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)。

【0183】

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

10

20

30

40

50

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、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N-アセチル- 1^I 、PSAG及び 1^I (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。

10

【0184】

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断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、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(*Saponaia*)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。

20

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。

30

【0185】

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 t^{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。

40

放射又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば t^{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。

【0186】

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

50

例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、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

10

アトペンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(M X-D T P A)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)。

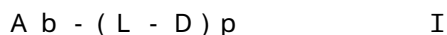
20

【0187】

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(A D C)において、抗体(A b)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A D C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A b-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。A D C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(「M C」)、マレイミドプロパノイル(「M P」)、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(「P A B」)、N-スクシンイミジル4(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「S P P」)、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(「S M C C」)、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(「S I A B」)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

【0188】

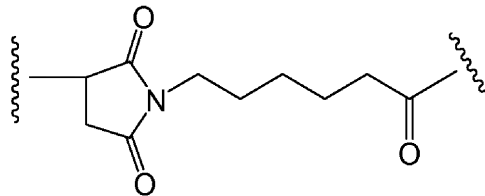
いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー

50

成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C 及び D 又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

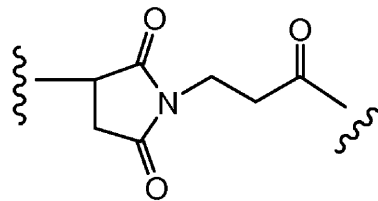
【 0 1 8 9 】

例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線は A D C の他の構成成分への共有結合の部位を示す)：



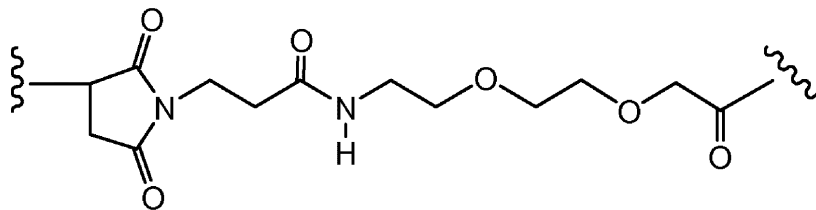
MC

10



MP

20

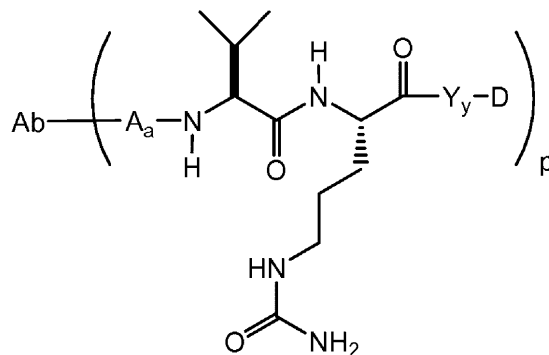


MPEG

30

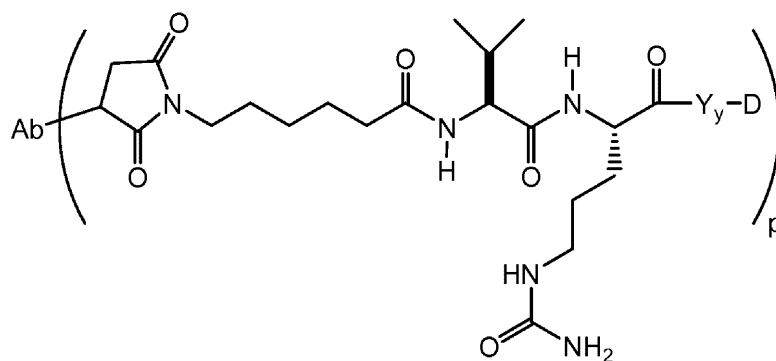
【 0 1 9 0 】

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(A b)及びリンカーが示されており、p は 1 ~ 約 8 である)：



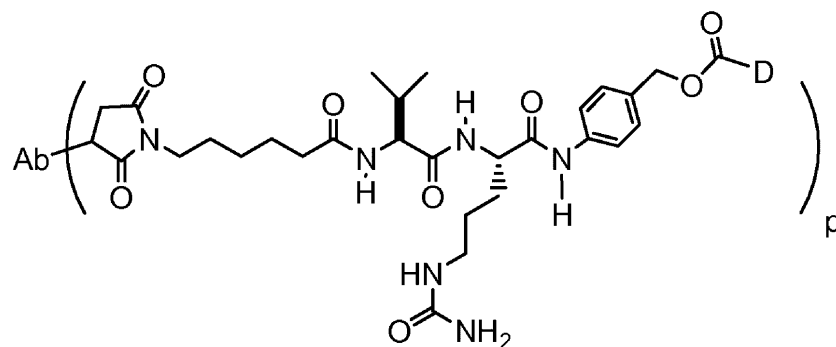
Val-cit

40



MC-val-cit

10



MC-val-cit-PAB

20

【 0 1 9 1 】

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NHSE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

【 0 1 9 2 】

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。

【 0 1 9 3 】

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アルヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えば N H S エステル、H O B t 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。

10

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。

【 0 1 9 4 】

20

抗体(A b)-M C-M M A E 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、p H 8 . 0 の5 0 0 m M ホウ酸ナトリウムと5 0 0 m M 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の1 0 0 m M ジチオトレイトール(D T T)で処理した。3 7 °C で3 0 分インキュベートした後、S e p h a d e x G 2 5 樹脂で溶出することによって、バッファーを交換して、1 m M D T P A を含むP B S にて溶出した。溶液の2 8 0 n m の吸光度とD T N B (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて4 1 2 n m 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/A b 値を調べる。P B S 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タチンE(M M A E)、すなわちM C-M M A E をD M S O 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2 H 9 を含むP B S 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、2 H 9-M C-M M A E を精製して、P B S のG 2 5 樹脂による溶出によって、脱塩して、無菌条件下で0 . 2 m m のフィルターに濾過して、保存のために凍結した。

30

【 0 1 9 5 】

抗体-M C-M M A F は、A b-M C-M M A E の調製のためのプロトコールによるM C-M M A F 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-M C-v a l-c i t-P A B-M M A E は、A b-M C-M M A E の調製のためのプロトコールによるM C-v a l-c i t-P A B-M M A E 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。

40

抗体-M C-v a l-c i t-P A B-M M A F は、A b-M C-M M A E の調製のためのプロトコールによるM C-v a l-c i t-P A B-M M A F 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-S M C C-D M 1 は、以下のS M C C-D M 1 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(S M C C、Pierce Biotechnology, Inc)で誘導体化して、S M C C リンカーを導入する。具体的には、5 0 m M リン酸カリウム/5 0 m M 塩化ナトリウム/2 m M E D T A、p H 6 . 5 中で、7

50

．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。

【0196】

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1xPBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5x4.9cm)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。

【0197】

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、17mmol)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(5.0cmx90.0cm、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)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。

【0198】

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。

10

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 1605 (2005))。照射はどのような波長のものでよく、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。

20

【0199】

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 Pharmaceutical 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ipient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；EDTA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。

30

40

【0200】

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。

【0201】

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。

【0202】

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。

【0203】

一態様では、本発明の阻止抗体は、K63リジン結合を有するポリユビキチンに特異的であり、K63結合型ポリユビキチンとK63結合型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K63結合型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。別の実施態様では、本発明の阻止抗体は、K63結合型ポリユビキチンとコンジュゲートされた1又は複数のタンパク質と相互作用するK63リジン結合を有するポリユビキチンに特異的であり、それによってタンパク質のシグナル伝達経路との相互作用及びその他関連分子又は細胞イベントとの干渉を阻害する

10

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本発明の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、K63結合型ポリユビキチンに関連する1又は複数のタンパク質をその表面に発現する細胞に内在化されており、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(例えばメイタンシノイド、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。

【0204】

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。

20

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。

30

【0205】

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性断片が提供される。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性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

40

50

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. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照されたい。

【0206】

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性断片を提供する。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性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ネルに基づく方法が含まれる。

【0207】

血液脳関門に抗体又は抗原結合性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性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。

血液脳関門に抗体又は抗原結合性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性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）、及び低密度リボプロテイン粒子（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性断片をコーティングすることが含まれる。

【0208】

血液脳関門に抗体又は抗原結合性断片を搬送するレセプター及びチャネルに基づく方法には、限定するものではないが、グリコシルチ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2003/0162695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。

10

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。

20

【0209】

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。

30

【0210】

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(

40

50

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みうる。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(B W F 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。

【0211】

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。

【図面の簡単な説明】

【0212】

【図1】ユビキチンの一次構造及び特定のポリユビキチン・イソペプチド結合の概略図を示す。図1Aは、ヒトユビキチンのアミノ酸配列を示す(配列番号223)。リジン残基は太字、下線を施されたテキストである。図1Bは、第1ユビキチン分子のリジン48又はリジン63と第2ユビキチン分子のC末端のグリシン残基との間に形成される結合の模式的な描写を示す。

【図2】図2A-Eは、実施例4で議論する、適切な分子の結晶構造を表す。図2Aは、K63結合型ジユビキチン(図の上部)とApu2.16 Fab断片(図の下部、左側に軽鎖及び右側に重鎖)との間の複合体を表し、重鎖CDR3(「H3」)は、イソペプチド結合の両側において、両方のユビキチン鎖に接触していることを示す。ジユビキチンの4.2内のH3側鎖及びH3の4.2内のユビキチン側鎖を、スティックとして示す。太字で名前をつけた残基はユビキチン残基であり、他(太字でないもの)で名前をつけた残基はFab残基である。受容体ユビキチンにおけるK63は球体で示される。図2Bは、K63結合型(上)及びK48結合型(下)ジユビキチン構造の比較を表す。いずれの場合も、リジン受容体ユビキチンは図の左にあり、供与体ユビキチンは図の右にある。鎖がより長い様式で伸長するK63ダイマーと比較して、K48結合型ジユビキチンは、ユビキチンダイマーに対して垂直に伸長する鎖を有する、よりコンパクト形状を形成する。図2Cは、Apu3.A8の結晶構造に重ね合わせられている図2Aに示されるApu2.16結晶構造の重ね合せであり、Apu3.A8を作成するための親和性成熟過程の間に、L2(S52R)及びH3(S52T)に導入される2つの変異の位置を示す。図2Dは、ヒト化4D5(pdb 1FVE)の変異体及びApu2.16、Apu3.A8の構造の比較を示す。Apu2.16及びApu3.A8のFv領域はチューブとして示されおり、ヒト化抗Her2抗体4D5変異体のFv領域の上に重ね合わせられている。上図において、CDR領域が名前を付けられており;下図では、Fv領域は、N末端を示すために90°回転されている。図2Eは、Apu3.A8(下)とジユビキチン(上)との間の荷電相補性を表す。表面静電はPyMolによって算出された。陽電位の領域には陰影がついている;陰電位を有する領域には、陰影がついており、且つ点線によって示されている。

【図3】図3A-Dは、実施例1(E)に記載されているウエスタンブロッティング実験の結果を表す。図3Aは、親の抗K63結合型ポリユビキチン Fab Apu2.16の、固定されたK63結合型ジユビキチンに対する結合性及び固定されたK48結合型ジユビキチンへの結合性の欠如を示す。図3Bは、抗K63結合型ポリユビキチン Fab Apu3.A8の、固定されたK63結合型ジユビキチンに対する結合性及び固定されたK48結合型ジユビキチンへの結合性の欠如を示す。図3Cは、抗K63結合型ポリユビキチン Fab Apu3.A12の、固定されたK63結合型ジユビキチンに対する結合性及び固定されたK48結合型ジユビキチンへの結合性の欠如を示す。図3Dは、抗K63結合型ポリユビキチン Fab Apu3.B3の、固定されたK63結合型ジユビキチンに対する結合性及び固定されたK48結合型ジユビキチンへの結合性の欠如を示す。

【図4】図4は、実施例2に記載されているウエスタンブロッティング実験の結果を表す。図は、親のApu2.16 IgGの、固定されたK63結合型ジ-からヘプタユビキチン又は固定されたK48結合型ジ-からヘプタユビキチンの何れかへの弱い結合を示す。図は、更に、親和性成熟された抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu3.A12、Apu3.B3、及びApu3.A8の何れかの、固定されたK63結合型ジ-からヘプタユビキチンへの結合性及びK48結合型ジ-からヘプタユビキチンへの結合性の欠如を示す。

【図5】図5は、実施例2に記載されているウエスタンブロッティング実験の結果を表す。図は、親の抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu2.16はK63結合型ユビキチンTraf6を検出することができないが、親和性成熟された抗体Apu3.A12、Apu3.B3及びApu3.A8は、特にウエスタンブロット形式でK63結合型ユビキチン化Traf6を検出できることを示す。

10

【図6】図6A-Bは、実施例2に説明したように、K63結合型Traf6を細胞ライセートから免疫沈降させるための、さまざまな抗K63結合型ポリユビキチン抗体の能力を評価するための、ウエスタンブロッティング実験の結果を表す。親和性成熟された抗体Apu3.A8、Apu3.B3及びApu3.A12は、親抗体Apu2.16よりも、K63結合型ポリユビキチンTraf6を免疫沈降させることがよりよくできた。

【図7】図7A-Kは、実施例3に説明したように、確認的質量分析実験の結果を表す。図7Aは、親和性成熟された抗体Apu3.A8、Apu3.B3及びApu3.A12によって免疫沈降するタンパク質が、実施例2にて説明したように、主にK63結合型ユビキチン化されていることを確認する質量分析実験の結果を表す。図7Bは、K48結合は、このアプローチを使用しても濃縮されなかったため、K63鎖結合に対するK63抗体の特異性を示す。図7C-Fは、抗K48結合型ポリユビキチン抗体Apu2.07、抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu3.A8又はアイソタイプコントロール抗体（抗Her2）を使用した免疫沈降実験に続く免疫沈降したユビキチンの総量（図7C）、並びに溶菌液に存在するポリユビキチン結合の種類（図7D）及び抗体特異的な免疫沈降物（図7Eでは抗K48結合型ポリユビキチン；図7Fでは抗K63結合型ポリユビキチン）を測定するための質量分光分析から得られたデータの棒グラフを示す。図7Gは、WT、K48RまたはK63Rユビキチンによるインビトロで実施されるMuRF1自己ユビキチン化反応、続いてApu2.07、Apu3.A8またはアイソタイプ合致型コントロール抗体による免疫沈降を模式的に表す。カッコ内の数は、図7H-Kの関連するレーンとカラムを示す。図7Hは、図7Gにおいて模式的に示す反応を含むウエスタンブロットを示す。プロットは汎ユビキチン抗体によってプローブされた。横点線は、切り出されて、質量分析による解析にかけられたゲルの部分を示す。図7I-Kは、自己ユビキチン化反応のポリユビキチン結合を決定する実験及び図7Gにおいて模式的に示した免疫沈降から得られた質量分析データの棒グラフを示す。

20

30

【図8】図8Aは、インビボで腫瘍壊死因子受容体1（TNFR1）と結合している腫瘍壊死因子アルファ（TNF）によって刺激されるシグナル伝達経路を模式的に表す。図8Bは、インビボでIL-1R1に結合するIL-1によって刺激されるシグナル伝達経路を模式的に表す。

40

【図9】図9Aは、実施例3に説明したように、RIPのユビキチン化状態を検出するための免疫沈降実験のウエスタンブロットを示す。この図を説明する目的のために、プロットに連続する番号1から7を割り当て、一番上のプロットには番号1を割り当て、最下部のプロットについては番号7を割り当てる。プロット6は、K48結合型ポリユビキチン化されたタンパク質を捕獲するために、抗K48結合型IgGによって免疫沈降した試料を含む。プロット7は、K63結合型ポリユビキチン化されたタンパク質を捕獲するために、Apu3.A8とApu3.B3の1:1混液によって免疫沈降した試料を含む。両プロットは、抗RIP抗体で着色された。プロット1-3は、RIPとチューブリンのレベルはTNF処理の間、比較的一定のままであるが（プロット1と3）、IBレベルはTNF処理に応じて減少すること（プロット2）を証明するためのコントロール

50

ウエスタンブロットを示す。プロット4と5は、RIPが、TNFR1のための免疫沈降の間、共沈澱すること(プロット4)及びTNFR1のレベルはTNF 処理の間、一定のままであること(プロット5)を証明するためのコントロールウエスタンブロットを示す。図9Bは、K63結合型ポリユビキチンがRIPに加えられて、A20によってK48結合型ポリユビキチンと交換される細胞経路を模式的に表す。

【図10】図10は、細胞のIL-1 刺激後、IRAK1のポリユビキチン化状態を評価する実施例3(B)に記載されている実験の結果を示す。トータルIRAK1、IB及びチューブリンレベルは、図10A及び10Bに示す。図10Cは、K48結合型ポリユビキチン(上パネル)またはK63結合型ポリユビキチン(下パネル)によって修飾されたIRAK1を評価するウエスタンブロットを示す。図10Dは、ポリユビキチン化されたIRAK1の分解におけるプロテアーゼインヒビターMG-132の効果を示すウエスタンブロットを示す。

10

【図11】図11は、実施例5に説明したように、抗K48結合型ポリユビキチン抗体または抗K63結合型ポリユビキチン抗体のみ(それぞれ図11A又は図11D)、または20Sプロテアソーム・サブユニットを認識するポリクローナル抗体を更に含むもの(それぞれ図11B又は図11E)により染色されたHeLa細胞の免疫蛍光法鏡検イメージを表す。矢は、中央体染色を示す。統合した画像(図11C及び図11F)において、非常に明るい染色は潜在的な共局所化を示し、より明るくない染色はDAPI標識の核に対応する。各図の棒は、50µmを表す。

【図12】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12Aおよび12B): 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113-116)。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117-128)。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129-132)。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133-144)。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145-148)。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149-160)。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161-164)。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165-172)。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173-176)。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177-188)。

20

30

【図13】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13): ヒトVL サブグループIコンセンサスフレームワーク(配列番号189-192)。ヒトVL サブグループIIコンセンサスフレームワーク(配列番号193-196)。ヒトVL サブグループIIIコンセンサスフレームワーク(配列番号197-200)。ヒトVL サブグループIVコンセンサスフレームワーク(配列番号201-204)。

40

【図14】hUMA b4D5-8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15】hUMA b4D5-8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。

【実施例】

【0213】

実施例1: K63結合型ジユビキチン特異的抗体断片の親和性成熟

K48結合型ポリユビキチンとK63結合型ポリユビキチンとを区別することが可能な抗体のパネルは、米国特許公開番号US2007-0218069に記載されており、本

50

願明細書において完全に引用したものとする。その刊行物において同定された最高の抗 K 6 3 結合型 F a b の親和性及び特異性 (A p u 2 . 1 6、約 1 0 0 n M の K d 及び K 4 8 結合型ポリユビキチンに対する少量の人工的な結合) は、その刊行物において同定された最高の抗 - K 4 8 結合型 F a b の親和性と特異性 (A p u 2 . 0 7、約 1 n M の K d、K 6 3 結合型ポリユビキチンに対する結合は観察されない) より劣っていた。改良された K 6 3 結合型ポリユビキチン特異的 F a b / 抗体は、F a b / 抗体のより優れた特異性または親和性が望まれる適用を促進することが求められた。

(A) ライブラリー作成

A p u 2 . 1 6 抗 K 6 3 結合型ジユビキチン抗体断片 (F a b) は、抗体を親和性成熟するために、突然変異生成に供した。A p u 2 . 1 6 と K 6 3 結合型ジユビキチンの共結晶構造に示すように (図 2 及び本願明細書に完全に組み込まれる米国特許公開番号 U S 2 0 0 7 - 0 2 1 8 0 6 9 を参照)、C D R L 2 の残基 4 9、5 0、5 2 及び 5 3、及び C D R H 2 の残基 5 0、5 2、5 3、5 4 及び 5 6 は、K 6 3 結合型ジユビキチンと、それらの接触に基づいて、突然変異生成のために選択された。C D R L 2 の位置 5 1 と C D R H 2 の 5 2 a に T A A 終止コドンをもつ A p u 2 . 1 6 停止テンプレートは、両方の C D R 領域の突然変異生成を押し進めるために用いた。この構造物の発現は、細菌性アルカリホスファターゼ (P h o A) プロモータの制御下にあった。軽鎖と重鎖は、大腸菌において分泌ができるようにするために、アミノ末端基細菌性 s t I I シグナル配列を含んでいた。重鎖カルボキシル末端は、M 1 3 バクテリオファージの遺伝子産物 I I I が続くアンバー終止コードにインフレームで融合し、アンバーサプレッサ大腸菌菌株において発現される場合にファージ上に一価の F a b 提示を可能にする。時間の 5 0 % は A p u 2 . 1 6 野生型残基が保持され、時間の 5 0 % は残りの 1 9 アミノ酸の一つがコードされるように、変性オリゴヌクレオチドは接触の位置をソフトランダム化するために合成された。ソフトランダム化を達成するために、特定のヌクレオチド位置が、時間の 7 0 % は、表示の塩基により占められており、時間の 1 0 % は、3 分の 1 の他の塩基によって占められるようにオリゴヌクレオチドは設計された (Gallop et al., J. Med. Chem. 37: 12 33 (1994))。このようなソフトランダム化が特定塩基が含まれる場所では、ソフトランダム化の存在は、その塩基位置における数の存在により示される。数「5」は、塩基アデニンがその位置で時間の 7 0 % 存在することを示し、その一方で、塩基グアニン、シトシン及びチミンはそれぞれ時間の 1 0 % で存在した。同様に、数「6」はグアニンを、「7」はシトシンを、及び「8」はチミンを指し、ここで、いずれの場合においても、各々のその他 3 つの塩基は時間の 1 0 % だけ存在した。

突然変異誘発性オリゴヌクレオチド 3 1 0 8 8 7

(C C G A A G C T T C T G A T T 8 5 7 8 7 6 G C A 8 7 7 5 6 7 C T C T A C T C T G G A G T C) (配列番号 1) 及び

3 1 0 8 9 0

(G G C C T G G A A T G G G T T G C A 8 5 8 A T T 8 7 8 C C T 8 5 8 8 5 8 G G C 8 7 8 A C T T C T T A T G C C G A T A G C) (配列番号 2) は、K u n k e l 突然変異生成反応において、4 0 μ g の A p u 2 . 1 6 停止テンプレートの K u n k e l D N A を使用した (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985) and Sidhu et al., Meth. Enzymol. 328: 333 (2000) を参照)。突然変異生成反応は、エレクトロテン・ブルー大腸菌 (ストラタジーン) にエレクトロポレーションして、2 5 m l の S O C 培地において 3 7 ° で 4 5 分間振盪して回復した。2 0 μ l を取り出して、1 0 倍の連続希釈物をカルベニシリン含有の固体寒天プレート上に塗布されて、ライブラリーサイズを決定するために 3 7 ° で一晩培養した。残りの培養は、5 0 μ g / m l のカルベニシリン、5 0 μ g / m l のカナマイシン及び 1 0⁻¹⁰ ファージ / m l M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージ (ニューイングランド・バイオラボ) を含有する 5 0 0 m l の 2 Y T プロスへ移された。培養は、3 0 ° で 1 4 時間振盪培養した。ライブラリーは、約 3 \times 1 0⁻¹⁰ の C F U を含んでいた。ファージは、1 / 5 量の 2 0 % のポリエチレングリコール (P E G) / 2 . 5 M の N a C l により 2 ラウンドの沈殿によって、培養液上清から精製された。

【 0 2 1 4 】

(B) ライブラリー選別

増幅されたファージは、96ウェルのマキシソープ・イムノプレート (Maxisorb immunoplates) (Nunc) に固定された酵素的に合成されたK63結合型ジユビキチン (Boston Biochem) に対する選別において使われた。プレートは、5 μ g / ml のK63結合型ジユビキチンの50 mMの炭酸ナトリウム・バッファー (pH 9.6) 溶液で、4 で一晩被覆された。被覆プレートは、2.5% ミルクの0.05% Tween-20 (PBST) 含有PBS溶液によって、25 で1時間ブロックされた。ファージは、2.5%のミルク / PBSTにOD 268の5に希釈されて、1時間の氷上でインキュベートされた。ブロッキング後、プレートは、PBSTで5回洗われた。100 μ l / ウェルのファージを加えて、25 で1時間振盪しながらインキュベートした。結合後、プレートは、PBSTで10回洗われた。ファージは、100 μ l / ウェルの100 mMのHClによって、25 で20分間振盪し、溶出した。溶出液は、1 / 10量の1 Mのトリス (pH 11.0) によって中和され、続いてM13 K07ヘルパーファージの付加によってXL-1ブルー大腸菌 (ストラタジーン) において増殖させた。

10

増殖したファージが、選別の次のラウンドにおいて使われた。第2の選別は、100 nMのビオチン化K63結合型ジユビキチンを溶液中の標的として使用し、ファージがOD₂₆₈で1.0で使われたことを除いては、上記の通りに行われた。ビオチン化K63結合型ジユビキチンは、結合したファージと共に、5 μ g / mLのニュートラアビジン被覆されたイムノプレートに捕獲された。第3の選別ラウンドは、ファージ・ブロッキング工程とファージ・結合工程の競争相手として、可溶性100 nMのK48結合型ジユビキチン及び100 nMのモノユビキチン (Boston Biochem) を加えて、第2ラウンドと同様に実施された。第4の選別ラウンドにおいて、ビオチン化K63結合型ジユビキチン標的濃度は10 nMまで減少させ、K48結合型ジユビキチンとモノユビキチンの競争相手濃度は各々1 μ Mに増大させた。ニュートラアビジン単独と比較したビオチン化K63結合型ジユビキチンに対する結合性のための濃縮は、ラウンド3と4の後に、観察された。第4選別由来の96個体のクローンは、96ウェル様式で、50 μ g / mLのカルベニシリンと10¹⁰ ファージ / mLのM13 K07ヘルパーファージを含有する1 mLの2YTブロスにおいて増殖させた。それらの培養からの上清は、K63結合型ジユビキチン、K48結合型ジユビキチン、モノユビキチン、又はプレートの非被覆ウェルへの結合性について、ハイスループット・ファージELISAにおいて使われた。51クローンについてK63結合型ジユビキチンへの特異的な結合性が証明され、それらのDNAは標準的方法を使用して配列決定された。各クローンのCDR_{L2}及びH2の配列は、表Bに示される。CDR_{L1}、L3、H1及びH3は配列決定されなかったが、それらは突然変異生成の標的とされなかったので、突然変異生成のために標的とされなかったApu2.16テンプレートCDR_{L1}配列 (RASQSVSSAVA) (配列番号3)、CDR_{L3}配列 (QQYSSYSLSLFT) (配列番号4)、CDR_{H1}配列 (VKTG LI) (配列番号5)、及びCDR_{H3}配列 (EY YRWYTAI) (配列番号6) を有すると期待される。

20

30

クロールン HVR L2 配列 HVR H2 配列 配列番号 配列番号

クローン	HVR L2 配列										HVR H2 配列										電 号						
	49	50	51	52	53	54	55	56	7	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59		60	61	62	63	64	65
Apu2.16	Y	S	A	S	S	L	Y	S		Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
A8	Y	S	A	R	S	L	Y	S	8	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	60
A9	Y	S	A	V	S	L	Y	S	9	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	61
A11	Y	S	A	S	S	L	Y	S	10	D	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	62
A12	Y	S	A	R	S	L	Y	S	11	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	63
B1	Y	S	A	R	S	L	Y	S	12	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	64
B2	Y	S	A	R	S	L	Y	S	13	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	65
B3	Y	A	A	A	S	L	Y	S	14	Y	I	F	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	66
B4	Y	S	A	V	S	L	Y	S	15	D	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	67
B5	Y	S	A	A	S	L	Y	S	16	Y	I	A	P	Y	Y	G	A	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	68
B9	Y	S	A	R	S	L	Y	S	17	Y	I	F	P	Y	F	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	69
C1	Y	A	A	A	S	L	Y	S	18	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	70
C3	Y	S	A	V	S	L	Y	S	19	D	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	71
C4	Y	S	A	V	S	L	Y	S	20	Y	I	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	72
C5	Y	S	A	R	S	L	Y	S	21	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	73
C8	Y	S	A	R	S	L	Y	S	22	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	74
C12	Y	A	A	A	S	L	Y	S	23	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	75
D1	Y	A	A	V	S	L	Y	S	24	Y	I	S	P	Y	Y	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	76
D3	Y	S	A	T	S	L	Y	S	25	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	77
D7	Y	S	A	N	S	L	Y	S	26	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	78
D8	Y	A	A	A	S	L	Y	S	27	Y	I	V	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	79
D9	Y	S	A	V	S	L	Y	S	28	D	I	F	P	Y	Y	G	S	S	S	Y	A	D	S	V	K	G	80
D10	Y	S	A	S	S	L	Y	S	29	D	I	V	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	81
D11	Y	S	A	V	S	L	Y	S	30	Y	I	F	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	82
E1	Y	S	A	V	S	L	Y	S	31	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	83

E2	E3	E4	E5	E8	E12	F1	F3	F4	F6	F9	G1	G2	G3	G4	G5	G10	G11	G12	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H9	H10	コンセンサス
F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y/F
A	S	S	S	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	A	A	A	A	A	S	S	S	A/S
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A	R	S	A	A	R	V	V	L	A	S	S	S	A	T	L	V	A	S	A	A	A	A	S	V	V	L	S/R/ V/T/ A/N/ L
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	111
Y	Y	W	Y	Y	D	Y	Y	Y	D	D	Y	D	D	Y	Y	D	D	D	D	Y	Y	D	Y	Y	D	Y	Y/D/ W
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
A	A	S	A	T	T	S	F	Y	S	T	A	S	S	T	A	T	T	T	T	T	S	S	T	T	T	A	S/T/ A/F/ Y/V
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Y	Y	Y	Y	Y	F	L	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y/F/ L/H
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
S	S	S	S	S	F	S	S	W	S	F	S	S	S	S	S	F	S	S	S	S	S	S	F	S	F	S	S/G A/F W
S	S	S	S	S	T	T	S	Y	S	T	A	S	S	T	A	T	T	T	T	T	S	S	T	T	T	A	S/G A/F W
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

【 0 2 1 5 】

(C) F a b 産 生

最も特異的な抗 - K 6 3 結合型ジユピキチン・クローン の 2 4 (上記のファージ・スポ

10

20

30

40

50

ットE L I S AにおけるK 4 8 結合型ジユビキチンと比較してK 6 3 結合型ジユビキチンへの結合が1 0を超えるシグナル比率によって判断された)は、可溶性F a b 産生のために選択された。これらのF a b をコードしているプラスミドは、大腸菌に形質転換され、カルベニシリン含有の固体の寒天に塗布された。一つのコロニーを、5 0 μ g / m L カルベニシリン含有の2 5 m l の2 Y T ブロスに接種をするために用いた。培養は、3 7 で一晩増殖させ、5 m l を、5 0 μ g / m l のカルベニシリンを有する5 0 0 m l の完全C . R . A . P . 培地(3 . 5 7 g の(N H ₄)₂ S O₄、0 . 7 1 g のクエン酸ナトリウム₂ H₂ O、1 . 0 7 g のK C l、5 . 3 6 g のイースト抽出物、5 . 3 6 g のH y c a s e S F (シェフィールド)、p H はK O H の付加によって7 . 3 に合わせられ、体積は超純水で8 7 2 m l に合わせられ、オートクレーブされ、5 5 まで冷却後、1 M のM O P S (p H 7 . 3)、1 1 m L の5 0 % グルコース及び7 m L の1 M のM g S O₄ の1 1 0 m l を加えた)に接種するために用いた。培養は、3 0 で2 4 時間振盪培養した。細胞は遠心によって回収し、ペレットは- 2 0 で保存された。F a b は、1 0 μ g / m L のD N a s e、0 . 2 m g / m l のリゾチーム及び1 m M のフェニルメチルスルホニルフロリド(P M S F) を含有する3 5 m l の冷たい洗浄バッファー(P B S + 1 5 0 m M のN a C l) の各ペレットを再懸濁することによって精製された。ペレットは、速やかに、2 5 で4 5 分間のボルテックスによって再懸濁された。細胞残屑は遠心によってペレット化され、ライセートは冷たい洗浄バッファーによって前もって平衡化された1 m l のプロテインA - セファロース・カラム(G E H e a l t h S c i e n c e s) 上にロードされた。カラムは、5 0 m l の冷たい洗浄バッファーによって洗われて、3 m l の0 . 1 M の酢酸によって溶出させられて、1 5 0 μ L の2 M のトリス(p H 1 1 . 0) によって中和された。F a b は、A m i c o n ・U l t r a - 1 5 の遠心濾過機ユニット(5 K D カットオフ、ミリポア) を使用して濃縮された。結果として生じたF a b 濃度は、分光測光法で決定され、濃縮F a b は、4 で保存された。

(D) 単離されたF a b の親和性解析

2 4 の選択されたF a b の親和性(上の実施例1 (C) を参照) は、選択して、B I A C O R E^{T M} A 1 0 0 システム(B i a c o r e) を使用して、表面プラスモン共鳴(S P R) によって決定された。K 6 3 結合型ジユビキチンまたはK 4 8 結合型ジユビキチンの約5 0 反応単位は、製造業者によって提供されたアミン・カップリング・プロトコルを使用して、C M 5 チップの4 つのフローセルのうちの2 つに固定された。各C M 5 チップ上の1 つのフローセルは活性化され、固定タンパク質なしにブロックしたエタノールアミンは、対照標準として使われた。各F a b の二倍連続希釈法(3 1 . 2 5 - 5 0 0 n M) は、各フローセル上に注入された(3 0 μ L / 分の流速で、計6 0 μ L)。対象標準の信号は、各フローセル・シグナルから減算された。溶出期間後(1 0 分)、チップ表面は、1 5 μ L の1 0 m M のH C l によって再生した。速度定数及び結合定数は、製造業者によって提供されるソフトウェアを用いて非線形回帰分析法によって同時に算出して、表C に示した。親のA p u 2 . 1 6 F a b の速度定数及び結合定数の測定は3 回の独立した測定値、及び2 4 の親和性成熟されたF a b についての単一測定値からの平均(A v g) を示す。親のA p u 2 . 1 6 F a b 又は2 4 の親和性成熟されたF a b のいずれについても、K 4 8 結合型ジユビキチンへの検出可能な結合性を証明されなかった。

表C : S P R で測定された、K 6 3 結合型ジユビキチンに結合する親和性成熟された
抗K 6 3 結合型ポリユビキチンF a b の結合定数

<u>クローン</u>	<u>kon (1/Ms)</u>	<u>koff (1/s)</u>	<u>Kd (nM)</u>	
Apu2.16 平均	4.9×10^5	5.4×10^{-2}	110	
Apu2.16 測定値の標準偏差	0.49×10^5	2.0×10^{-2}	30	10
Apu3.A8	1.7×10^6	1.4×10^{-2}	8.7	
Apu3.A9	2.3×10^6	9.9×10^{-2}	44	
Apu3.A12	9.9×10^9	6.2×10^1	6.2	
Apu3.B3	4.8×10^6	2.9×10^{-2}	6.1	
Apu3.B5	1.0×10^6	4.6×10^{-2}	46	
Apu3.C1	4.3×10^6	7.8×10^{-2}	18	20
Apu3.C4	4.7×10^8	3.4×10^1	73	
Apu3.C5	1.0×10^6	2.9×10^{-2}	28	
Apu3.D3	7.9×10^5	6.1×10^{-2}	78	
Apu3.D7	8.1×10^5	3.7×10^{-2}	46	
Apu3.D8	3.9×10^8	4.4×10^0	11	
Apu3.E1	1.1×10^6	2.1×10^{-2}	18	
Apu3.E2	1.0×10^6	3.0×10^{-2}	29	
Apu3.E4	7.2×10^5	8.2×10^{-2}	110	30
Apu3.E5	1.0×10^6	2.6×10^{-2}	25	
Apu3.F1	8.3×10^5	2.3×10^{-2}	28	
Apu3.G1	6.5×10^5	5.4×10^{-2}	84	
Apu3.G2	6.1×10^5	5.4×10^{-2}	90	
Apu3.G3	1.0×10^6	4.1×10^{-2}	39	
Apu3.G4	7.3×10^5	2.4×10^{-2}	33	
Apu3.G5	1.1×10^6	3.1×10^{-2}	29	
Apu3.H5	1.0×10^6	2.9×10^{-2}	28	
Apu3.H6	3.6×10^9	7.8×10^1	22	40
Apu3.H7	2.0×10^4	9.2×10^{-4}	45	

(E) 親和性成熟 F a b のウエスタンブロット

実施例 1 (D) の S P R 解析から得られた結合定数は、3つのクローン (A p u 3 . A 8、A p u 3 . A 1 2 及び A p u 3 . B 3) が一桁のナノモル結合性を発揮することを示した。親の A p u 2 . 1 6 F a b に加えてこれらの3つの F a b は、ウエスタンブロットにおいて K 6 3 結合型ジユビキチン及び K 4 8 結合型ジユビキチンの検出が試験された。K 6 3 結合型ジユビキチン (3 1 - 1 0 0 0 n g) の6つの濃度及び K 4 8 結合型ジユビキチン (2 5 0 - 1 0 0 0 n g) の3つの濃度は、4 - 1 2 % の N u P A G E ゲル (イ ン ビ ト ロ ゲ ン) に泳動し、フッ化ポリビニリデン (P V D F) 膜に移され、親のクローン

及び3つの親和性成熟Fabによりブロットした。Fabは、カルボキシ末端6x-Hisタグを含んでいたもので、抗-ペンタHis-HRP抱合型2次抗体(Qiagen)により、ケミルミネセンス発現に続いて検出された。全4つのFabは、特異的にK63結合型ジユビキチン(図3を参照)を検出した。K48結合型ジユビキチンに対する結合性は、試験された4つのFabの何れについても観察されなかった。

(F) IgGへの変換

親のFab Apu2.16及び3つの親和性成熟されたFabであるApu3.A8、Apu3.A12、Apu3.B3は、ヒトIgGとして、HEK293細胞において発現された。発現コンストラクトは、ヒトIgGの重鎖および軽鎖をコードするpRK哺乳類発現コンストラクト(Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10 (1990))に、Fab可変ドメインをクローニングすることによって生成された。IgGは、標準方法によってプロテインA-セファロース・カラム上のアフィニティークロマトグラフィーによって精製された。

【0216】

実施例2：内因的ユビキチン化タンパク質の検出

実施例1(F)に記載の親和性成熟された抗K63結合型ポリユビキチンIgGの活性は、評価された。ウエスタンブロット分析のために、ポリユビキチンまたはポリユビキチン化タンパク質は、ポリアクリルアミドゲル上で泳動され、ゲルの内容は従来技術の標準的方法に従ってニトロセルロース・ブロットへ移された。結果として生じるニトロセルロース・ブロットは、5%の脱脂粉乳を含む10mMのトリス-HCl(pH7.5)、150mMのNaCl、0.1%のTween-20(TBST)で約1時間ブロックされた。主要な抗K63結合型ポリユビキチン抗体(IgG形態の親のApu2.16抗体、またはIgG形態のApu3.A8、Apu3.A12、又はApu3.B3のどちらか)は、室温で最短1時間の間に、最終濃度5µg/mlに加えられた。一晚のインキュベーションは、4で行われた。ブロットは、TBSTによって、1洗浄につき10分間、3回洗われた。結合した抗K63結合型ポリユビキチン抗体は、5%の脱脂粉乳を含有するTBSTに、1:10,000に希釈されたペルオキシダーゼ抱合型抗ヒトIgG(ICN Cappel)によって検出された。室温で1時間後に、ブロットはTBSTにおいて3~6回洗浄し、製造業者の指示に従ってSupersignal(ピアス)においてインキュベートされ、フィルムに露出された。内因的にユビキチン結合したタンパク質のウエスタン・ブロットについて、293Tの細胞は、Lipofectamine 2000(インビトロゲン)を使用して、3xHA-タグ付TRAF6を発現するベクターの有無にかかわらずトランスフェクションした。細胞は、最後の時間に、25µMのMg-132(Calbiochem)における培養のトランスフェクションの2日後に回収された。細胞はリン酸塩緩衝食塩水で洗われ、次にタンパク質抽出物は完全プロテアーゼインヒビター・カクテル(ロシュ)を補充した氷冷溶解緩衝液(20mMのトリス-HCl(pH7.5)、135mMのNaCl、1.5mMのMgCl₂、1mMのEGTA、1%のTriton X-100、10%のグリセリン、1mMのジチオスレイトール、2mMのN-エチル-マレイミド)において調製された。

図4及び5に示すように、3つの試験された親和性成熟された抗K63結合型IgGの各々は、ウエスタンブロットにおいて親のApu2.16 IgGより良好に機能した。図4は、2から7つのユビキチン・サブユニットを含む、固定され精製されたK48結合型又はK63結合型ポリユビキチンに対するウエスタンブロットの結果を表す。親のIgG Apu2.16は、試験された如何なる濃度でも、如何なる数のユビキチン・サブユニットの、K63結合型またはK48結合型ポリユビキチンを検出しなかった。親和性成熟されたIgG Apu3.A8、Apu3.A12、またはApu3.B3は試験された各濃度において、2から6つのサブユニットを含むK63結合型ポリユビキチンを検出し、試験された最も低い濃度以外の全てにおいて、7つのサブユニットのものを検出した。K48結合型ポリユビキチンに対する非特異的結合性は、3つの親和性成熟されたIgGの何れでも観察されなかった。親和性成熟された抗体が内因的にユビキチン結合された

タンパク質を検出することが可能だったかどうか確認するために、293T細胞はTRAF6によってトランスフェクションされ、MG-132によって処理されて、それはインビボでTRAF6のK63結合型ユビキチン化に結果としてなることが見いだされた (Wertz et al., Nature (2004) 430: 694-699)。図4の固定された精製ポリユビキチンによるウエスタンブロットと同様に、親のApu2.16 IgGは、K63結合型ポリユビキチン化TRAF6も又は他のいかなるK63結合型ポリユビキチン化タンパク質も、ウエスタンブロットアッセイにおいて検出することが不可能だった (図5)。しかしながら、各々の抗体Apu3.A8、Apu3.A12及びApu3.B3は、同じウエスタンブロット・アッセイにおいて、K63結合型ポリユビキチン化TRAF6及び他のK63結合型ポリユビキチン化タンパク質を特異的に検出した (図5)。

10

前の実験は、親和性成熟された抗体が、固定されたポリユビキチン化タンパク質を検出することができることを確認した。更なる実験は、これらの抗体がポリユビキチン化タンパク質を免疫沈降させることが可能であるかどうか確認するために行われた。免疫沈降アッセイのために、先に述べた溶解緩衝液は6Mの尿素を更に含んでおり、細胞は15分間の室温で溶解された。次に、不溶性物質は遠心によって除去されて、可溶性ライセートは通常の溶解緩衝液に希釈されて、尿素濃度を0.29Mまで下げた。ライセートは、プロテインA-セファロース (GE) によって、4で1時間、前もってクリアにされてから、次に5µgの示された抗体と共に4で1時間インキュベートされた。抗体複合体は、プロテインA-セファロースによって4で1時間捕獲されて、溶解バッファーで十分に洗われて、2.5%の2-メルカプトエタノールを補充されたNovexトリス-グリシンSDS-試料バッファー (インビトロゲン) 中で沸騰することによって溶出させられた。

20

TRAF6含有ライセートは、他のユビキチン結合タンパク質からそれを分離するために、1%のSDSの存在下で変性され、免疫沈降は0.05%の低いSDSの希釈に従って行われた場合、TRAF6は、K63特異的抗体によって捕獲されなかった (データを示さない)。しかしながら、TRAF6を発現している細胞が代替の変性剤である6Mの尿素の存在下で溶解された場合は、TRAF6の免疫沈降は成功した。図6Aに示すように、3つの親和性成熟された抗体は、親の抗体Apu2.16よりも、K63結合型ポリユビキチン化Traf6をより良く免疫沈降しており、これは、親和性成熟された抗体は、親の抗K63ポリユビキチン抗体と比較して、溶液中の内因性のK63ユビキチン化タンパク質に対する結合性が改良されたことを示す。更なる実験において、免疫沈降したK63結合型ポリユビキチン化物質の、無差別の脱ユビキチン酵素Usp2による処理は、図6A及び図6Bの第2レーンにおいて観察された、より高分子量バンドのスメアを崩壊させた時間を増大させ、免疫沈降したTRAF6がユビキチン化されていたことを確認した (図6B、レーン3から5)。Usp2に関連する可能性がある非特異的タンパク分解活性は、システインプロテアーゼ・インヒビターであるN-エチルマレイミド (NEM) を使用したUsp2脱ユビキチン化活性の阻害がスメアの崩壊を妨げたので (図6B、レーン6)、より遅く移動する種の観察された消失の原因となっている可能性は低い。K63特異的抗体Apu3.A8によって免疫沈降したTRAF6の一部は、その泳動から、変更されていないTRAF6であるように見えた。そして、非修飾TRAF6をトラップする自己オリゴマーの形成を誘導するTRAF6の過剰発現に起因する可能性が高い。

30

40

これらの結果は、質量分析実験によって確認された。ポリユビキチン鎖がトリプシンによって消化された場合、リジン結合の7つの異なるタイプの各々に対応するユニークなペプチドが観察されることがある。これは、間違って切断されたリジン上のGlyGlyのモチーフの一般的なコンセンサスに続く。7つの可能なポリユビキチン鎖結合の各々は、ユニークな質量 (10ppmの質量精度で測定される)、更には衝突による解離に応じたユニークな断片化パターンを有するユニークなペプチドを生ずる。従って、高分解能質量分析計を使用して、興味がある特異的なシグネチャー・ペプチドに対する標的を定めた解析とともに、K48かK63ポリユビキチン鎖結合の存在率のレベルを監視すること及

50

び数量化することができる。簡潔には、B J A B細胞からの免疫沈降反応は、抗K 4 8 結合型抗体、3つの親和性成熟された抗K 6 3 結合型ポリユビキチンI g G A p u 3 . A 8、A p u 3 . A 1 2 及びA p u 3 . B 3の混合物または対照抗体（ハーセプチン（登録商標））を使用して、上記の通りに行われた。タンパク質は化学的にアセトニトリル：水 + 0 . 1 % のT F Aを使用して、還元化、アルキル化され及びトリプシンによって消化されて、ビーズから抽出された。n a n o A C Q U I T Y ^{T M} U P L C（Thermo-Fisher Scientific）に結合するハイブリッドL T Q - O r b i t r a p質量分析計が、1時間の勾配（溶媒A：水 + 0 . 1 %のギ酸；溶媒B：アセトニトリル + 0 . 1 %ギ酸）を有する1 μ L / 分の流速で、使われた。計測器は調整されて、標的を定めた解析研究のための最適なチャージ状態を確認するために、トリプシンにより消化された合成テトラユビキチン（B o s t o n B i o c h e m）を使用して調整された。K 4 8 結合型ポリユビキチンについて決定されたm / zは4 8 7 . 6、7 3 0 . 8 9 及び1 4 6 0 . 7 8 であり、K 6 3 結合型ポリユビキチンについて決定されたm / zは5 6 1 . 8 0、7 4 8 . 7 3 及び1 1 2 2 . 6 であった。トリプシンによる消化、逆相分離及び標的を定めたタンデム型質量分析の後、K 4 8 及びK 6 3 ポリユビキチン・ペプチドのためのイオン・クロマトグラムは抽出されて、ピーク面積は濃度を推定するために算出された。

免疫沈降解析の結果は、図7 Aと7 Bに記載される。図7 Aに示すように、3つの親和性成熟された抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体の混合物は、特異的にK 6 3 結合型ポリユビキチン化タンパク質を免疫沈降させた。図7 Bの結果は、抗K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体がK 4 8 結合型ポリユビキチン・ペプチドについて交差反応を起こさないことを示す（一方で、比較のために、K 4 8 結合型ポリユビキチン抗体は、K 4 8 結合型ポリユビキチン・ペプチドについて相当な濃縮を示す）。

更なる質量分析実験において、ポリユビキチン化タンパク質は、上記の通りにヒトB J A B細胞から免疫沈降して、次に標準分析法を使用してS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分解した。免疫沈降したゲル分解されたタンパク質は、イン・ゲル・トリプシン消化を受けて、次にユビキチン - A Q U A法の変形法を使用して分析された（K i r k p a t r i c k e t a l . , N a t . C e l l B i o l . 8 : 7 0 0 - 7 1 0 (2 0 0 6) ）。簡潔には、トリプシン消化物は、ポリユビキチン鎖結合及び非分枝型ユビキチンを各々表しているアイソトープ標識された内標準ペプチドで補充され、次に標準と加えてそれに対応する天然検体は、狭いレンジで抽出されたイオン・クロマトグラムを使用して、高解像度前駆体イオン・スキャンにおいて検出された（C r o s a s e t a l . , C e l l 1 2 7 : 1 4 0 1 - 1 4 1 3 (2 0 0 6) ）。各々のポリユビキチン鎖結合の存在率とB J A B免疫沈降物のユビキチンの総量は、その対応する内標準に比較して、各々の消化されたペプチドからのシグナルを比較することによって定量化された。特に、B J A B細胞は、スピナー・フラスコにおいて、1 0 0 μ MのL - アスパラギン、5 0 μ Mの2 - メルカプトエタノール及び1 0 %のウシ胎仔血清で補充されたダルベッコの改質イーグル培地の高グルコース・バージョンにおいて培養された。細胞（> 1 0 ⁹）は、P B Sで洗われて、6 Mの尿素、2 mMのN - エチルマレイミド（N E M）及び完全プロテアーゼインヒビター・カクテル（ロシュ）を含有する溶解バッファー（2 0 mMのトリス - H C l（p H 7 . 5）、1 3 5 mMのN a C l、1 . 5 mMのM g C l ₂、1 mMのE G T A、1 %のトリトンX - 1 0 0、1 0 %のグリセリン）中に室温で3 0 分間溶解した。不溶性物質は遠心によって除去し、次にライセートはプロテアーゼインヒビター、2 mMのN E M及び1 mMのD T Tで補充された溶解バッファーで4 Mの尿素に希釈された。1時間のプロテインA - セファロース（GE Healthcare）によって前もってクリアにされた後、ライセートは、A p u 3 . A 8 抗 - K 6 3（I g G形態）、A p u 2 . 0 7 抗K 4 8（I g G形態）又はアイソタイプ・コントロール抗体（抗H e r 2）のいずれかの3 0 μ gを受けた3つの試料に分けられた。試料は、2時間室温でインキュベートされ、沈澱した物質を取り除くために、続いて遠心分離機にかけられた。更なる抗体（1 0 μ g）は同様に可溶性ライセートに加えられ、更にプロテインA - セファロースと試料が一晩室温でインキュベートされた。セファロース・ビーズは、溶解バッファー、次にP B Sで十分に洗われた。ビーズは、還元S D S サンプルバッファーに溶出されて、ヨー

10

20

30

40

50

ドアセトアミドでアルキル化されて、次に4 - 20 %のトリス・グリシン・ゲル類（インビトロゲン）のSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析された。（沈降抗体由来の重鎖及び軽鎖を表す25及び55 kDaの領域を除いて）ゲルの全ての領域は、切り出され、つぶされ、50 : 50のアセトニトリル：水中の25 mMの NH_4HCO_3 で洗浄し、脱水された。ゲルは、次にトリプシン（プロメガ）を含む25 mMの NH_4HCO_3 で再水和され、37 °Cで一晩インキュベートされた。反応は、0.008 %のTFAの付加によって停止された。ペプチドは5 %の酢酸で2度抽出され、次に100 %のアセトニトリルで抽出された。これらの試料は、AQUAペプチド標準（1 pmol）によってスパイクをつけられて、NanoAcquity UPLCシステム（Waters）上の逆相クロマトグラフィーによって、分離のためにオートサンプラーを経て注入された。プレカラム（5 μm 、シンメトリー（登録商標）C18、180 x 20 mm）上にロードされたペプチドは、分析カラム（1.7 μm のBEH - 130 C18カラム100 x 100 mm（Waters））を使用して、1分につき1 μL の流速で、2 %の溶媒Bから90 %の溶媒Vの勾配を70分に渡って適用して、全分析時間90分により、分離した。ペプチドは、2 kVのスプレー電圧によりナノスプレー・イオン化源に直接溶出し、LTQ XL - Orbitrap質量分析計（ThermoFisher）を使用して分析された。前駆体イオンは、60,000の分解能でFTMSにおいて分析された。定量化は各ペプチドの重いバージョンと軽いバージョンのためのピーク面積を比較することによって行われ、4小数位までの10 ppmの質量精度でイオン・クロマトグラムを抽出した。

MURF1自己ユビキチン化反応は、製造業者の指示（Boston Biochem）に従って行われた。免疫沈降のために、試料は、4 Mの尿素を含有する100倍の溶解バッファーに溶解され、プロテインA - セファロースによって前もってクリアにされ、次に抗体（20 μg ）とプロテインA - セファロースと共に一晩免疫沈降した。トータル・ユビキチンは、P4D1抗体（Santa Cruz Biotechnology）でプロットした。質量分析によって分析されるMURF1試料は、5 %の溶媒Bから30 %の溶媒Bへの15分の勾配によりAgilent 1100 LC モジュール上で、全分析時間30分で分析された。イオン・クロマトグラムは、期待される m/z から、1ウインドウ ± 15 ppmを抽出することによって作成された。

【0217】

抗K48結合型ポリユビキチン抗体Apu2.07、抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu3.A8及びHer2を認識するアイソタイプ対照抗体は、それぞれ49.1 pmol、2.2 pmol及び0.2 pmolのトータル・ユビキチンを免疫沈降させた（図7C）。この結果は、K48結合型ポリユビキチン鎖が、免疫沈降のために使用された投入ライセート中のK63結合型ポリユビキチン鎖よりも豊富だったという観察と一致していた（図7D）。抗K48抗体によって免疫沈降したポリユビキチン結合の直接的検証は、12.7 pmolのK48 - GGシグネチャーペプチド及び特定の他の結合についてシグネチャーペプチドの残存する量を明らかにした（0.1 pmolのK63、1.1 pmolのK11、及び2.0 pmolのK6）（図7E）。同様に、抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu3.A8によって免疫沈降したポリユビキチン鎖は、主にK63 - GGシグネチャーペプチド（0.3 pmolのK63）及びより小さい量の他の結合ペプチドを産生した（0.18 pmolのK48、0.08 pmolのK11及び0.06 pmolのK6）（図7F）。表面プラスモン共鳴によって抗ポリユビキチン抗体について見られる強い結合性選択を想定すると、これらの質量分析結果は、ユビキチンによって修飾される細胞基質の有意分画が不均一なポリユビキチン鎖結合を呈することを示唆する。

BJAB細胞ライセートから免疫沈降するこれらの「的外れの」結合が不均一なポリユビキチン鎖を生じている基質に由来していることを確認するために、非特異的結合性とは対照的に、「的外れの」結合の免疫沈降のための標的結合の必要性を調査した。K48又はK63結合の何れかを欠いている混合された結合ポリユビキチン鎖は、無差別のE2酵素Ubch5cと組合わせたE3 MURF1を使用して、インビトロで生成された（

Kim et al. J.Biol. Chem. 282: 17375-17386 (2007))。K 4 8 又は K 6 3 結合は、アルギニンについて突然変異した K 4 8 又は K 6 3 のどちらかを有した変異体ユビキチンを使用した Mu R F 1 自己ユビキチン化反応から除外された (図 7 G)。汎ユビキチン抗体によるウエスタンブロッティングによって、Mu R F - 1 自己ユビキチン化反応は、野生型か、K 4 8 R、又は K 6 3 R ユビキチンが使われるかどうかにかかわらず高分子量スミアを産生した (図 7 H、レーン 1、5 及び 9)。野生型ユビキチンによる反応のユビキチン - A Q U A 解析は、3 つの主な結合を明らかにした: K 4 8、K 6 3 及び K 1 1 (図 7 I、レーン 1)。期待通りに、K 4 8 R ユビキチンによって行われる反応は、K 4 8 結合型ポリユビキチン鎖を欠いていた (図 7 I、レーン 9)。Mu R F 1 が野生型ユビキチンによって修飾された場合に (図 7 H、レーン 3 - 4)、抗 K 4 8 結合型及び抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、ポリユビキチン化種を免疫沈降させたが、特異的であるものに対する標的結合が存在しないならば、各々の抗体はそうすることが出来なかった (図 7 H、レーン 7 及び 1 2)。アイソタイプが一致した対照抗体 (抗 H E R 2) は、何れの反応由来のユビキチン化 Mu R F 1 を免疫沈降させなかった (図 7 H、レーン 2、6 及び 1 0)。濃縮に使用する抗体に関係なく、野生型 Ub 反応由来の免疫沈降した種のユビキチン - A Q U A 解析は、K 4 8 -、K 6 3 - 及び K 1 1 - 結合鎖の存在を証明した (図 7 J、レーン 3 及び図 7 K、レーン 4)。ウエスタンブロッティングによって予測されるように (図 7 H、レーン 7 と 1 2)、それらの標的の結合が更に存在していた場合だけ、K 1 1 結合鎖は、抗 K 4 8 結合型及び抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体によって免疫沈降した (図 7 J 及び 7 K)。これらの結果は、抗 K 4 8 結合型及び抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体が、免疫沈降に関してそれらの正確さを保持することを証明した。更に、それらは、抗 K 4 8 結合型及び抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体によって、細胞から免疫沈降された別の結合が、標的及び的外れの結合の両方を生じる個々の基質に由来するにちがいないことを示す。

【 0 2 1 8 】

実施例 3 : 親和性成熟抗体を使用したユビキチン化経路の検出

ポリユビキチン化の主要なタンパク質によって調整される多くの細胞経路は同定されている。本発明の親和性成熟された抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、細胞における特定のタンパク質の K 6 3 結合型ポリユビキチン化の範囲を決定するために用いた。それは K 6 3 結合型ポリユビキチンによるユビキチン化が役割を果たす細胞シグナル伝達経路の説明を助ける。

(A) T N F R 1 の T N F 活性化

腫瘍壊死因子受容体 1 (T N F R 1) の T N F 活性化は、R I P と T R A F 2 の会合につながる (図 8 A を参照)。T R A F 2 は、R I P に K 6 3 結合型ポリユビキチン鎖を与え、T A K 1 / T A B 2 / T A B 3 の補充及び N F κ B シグナル伝達経路の続く活性化を可能にする。この経路によるシグナル伝達のダウンレギュレーションは、R I P 上の K 6 3 結合型ポリユビキチン鎖を除去し、それらを K 4 8 結合型ポリユビキチン鎖と交換し、分解のためのプロテアソームについて R I P を標的とする、脱ユビキチナーゼ A 2 0 によって起こる。本発明の親和性成熟された抗 K 6 3 結合型ポリユビキチン抗体は、経路のさまざまな混乱の間に、R I P のポリユビキチン化の程度と種類を評価するために用いた。

簡潔には、H e L a S 3 細胞は、1 0 分間の 2 1 μ M の M G - 1 3 2 によって処理された。その後、細胞は、1 0 0 n g / m l の T N F によって、0 から 2 5 分まで処理された。各時点において、細胞はペレット化されて、P B S で一度洗われた。洗われたペレットは、プロテアーゼインヒビター、2 5 μ M の M G - 1 3 2、1 0 m M の N - エチルマレイミド (N E M) 及び 5 0 m M の N a F を含む、2 0 m L の T N F R 1 免疫沈降バッファ (2 0 m M の T r i s、1 5 0 m M の N a C l、1 % のトリトン X - 1 0 0 及び 1 m M の E D T A) に、回転により、4 で 1 0 分間、溶解した。ライセートは、1 0 , 0 0 0 \times g で 5 分間遠心分離機にかけた。透明なライセートは、回転させながら、4 で 1 時間、2 0 0 μ L のプロテイン A ビーズと共にインキュベートされた。ビーズとデブリは、5

分間 2,000 rpm / 分の遠心によってペレット化された。試料は、上記の通りに、ウエスタンブロット分析のための各時点のライセートから取り出された。免疫沈降試料のために、20 μ L の抗 TNFR1 抗体は各試料に加えられ、試料は 4 で 2.5 時間、回転させた。200 μ L の非ブロック化プロテイン A を各試料に加え、試料を再度 4 で 2.5 時間回転させた。ビーズは免疫沈降バッファーによって 2 回、1 M の NaCl を含む免疫沈降バッファーで 2 回、免疫沈降バッファーによって 2 回洗浄した。ビーズに特異的に結合したタンパク質は、6 M の尿素を含んでいるユビキチン鎖溶解バッファー (20 mM の Tris - Cl (pH 7.5)、135 mM の NaCl、1.5 mM の $MgCl_2$ 、1 mM の EGTA、1% のトリトン X-100 及び 10% のグリセリン) により、室温で 15 分間、穏やかな振動により回収された。ビーズは、遠心によってペレット化された。上清は、プロテアーゼインヒビター、10 mM の NEM 及び 0.5 mM のジチオスレイトールを含むユビキチン鎖溶解バッファーにより 25 倍に希釈され、続いて 50 μ L のプロテイン A ビーズ + 10 μ g のハーセプチンで 2 時間、前もってクリアにした。抗 K48 結合型ポリユビキチン抗体と抗 K63 結合型ポリユビキチン抗体 (Apu3-A8 と Apu3-B3 の 1:1 混合物) は、4 で 3 時間のプロテイン A ビーズに前もって結合された。免疫沈降反応試料は、前もって結合させた抗体の一つと組み合わせて、4 で 2 時間回転させ、続いて溶解バッファーで洗浄し及び試料バッファーの付加をした。試料は、上の実施例 2 に記載の手順に従って、還元され、アルキル化されて、4-12% の Tris / Glycine 15 - ウェル Novex ゲルに泳動し、続いて移して、イムノブロッティングし、ウエスタンブロット分析した。

既知の RIP 修飾経路の簡単な形態を、図 9 B に図式的に示す。TNF による HeLa S3 細胞の処理は、TNFR1 との複合体である、RIP の K63 結合型ポリユビキチンを刺激する。2 段階の免疫沈降 (第 1 の TNFR1 複合体の免疫沈降、次に K48 結合型ポリユビキチン化タンパク質又は K63 結合型ポリユビキチン化タンパク質の免疫沈降) は、TNF 処理に応じて RIP のユビキチン化状態の解析を可能にする。図 9 A に図示するように、RIP タンパク質が TNF 処理の最初の 5 分以内に、急速に TNFR1 と結びつき、結合した RIP の量は、その後の TNF 治療の時間を問わず一定のままである (プロット 4)。TNFR1 と最初に結合する RIP は、K63 結合型ポリユビキチン化されているが、TNF によるより長い処理は鎖の編集につながり、K48 結合型ポリユビキチン化 RIP に結果としてなる (プロット 6 と 7 を比較する)。したがって、K63 結合型ポリユビキチン標識を有する RIP と K48 結合型ポリユビキチン標識を有する RIP を区別する能力は、TNF が引き金となる細胞経路について重要な情報を提供するものであり、本発明の親和性成熟された抗体は、質量分析または他の生物物理学的な解析を行うこと無しに、この RIP 介在経路を調べることに、便利で役立つツールを提供する。

【0219】

(B) IRAK1 のポリユビキチン鎖編集

キナーゼ RIP1 は、順に K63 - 及び次に K48 結合型ポリユビキチン鎖を修飾するものであって、後者は E3 脱ユビキチナーゼ A20 によって与えられ、更に A20 は特定の TLR によるシグナル伝達の既知の負の調節剤であること (Boone et al. Nat. Immunol. 5: 1052-1060 (2004)) を考慮すると、TLR とインターロイキン 1 受容体 (IL-1R) に取り込まれる他のキナーゼ・アダプターは、同じように調節のために調査された。翻訳後に修飾された IRAK が活性化された受容体複合体に迅速に取り込まれ、続いて劣化するので、IRAK1 はポリユビキチン鎖編集を受けることについて潜在的な候補であった (Yamin and Miller J. Biol. Chem. 272: 21540-21547 (1997))。IL-1R と IL1R-ACP を安定に発現している 293 の細胞は、10 ng / mL の IL-1 (eBioscience) の付加の直前に、25 μ M の MG-132 によって処理された。細胞は PBS により洗われて、6 M の尿素を含む IRAK IP バッファー (20 mM の HEPES (pH 7.6)、150 mM の NaCl、1.5 mM の $MgCl_2$ 、2 mM の EGTA、10 mM の NaF、2 mM の DTT 及び 0.5% のトリトン X-100) に

溶解した。可溶性ライセートは溶解バッファーに約20倍に希釈され、抗K48結合型ポリユビキチン抗体Apu2.07又は抗K63結合型ポリユビキチン抗体Apu3.A8とApu3.B3の1:1配合物のどちらかによって免疫沈降が、実施例3(A)でRIP1について記載したとおりに実施された。IRAK1抗体は、Santa Cruz Biotechnologyから入手した。

IL-1による処理に応じて、IL-1Rを安定して発現している細胞は、2分以内に、改質IRAK1のスミアを明らかにした(図10A)。IRAK1のより遅い移動の形態は、10分でより豊富になり、NEM感度が高い様式のUsp2によって、IRAK1の非修飾形態に変換される可能性がある。これらの結果は、IRAK1のより高分子量形態がユビキチン化によることを示唆した。ユビキチン化IRAK1の出現は、IL-1分解によって証明されたように、下流のNF- κ Bシグナル伝達の活性化と同時だった(図10B)。IL-1による処理後の異なる時間に、細胞ライセートは、6Mの尿素中に調製されて、IRAK1のウエスタンブロッティング前に、結合型特異的ポリユビキチン抗体によって免疫沈降した(図10C)。K63結合型ポリユビキチン鎖によって修飾されたIRAK1はIL-1処理の5分後に検出されて、処理後30-60分に最大となり、高分子量IRAK1スミアの出現のタイミングを反映していた(図10Bの上パネルと図10Cの下パネルとの比較)。トータルIRAK1シグナルの強度が鎮静し始めた時間の後に、K48結合型ポリユビキチンの量は、IRAK1に、はっきりと90-150分でピークに達した。細胞がプロテアソーム・インヒビターMG-132の存在下でIL-1で処理した場合、ユビキチン化IRAK1のこの分解は阻害されて(図10D)、プロテアソーム性分解のためのIRAK1を標的とするK48結合型ポリユビキチン鎖と一致していた。したがって、IL-1で処理される細胞のIRAK1のポリユビキチン鎖編集は、TNFによって処理される細胞のものと似ており、ポリユビキチン鎖編集のこの処理は下流のシグナル伝達イベントを終了する一般的機構を表しうる。K63結合型ポリユビキチン標識を有するIRAK1とK48結合型ポリユビキチン標識を有するIRAK1を区別する能力は、TNFが引き金となる細胞経路について重要な情報を提供するものであり、本発明の親和性成熟された抗体は、質量分析または他の生物物理学的な解析を行うこと無しにこのIRAK1介在経路を調べることに、便利で役立つツールを提供する。

【0220】

実施例4: K63dUBと複合したAPU3.A8の結晶構造

Apu3.A8の観察された親和性と特異性の改良点の構造的な結果を理解するために、Fab断片はK63結合型ジユビキチンと複合して結晶化され、構造は2.6Å分解能で解明された(図2C)。簡潔には、Apu3.A8のFab断片は、大腸菌において発現され、タンパク質G-セファロースを使用して精製され、0.58%の酢酸により溶出させた。Fabを含有する分画は、20mMのMES(pH5.5)において平衡化したSP HiTrapカラム(GE Healthcare)を使用して精製され、NaCl勾配により溶出した。更に、タンパク質は、20mMのトリス-HCl(pH7.3)、150mMのNaClで、S-200カラム(GE Healthcare)に通すことによって、精製された。K63結合型ジユビキチンは、50mMのトリス-HCl、5mMのMgCl₂、0.5mMのDTT、2.5mMのATP中の4.1mMのユビキチン(K63R及びD77)、0.1μMのE1(Boston Biochem)及び20μMのE2(K63についてUbch13/Uev1a)(Boston Biochem)とともに、37°Cで一晩インキュベートすることで作成した(参照、例えば、Pickart and Raasi, Meth. Enzymol. 399: 21-36 (2005))。ジユビキチンは、NaCl勾配及び20mMのMES(pH5.5)中のMono Sカチオン交換カラムを使用して精製され、次に0.5mg/mlに濃縮した。ジユビキチン-Fab複合体は、ジユビキチンと共にFabの3倍のモル過剰から調製された。複合タンパク質は、20mMのトリス-HCl(pH7.3)、150mMのNaClのSuperdex 75カラムを通して精製された。複合分画はプールされて、結晶化スクリーニング実験のために17mg/mlまで濃縮した。K63Rジユビキチン-Apu3.A8

(90 μm \times 90 μm \times 150 μm) の結晶は、タンパク質 (20 mM のトリス - HCl (pH 7.3)、150 mM の NaCl 中の 17 mg/ml) とウェル溶液 (0.1 M のトリス - HCl (pH 8.0)、1.6 M の LiSO_4) の 1:1 混合物からの滴を温めて、18 で 2 週間後に成長した。結晶は、30% グリセリンを付加したウェル溶液を使用して、抗凍結保護した。結晶学的データは、SSRL ビームライン 7 - 1 (表 D) で収集され、HKL (HKL) によって処理された。構造は、プログラム PHASER (CCP4) を使用している分子置換、続く REFMAC5 (CCP4) による微調整によって解析された。Apu3. A8 複合体は、サーチモデルとして厳正な Apu2.16 複合体を使用して解析された。(図 2 A 及び米国特許公開番号 US 2007 - 0218069 を参照) (図 2 C 及び 2 D)。全ての図は、PyMol (www.pymol.org) によって製作された。

10

表 D: X線データ収集及び統計学的修正

	Ubq-Apu2.16	Ubq-Apu3A8
データ収集		
空間群	C2	C2
細胞寸法		
a, b, c (Å)	177, 95, 98	107, 88, 90
β (°)	107	108
分解能 (Å)	50-2.7 (2.80-2.70)	50-2.6 (2.69-2.60)
R_{sym}	5.0 (52.6)	5.1 (58.0)
$\langle I/\sigma I \rangle$	15.9 (1.9)	11.6 (1.9)
完全性 (%)	99.2 (100)	98.1 (97.9)
冗長	3.8 (3.9)	3.8 (3.9)
リファインメント		
分解能 (Å)	30 - 2.7	50 - 2.6
asu複合体	2	1
反射の数	40,137	21,569
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	22.1, 27.3	24.0, 30.1
原子の数		
タンパク質	8914	4469
溶媒	0	25
R.m.s. 偏差		
結合距離 (Å)	0.009	0.009
結合角 (°)	1.2	1.1

20

30

40

*かっこ内の値は最も高分解能シェルである。

結果として生じた構造は、L2 と H2 の変化は、特異性を非常に改良したが、Fab の構造に比較的小さい影響を及ぼした (図 2 C)。CDRL3 の配座と軽鎖の N 末端基鎖の違い (双方とも結晶充填の相違に起因している) を除いて、A8 Fab の構造は、親の A16 Fab の構造と実質的に同一である (412 C - 原子上 rmsd 0.08

50

）。双方の構造は、ヒト化抗HER2抗体4D5のFv領域と比較された（図2D）。L1の配座と3つのFabのN末端は、かなり異なる。T5のC-原子は、Apu2.16又はApu3. A8のいずれかとヒト化4D5の構造間の14オングストロームによって置換されるが、3つの構造のこれらの領域は同一の配列である。L3の配座と配列は、同様にかなり異なる。これらの相違は、Apu3. A8のQ90の位置に影響を及ぼすためにそれがN末端基鎖によって通常占められている空間を占有し、L1の付随する再編成によるこの鎖の置換に結果としてなる。上記の共結晶構造のK63ジユビキチン構造のK63ジユビキチン単独の結晶構造（pdbコード2JF5）又はK48ジユビキチンの結晶又は溶液構造との比較は、FabがK63結合に特有であるジユビキチンの特異的なコンフォメーションを認識することを証明する（Cook et al., J. Biol. Chem. 267: 16467-16471 (1992); Varadan et al., J. Mol. Biol. 324: 637-647 (2002))。

驚くべきことに、L2のR52も、H2のT52もジユビキチンとの密接な接触はせず、どちらの残基もあまりApu3. A8上のユビキチン-結合性表面に寄与しない。その代わりに、これらの2つの突然変異の効果は、K63アクセプター・ユビキチンと軽鎖（図2E）の表面との間の改良された荷電相補性によって主に促進されているように見える。Apu3. A8軽鎖において、R52（Apu3. A8に導入された）とR66は、ユビキチン表面上の負に荷電する領域に近い付近にある陽領域に寄与し、K63受容体ユビキチンからの残基D21、D58及びE18によって、部分的に作成される。

【0221】

実施例5：細胞内のポリユビキチン鎖の局在

前の実験は、本発明の親和性成熟された抗体は、ウエスタンブロットにおいてK63結合型ポリユビキチン化タンパク質の感度が高く特異的な検出ができること、細胞ライセートからのK63結合型ポリユビキチン化タンパク質を特異的に免疫沈降させることができること、及び一つ以上のタンパク質のK63結合型ポリユビキチン化を含んでいる細胞経路の解明を助けるために使用できることを証明する。更なる実験は、細胞内のポリユビキチン化種、及び任意の当該検出タンパク質が局所化する場所の視覚化のための間接免疫蛍光法鏡検において使用する抗体の能力を確認するために行われた。2ウェル・チャンバー・スライドで増殖させたHeLa細胞は、20分間室温で、4%パラホルムアルデヒドのPBS溶液で固定され、PBSで2度リンスし、5分間の0.1%のトリトンX-100を含むPBSによって透過させた。10%のヤギ血清、0.1%のトリトンX-100及び0.1%のサポニンで補充したアールの平衡塩類溶液で1時間ブロッキング後、細胞は、ブロッキング溶液中の1µg/mlのApu2.07抗-K48、1µg/mlのApu3. A8抗-K63、又は5µg/mlのPW8155抗-プロテアソーム抗体（Biomol International）によって1晩4℃で標識した。細胞は、0.1%のトリトンX-100を含むPBSで3回洗浄し、次に4滴のImage-IT[®]FXシグナル・エンハンサー（インビトロゲン）により15分間インキュベートした。細胞は、0.1%のトリトンX-100を含むPBSで3回洗浄し、次にブロッキング溶液に希釈したテキサスレッド-抱合型の抗-ウサギ抗体（Jackson ImmunoResearch）及びCy2抱合型抗ヒト抗体により1時間染色した。細胞は、0.1%のトリトンX-100を含むPBSで3回洗浄し、水で2回リンスし、次にDAPI（インビトロゲン）を含有するProLong Gold[™]及び1.5mmのカバーガラスでマウンドした。細胞は、AxioPlan2光学顕微鏡（ツァイス）下で調べ、画像は、SlideBook[™]ソフトウェア（Intelligent Imaging Innovations）によって制御されたCoolSNAP_{HQ} CCDカメラ（Photometrics）で記録した。加えて、Z-シリーズ画像を撮って、SlideBook[™]またはAutoQuant[™]（Media Cybernetics）ソフトウェアを使用して、デコンボリューション鏡検によって分析された（データは示されない）。シグナルの局在化を確認するために、更に、試料は、LSM510MET A・レーザー読み取り共焦点顕微鏡（ツァイス）で調べられた。提出した画像の全ては、一回キャプチャーの広視野の蛍光性顕微鏡写真である。

結果を図11に示す。抗K48結合型ポリユビキチン抗体Apu2.07は、HeLa

10

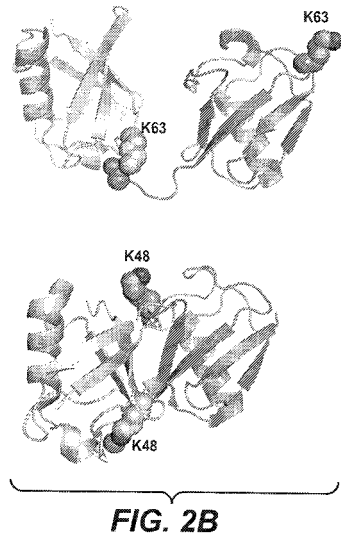
【 図 2 A 】

FIG. 1A

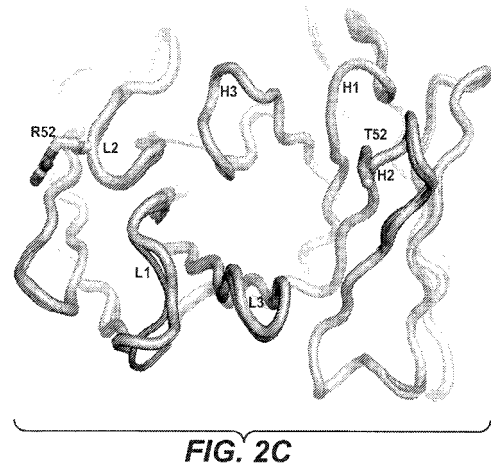
$\begin{array}{c} \text{ビオチン}-\text{R L R G G}-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \\ | \\ \text{AcNH}-\text{I F A G N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-\text{Q L E D CONH}_2 \\ \text{"K}_{48}\text{"} \end{array}$

FIG. 1B

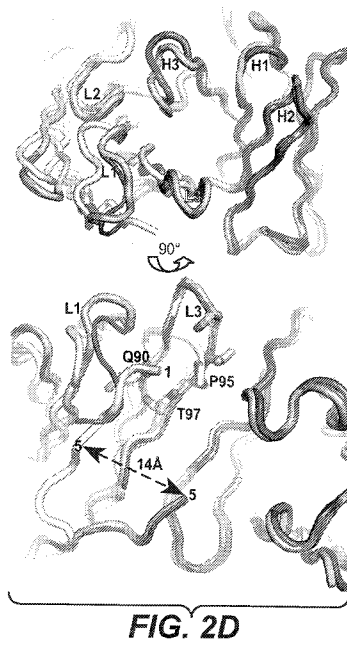
【図 2 B】



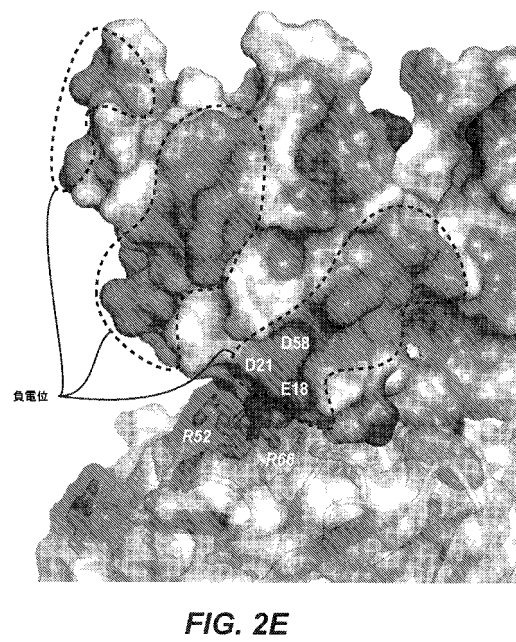
【図 2 C】



【図 2 D】



【図 2 E】



【図 3 A】

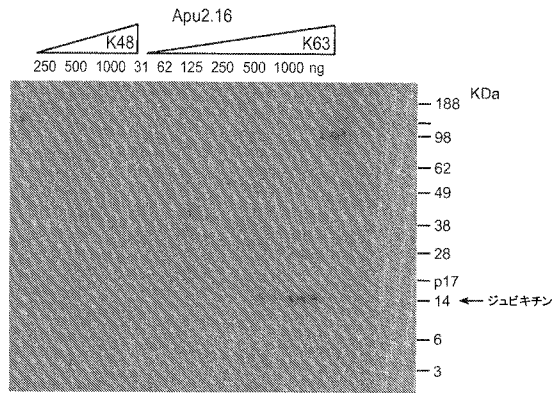


FIG. 3A

【図 3 B】

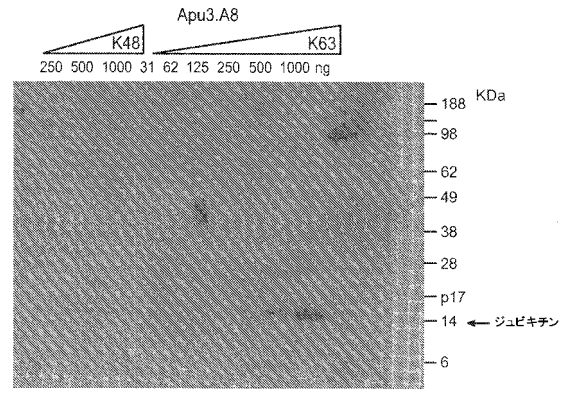


FIG. 3B

【図 3 C】

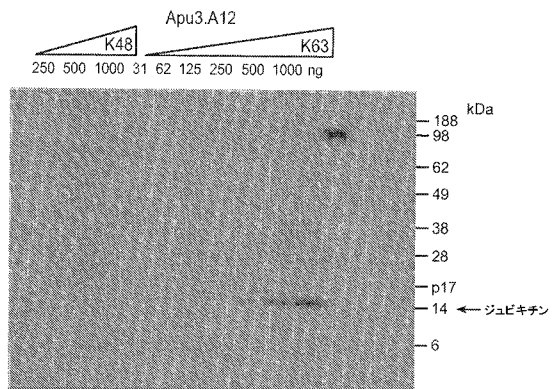


FIG. 3C

【図 3 D】

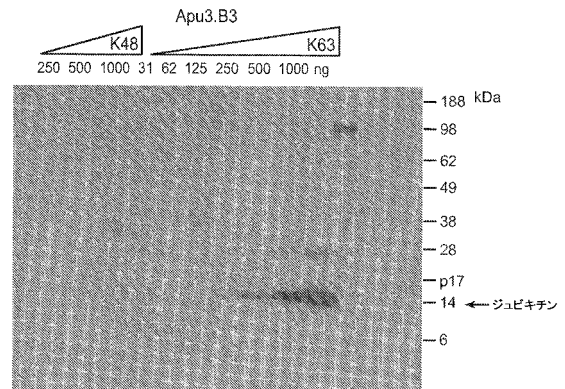
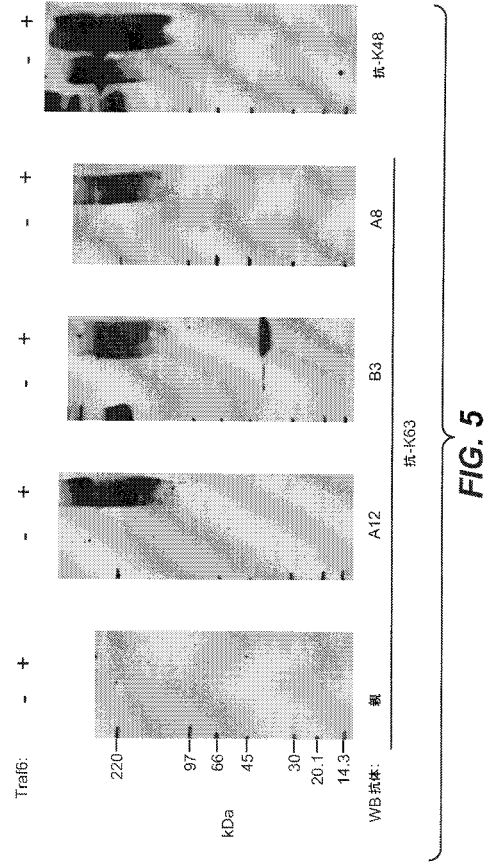
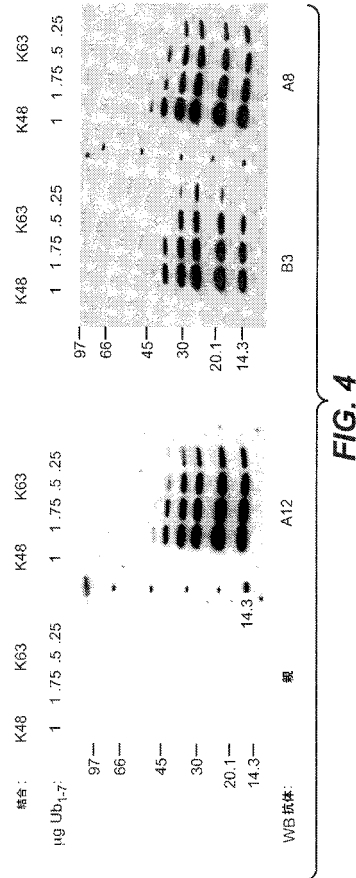


FIG. 3D

【 図 5 】



【 図 6 A 】

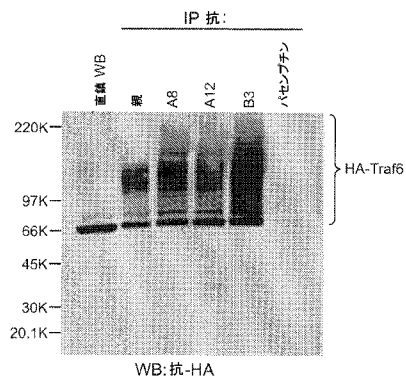


FIG. 6A

【 図 6 B 】

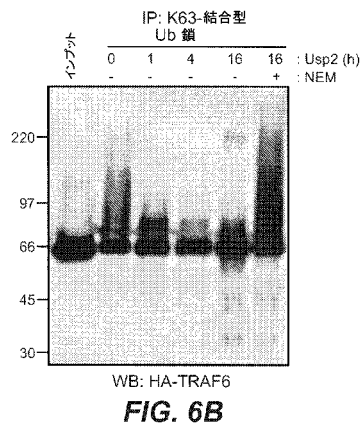


FIG. 6B

【 図 7 A 】

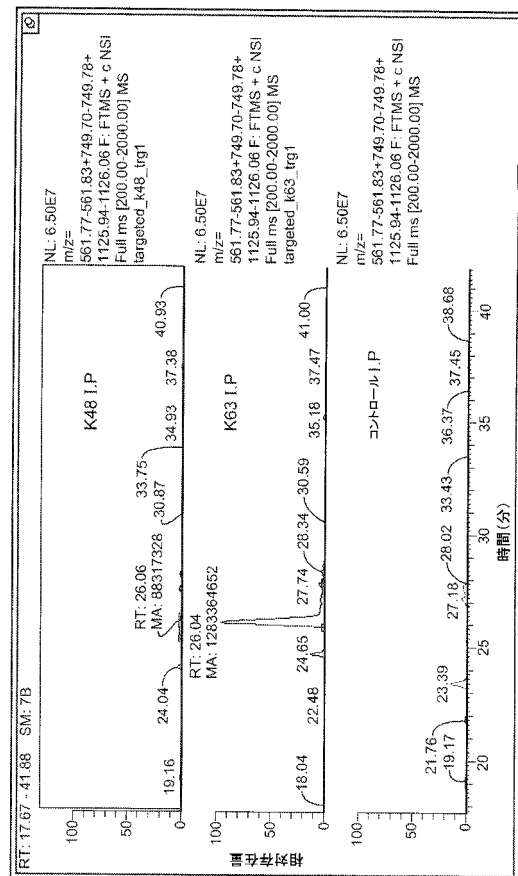


FIG. 7A

【図 7 B】

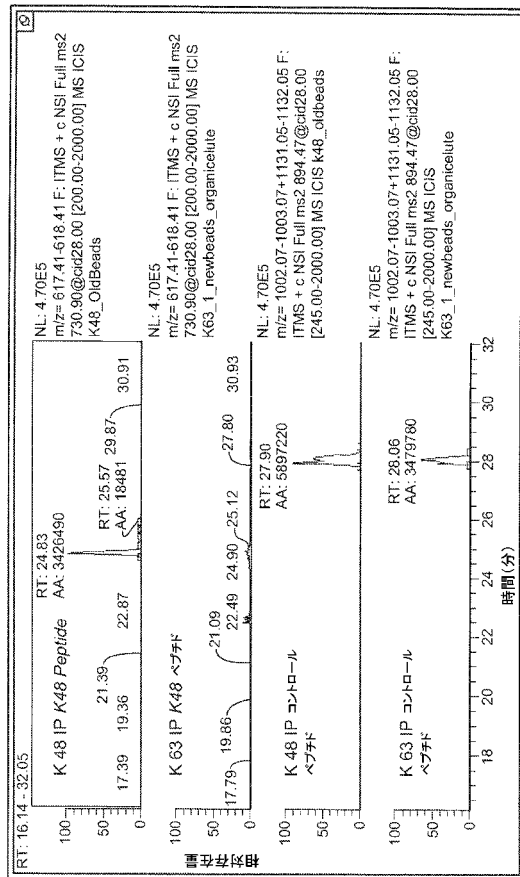


FIG. 7B

【図 7 C】

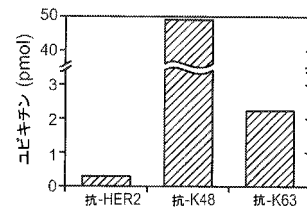


FIG. 7C

【図 7 D】

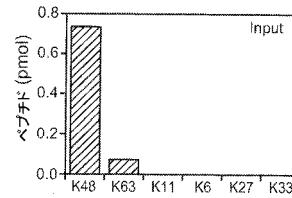


FIG. 7D

【図 7 E】

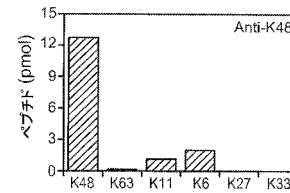


FIG. 7E

【図 7 F】

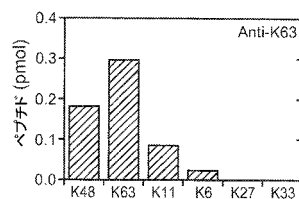


FIG. 7F

【図 7 G】

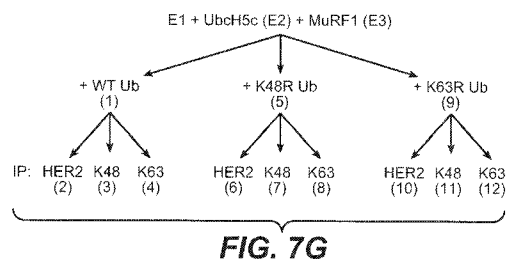


FIG. 7G

【図 7 H】

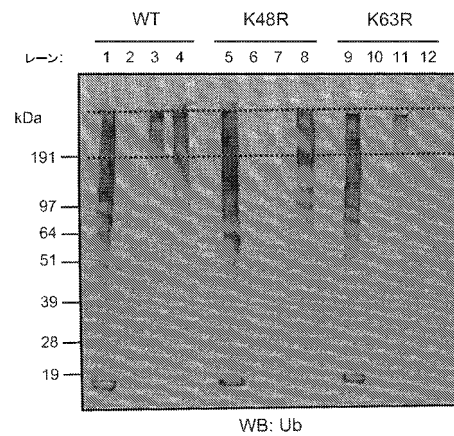


FIG. 7H

【図 7 I】

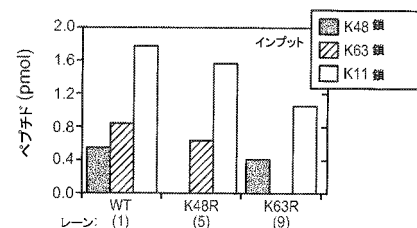


FIG. 7I

【図 7 J】

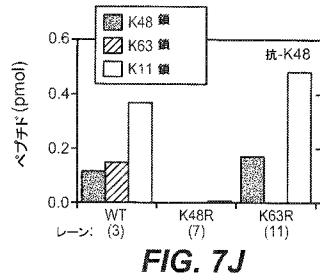


FIG. 7J

【図 7 K】

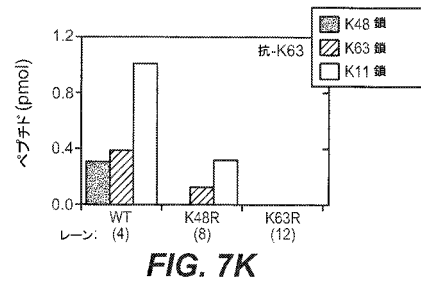


FIG. 7K

【図 8 A】

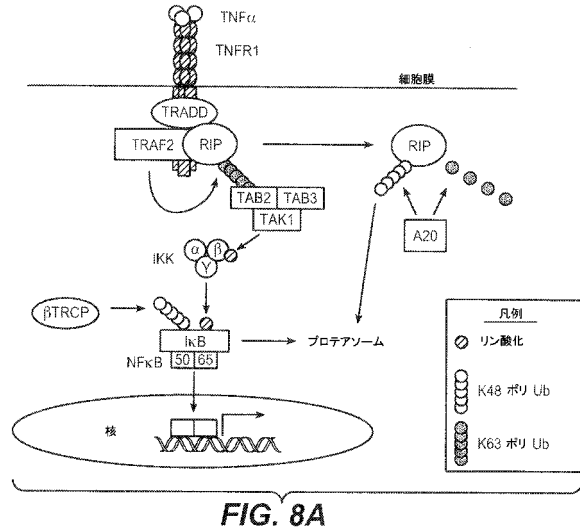


FIG. 8A

【図 8 B】

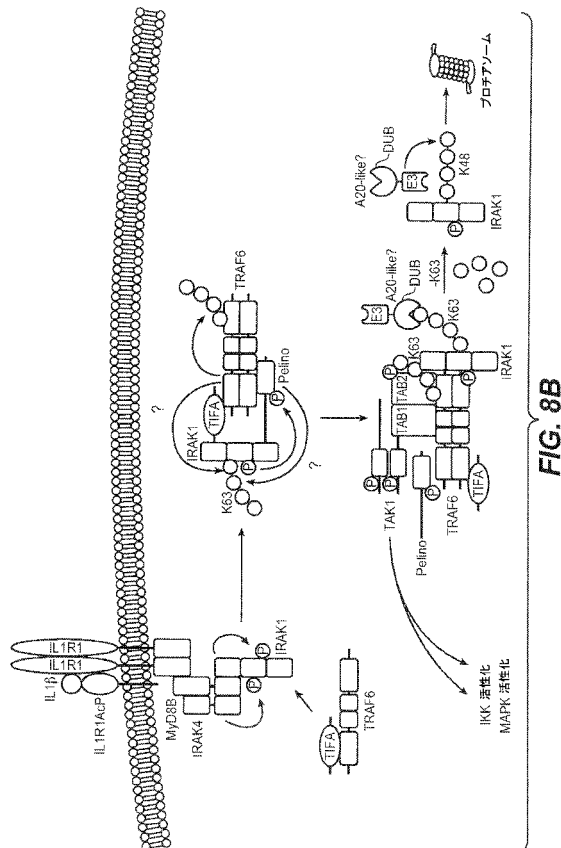


FIG. 8B

【図 9 A】

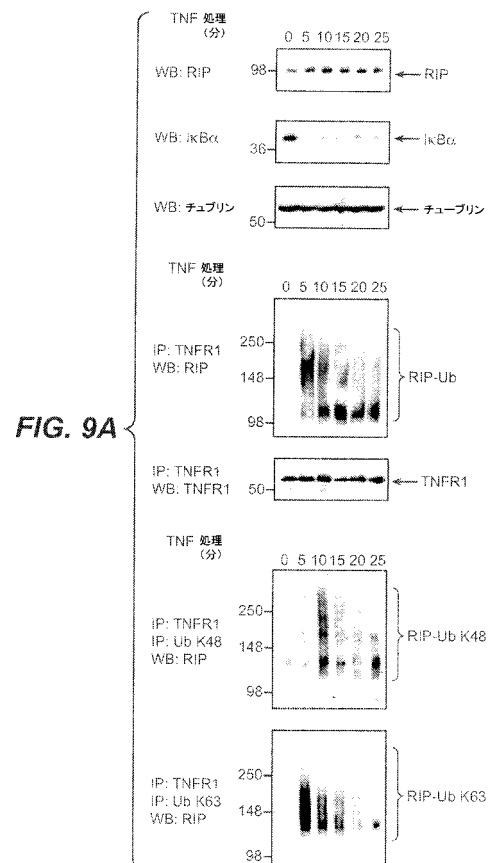
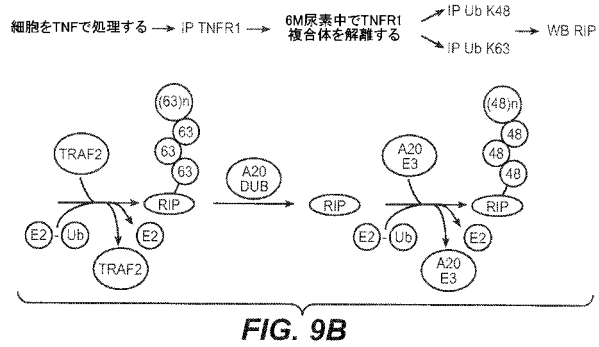
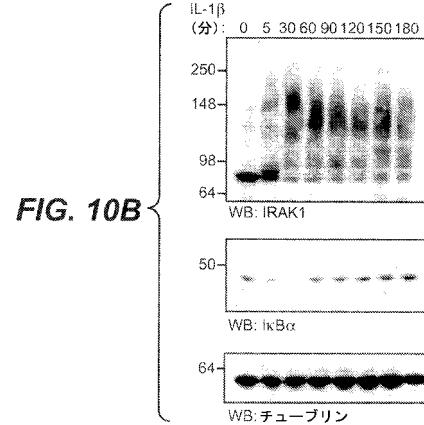


FIG. 9A

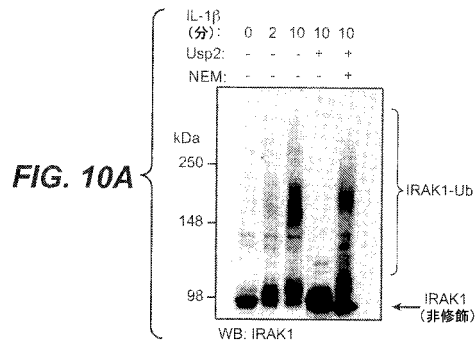
【図 9 B】



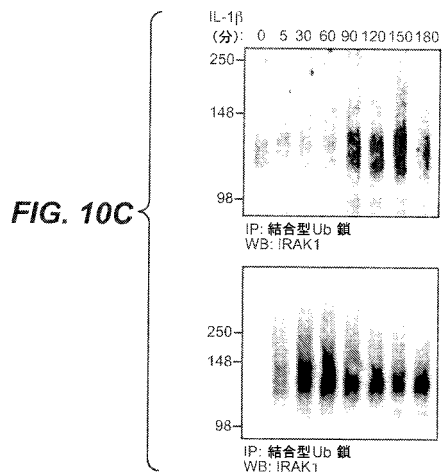
【図 10 B】



【図 10 A】

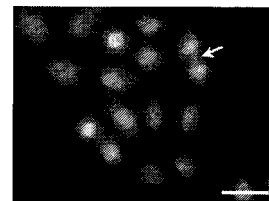


【図 10 C】



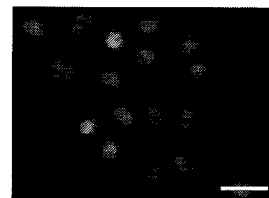
【図 11 A】

FIG. 11A

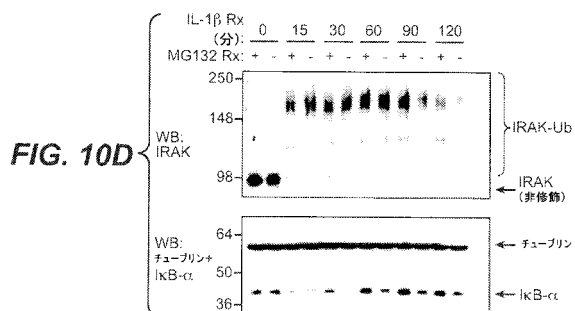


【図 11 B】

FIG. 11B

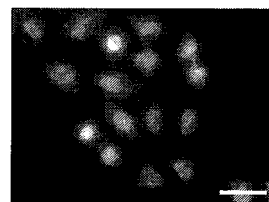


【図 10 D】



【図 11 C】

FIG. 11C



【 ㊦ 1 1 D 】

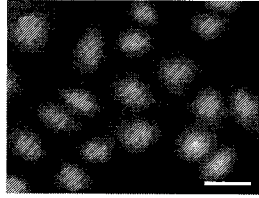


FIG. 11D

【 図 1 1 E 】

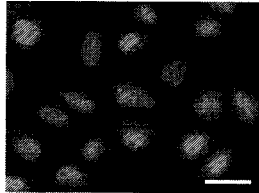


FIG. 11E

【 図 1 1 F 】

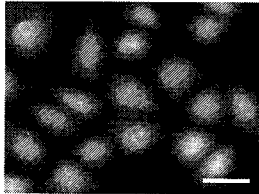


FIG. 11F

【 ㊦ 1 2 B 】

[illegible]

FIG. 12B

【 図 1 3 】

kV1	DIOMTQSPSSASABVGRVITTC	-L1-	WYQKRPQAPKLLIY	-L2-	GVPSFSGSGSGTDFTLTTSIQLP
kV2	DIVNTQSPISLPVTFEPASISC	-L1-	WYIQKPGSQPLLIV	-L2-	GVPDFSGSGSGTDFTLTKISRVEA
kV3	EIVLTQSPGTISLSPGERATISC	-L1-	WYQKRPQAPKLLIY	-L2-	GIPDFSGSGSGTDFTLTTSIRLEP
kV4	DIVNTQSPDIAVSLGERATINC	-L1-	WYQKRPQAPKLLIY	-L2-	GVPDFSGSGSGTDFTLTTSISLQA

FIG. 13

【図 1 2 A】

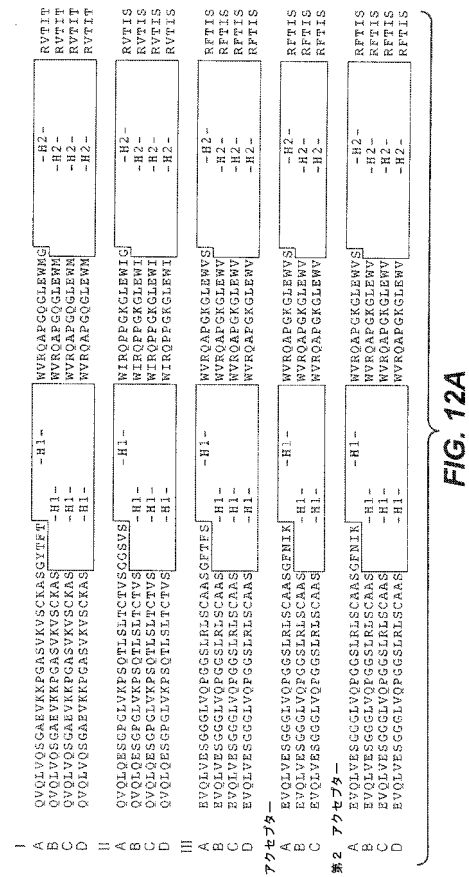


FIG. 12A

【図 14】

huMAb4D5-8 軽鎖のフレームワーク配列

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (配列番号: 205)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(配列番号: 206)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(配列番号: 207)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (配列番号: 208)

huMAb4D5-8 重鎖のフレームワーク配列

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (配列番号: 209)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(配列番号: 210)

HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(配列番号: 211)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (配列番号: 212)

FIG. 14

【図 15】

位置66と98(下線部)で修飾されたhuMAb4D5-8のフレームワーク配列

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (配列番号: 213)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(配列番号: 214)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(配列番号: 215)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (配列番号: 216)

位置71、73および78(下線部)で修飾されたhuMAb4D5-8のフレームワーク配列

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (配列番号: 217)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(配列番号: 218)

HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (配列番号: 219)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (配列番号: 220)

FIG. 15

【配列表】

0005523345000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K 1/22
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 マツモト, マリッサ, エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, 3 7 番ビー, イー
 スト ヒルズデール ブールヴァード 1 2 0 0

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 1 2 0 3 3 4 (W O , A 2)
 特開平 0 7 - 2 3 8 0 9 6 (J P , A)
 Cell. 2008 Aug, Vol.134, No.4, p.668-678
 FEBS Lett., 1 9 9 4 年 8 月 1 日, Vol.349, No.2, pp.173-180
 Genes Cells, 2 0 0 4 年 1 0 月, Vol.9, No.10, pp.865-875

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 Pub Med
 J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)
 U n i P r o t / G e n e S e q
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q