

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5226308号
(P5226308)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

| | | | |
|-------------------------|---------------|-------|--|
| (51) Int. Cl. | F 1 | | |
| C 1 2 Q 1/37 (2006.01) | C 1 2 Q 1/37 | Z N A | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | A | |
| C O 7 K 14/81 (2006.01) | C O 7 K 14/81 | | |
| C 1 2 N 9/64 (2006.01) | C 1 2 N 9/64 | Z | |

請求項の数 4 (全 80 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-523715 (P2007-523715) | (73) 特許権者 | 509012625 |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年7月25日 (2005.7.25) | | ジェネンテック, インコーポレイテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2008-507295 (P2008-507295A) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス |
| (43) 公表日 | 平成20年3月13日 (2008.3.13) | | サンフランシスコ ディーエヌエー |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2005/026446 | | ウェイ 1 |
| (87) 国際公開番号 | W02006/014928 | (74) 代理人 | 100109726 |
| (87) 国際公開日 | 平成18年2月9日 (2006.2.9) | | 弁理士 園田 吉隆 |
| 審査請求日 | 平成20年7月17日 (2008.7.17) | (74) 代理人 | 100101199 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/591, 339 | | 弁理士 小林 義教 |
| (32) 優先日 | 平成16年7月26日 (2004.7.26) | (72) 発明者 | キルヒホファー, ダニエル, ケイ. |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 |
| 前置審査 | | | 24, ロス アルトス, エス. スプリング |
| | | | ー ロード 326 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 肝細胞増殖因子活性化を制御するための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝細胞増殖因子 (HGF) のヘプシンによる活性化を阻害する候補インヒビター物質の同定方法であって、

(a) 候補物質をヘプシンとプロHGF基質とを含有する第一試料と接触させる工程であって、前記プロHGF基質はプロHGFであり、ヘプシンは天然ヘプシンであるか又は天然ヘプシンに対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するヘプシン変異体であって前記プロHGF基質を活性化することが可能である工程、及び

(b) 前記第一試料中のプロHGF基質の活性化量を、第一試料と同等量のヘプシンとプロHGF基質とを含有するが該候補物質と接触させていない対照試料中のプロHGF基質の活性化量と比較する工程であって、対照試料中のプロHGF基質の活性化量と比較して第一試料中のプロHGF基質の活性化量が少ない場合に、該候補物質が単鎖HGF (プロHGF) のヘプシンによる活性化を阻害することができることが示される工程を含む、方法。

【請求項 2】

物質が肝細胞増殖因子 (HGF) のヘプシンによる活性化を阻害するかどうかを確かめる方法であって、

(a) 候補物質をヘプシンとプロHGF基質とを含有する第一試料と接触させる工程であって、前記プロHGF基質はプロHGFであり、ヘプシンは天然ヘプシンであるか又は天然ヘプシンに対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するヘプシン変異体であ

って前記プロHGF基質を活性化することが可能である工程、及び
 (b) 前記第一試料中のプロHGF基質の活性化量を、第一試料と同等量のヘプシンとプロHGF基質とを含有するが該候補物質と接触させていない対照試料中のプロHGF基質の活性化量と比較する工程であって、対照試料中のプロHGF基質の活性化量と比較して第一試料中のプロHGF基質の活性化量が少ない場合に、該候補物質が単鎖HGF(プロHGF)のヘプシンによる活性化を阻害することができることが示される工程を含む、方法。

【請求項3】

前記物質が、ヘプシンもしくはプロHGFと結合する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記試料中のヘプシンが前記プロHGFを活性化するために有効な量である、請求項1から3の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(関連出願)

本出願は、米国特許法規則1.53(b)(1)に基づき出願した非仮出願であり、米国特許法119条(e)に基づき、2004年7月26日出願の米国特許仮出願番号60/591339号の優先権を主張するものであり、その全体の開示が出典明記によりそのままここに組み込まれる。

【0002】

(技術分野)

一般的に本発明は分子生検及び成長因子制御の分野に関する。より具体的には、本発明はHGF/c-metシグナル伝達経路のモジュレータ、及び該モジュレータの使用に関する。

【0003】

(背景)

ヘプシン(Hepsin)(別名TMRPSS1)は細胞表面発現型キモトリプシン様セリンプロテアーゼであり、マトリプターゼ(matriptase)(別名MT-SP1)およびエンテロペプチダーゼ(1)も含むタイプII膜貫通型セリンプロテアーゼ(TTSP)のファミリーのメンバーである。第19染色体のq11-13.2に位置する(2)ヒトヘプシン遺伝子は、スカベンジャーレセプターシステイン-豊富な(SRCR)、プロテアーゼドメインから成る細胞外ドメイン(Arg45-Leu417)、膜貫通領域及び短いN末端細胞質尾部を含んでなる417のアミノ酸ポリペプチド(3)をコードする。

ヘプシン酵素前駆体は、Arg162-Ile163(4)の切断によって、自己触媒的に活性化され、SRCRドメインにジスルフィド結合されたプロテアーゼドメイン(Cys153-Cys277)によって、ヘテロ二量体の酵素を形成する。共有結合性Cys-Cys結合に加えて、ヘプシンの最近決定された結晶構造により、SRCRとプロテアーゼドメインは、およそ1200²を覆い隠す各々のドメインである広い作用領域を共有していることが明らかとなった(5)。この作用領域がSRCRドメインの膜貫通の近位残基の近くに位置するので、ヘプシンプロテアーゼドメインおよび活性部位は細胞表面の近くに位置しうる(5)。これは、活性部位が膜表面のはるか上流(60-80)に位置する、凝固因子VIIa(FVIIa)¹、IXa及びXaなどの他の細胞表面集積性セリンプロテアーゼと基本的に異なる(6-8)。

【0004】

ヘプシンの生理機能は理解しがたいものであった。凝固因子VIIを除いて、高分子基質は知られておらず、生理的に関連するインヒビターは同定されなかった。血液凝固におけるヘプシンの役割はKazama等(1995)(9)により提唱され、ヘプシン形質移入細胞が凝固因子VIIを活性化できることが示された。しかしながら、ヘプシン欠陥マウスは生存可能であり、血液凝固障害を示さない(10、11)ことから、正常な止血におけるヘプシ

10

20

30

40

50

ンの重要性に疑問が投げられた。しかしながら、血液凝固、組織因子(13、14)の一次イニシエータが存在しない病理学的状態、例えば腎臓細胞上皮癌(12)において、ヘプシンがフィブリン形成に関与しうる可能性がある。さらに、他の研究では、ヘプシンと細胞性成長との機能的な関連を示唆している。腫瘍細胞株および使用する実験条件によって、ヘプシンは、成長促進活性(15)又は成長抑制活性(16)を有することが報告されている。なかでも、ヘプシンに関する付加的情報は、PCT公開番号国際公報2004/009803、米国特許第6,482,630号、米国特許第6,423,543号、米国特許第5,981,830号、米特許出願公開番号2004/0009911A1、米特許出願公開番号2004/0001801A、米特許出願公開番号2003/0223973A1、米特許出願公開番号2003/0175736A1、米特許出願公開番号2003/0013097A1(また、国際公報02/059373)、米特許出願公開番号2003/0049645(また、国際公報02/064839)、及び、米国特許出願公開番号2004/0132156にみられる。

【0005】

近年の遺伝子発現実験によって、前立腺癌において、最も上方制御される遺伝子の一つとしてヘプシンが同定された(17-22)。インサイツ染色法により、前立腺分泌腺の上皮細胞において、ヘプシン発現が示された(19)。ヘプシンの発現は悪性形質転換と相関しており(19)、進行した疾患患者の腫瘍において、最も高く、良性過形成において、最も低い(18、22)。対照的に、ヘプシンタンパク質の発現の低さはグリーンスコアの高さと大きな腫瘍に相関することが示された(20)。この見かけの矛盾は用いられた方法、すなわち免疫組織化学(20)とRNA定量化(18、22)に関連があるかどうかは明らかでない。さらにまた、ヘプシンは、主に上皮細胞型に関する卵巣がん(23)及び、腎臓細胞上皮癌において、強く上方制御される(12)。

【0006】

上皮細胞表面では、ヘプシンは、典型的には、細胞外基質および他の膜関連タンパク質の成分と相互作用するように位置する。ヘプシンに構造的に関連があるTTS Pマトリプターゼ(matriptase)(同義語MT-S P 1)(24、25)を含む、キモトリプシン様セリンプロテアーゼは、線維素溶解酵素、基質メタロプロテアーゼ及び肝細胞増殖因子(HGF)などの成長因子の潜在型を活性化することが知られている。HGFは、レセプターチロシンキナーゼMet((26、27)において、概説される)を活性化することによって、細胞増殖、移動、血管新生、生存および形態形成を促進する。正常な生理機能におけるその重要性に加えて、HGF/Met経路は、侵襲性腫瘍成長および腫瘍転移に関係している(26)。HGFは、セリンプロテアーゼプラスミノゲンに高い類似性があり、キモトリプシン様プロテアーゼに相同性を有する鎖及び4つのクリングルドメイン及びNDメインを含有する鎖からなる。それは、不活性な一本鎖前駆体(プロHGF)として細胞外基質に分泌され、Arg494-Val495での活性化切断を要して、生物学的に適正なジスルフィド結合されたヘテロ二量体を形成する(28-31)。この工程は、プロHGF転換セリンプロテアーゼ、例えば肝細胞増殖因子活性化因子(HGFA)(32)、マトリプターゼ(33、34)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(u-PA)(35)、第XIIa因子(36)、第XIa因子および血漿カリクレイン(34)により媒介される。HGFAおよびマトリプターゼは、細胞表面発現型Kunitz型インヒビター、例えば2つの肝細胞増殖因子活性化因子インヒビタースプライシング変異体HAI-1(37、38)およびHAI-1B(34)によって、及びHAI-2(39)により阻害される。HAI-2(別名胎盤bikunin)(40)はまた、第XIa因子および血漿カリクレイン(41)を強力に阻害するのに対して、HAI-1Bはほとんどないしは全く阻害活性を有しない(34)。したがって、細胞外基質のプロHGFプールの生物学的有効性は、プロHGF転換酵素およびそのインヒビターの活性により制御される。

【0007】

その機能不全が発癌の元となりうる他の成長因子のレギュレーターとして機能する潜在能力とともに、上記の癌組織でのヘプシン発現の分布から、その物質とヘプシンとの相互作用

10

20

30

40

50

用の調節が効果的な治療的アプローチとなりうることが示唆される。この点に関して、ヘプシンの生理的基質及び/又はその生理的モジュレータ(一又は複数)を同定する必要性が明らかに存在する。本発明はこの必要性を果たして、他の利点を提供するものである。

特許出願および刊行物を含む、本願明細書中のすべての引例は出典明記によりその全体が組み込まれる。

【0008】

(発明の開示)

本願明細書において、記述されるように、複数の癌において、非常に過剰発現する細胞-表面タンパク質であるヘプシンの生理的基質は、それ自体が癌発生の多くの態様において、重要な役割を果たすことが知られている肝細胞増殖因子である。ヘプシンは、強力な生理学的プロHGF転換酵素であるHGF A(肝細胞増殖因子活性化因子)と同等の活性を有するプロHGFを切断することが本明細書において、示されている。ヘプシンにより生成される2鎖(活性化型)HGFは、Metチロシンリン酸化の誘導、細胞増殖の刺激及び細胞移動の刺激などの正常な生物活性を表す。加えて、2つのクーニッツ(Kunitz)ドメインインヒビターであるHAI-1BおよびHAI-2は、ヘプシン酵素活性の生理学的調節因子として、本願明細書において、特定される。本発明は、これらの所見の少なくとも一部をベースとした、さらに詳細に後述される方法および組成物を提供する。ヘプシンおよびHGF及び/又はその生理学的インヒビターとの相互作用は固有のものであり、HGF/Met(「c-met」とも称される)経路の異常又は不必要なシグナル伝達と関係する病的状態に対する予防的方法及び/又は治療的方法を設定する際の重大な微調整のための有益な標的となりうることを示す。ゆえに、本発明は、HGF活性化の調節に伴う生理学的相互作用分子の制御を介してHGF/c-met経路を制御できる物質を同定するための、及び該物質を使用するための方法、組成物、キット及び製造品を提供する。

【0009】

したがって、一態様では、本発明は、HGFのヘプシン活性を阻害する候補インヒビター(すなわちアンタゴニスト)物質のスクリーニング(又は同定)方法であって、(a)候補物質をヘプシンとプロHGF物質を含有する第一試料と反応させ、(b)該試料中のプロHGF物質の活性量を、第一試料と同じ量のヘプシンとプロHGF物質を含有するが該候補物質と反応させていない対照試料中のプロHGF物質の活性量と比較し、対照試料中のプロHGF物質の活性量と比較して第一試料中のプロHGF物質の活性量が少ない場合に、該候補物質が短鎖HGF(プロHGF)のヘプシン活性を阻害できることを示す方法を提供する。一実施態様では、試料中のヘプシンは、前記プロHGFを活性化するために有効な量である。プロHGF上のヘプシン切断部位の特徴を擬態する限り、これらの方法への使用に好適なプロHGF基質は多くの形態であってよい。プロHGF基質の例として、R494-V495ペプチド結合の野生型を含有する完全長一本鎖HGF、およびこのペプチド結合を含有するHGFの任意の断片が含まれるが、これに限定されるものではない。このような断片は任意の長さであり、例えば少なくとも(およそ)5、7、10、15、20、25アミノ酸の長さ、又は、両者間に、(およそ)4と25、5と20、7と15アミノ酸の間の長さであってもよい。一般にそして好ましくは、プロHGF基質は、野生型ヘプシンにより切断されうるR494-V495ペプチド結合を含んでなる。一実施態様では、プロHGF基質は、プロテアーゼのコンセンサス切断部位に一致するヒトHGFの切断部位を含んでなる(すなわち位置P₁'の塩基性残基と位置P₁'およびP₂'の2つの疎水性アミノ酸残基 P₁R494、P₁'V495、P₂'V496)。

【0010】

他の態様では、本発明は、ヘプシンによって、プロHGF活性化をブロックする物質のスクリーニング方法であって、(好ましくは、必然的ではないが、特異的に)ヘプシン又はプロHGFに結合して、ヘプシンとプロHGFとの特異的な相互作用をブロックする物質のスクリーニングを含む方法を提供する。いくつかの実施態様では、物質はHGFへの結合についてヘプシンと競合する。いくつかの実施態様では、物質はヘプシンへの結合についてプロHGFと競合する。一実施態様では、前記の物質は、少なくともおよそ60%、

70%、80%、90%、95%で、99%の配列類似性又は(例えばヒトの)プロHGFと同一性を有するアミノ酸配列を含有する、これらからなる、ないしはこれらから基本的になるもの、例えば、アミノ酸残基495(Val)に結合したアミノ酸残基494(Arg)を含有するヒトHGFの断片である。物質がそのようなアミノ酸配列を含有する、これらからなる、ないしはこれらから基本的になる実施態様では、断片は変異されるか、少なくとも一部のHGF鎖を欠いて、該断片は野生型HGFと比較してc-met活性化活性を減じている。

【0011】

当業者に明らかであるように、上記したそれらと一致したスクリーニングアッセイはまた、候補調節物質の第一群を得るためにヘプシン-HGF複合体形成の情報に基づくスクリーニングの第一工程の後、HGFの活性化及び/又はHGF/c-met経路を活性化できる形態へのHGFの変換を調節するために候補調節物質の第一群の能力に基づくスクリーニングの第二工程を含んでもよい。適切な情報は、HGF/c-metシグナル伝達経路と関係する酵素 基質複合体形成及び/又は生物学的活性の認識に基づいて、当業者に明らかな任意のものでよい。酵素 基質複合体形成は、例えば、慣例的な生化学アッセイ(例えばゲル電気泳動、クロマトグラフィ、NMRなど)を使用して測定されてもよい。HGF/c-met生物学的活性には、C-metリン酸化、C-metキナーゼの基質である細胞性分子のリン酸化、細胞性成長(増殖、生存など)、血管新生、細胞移動、細胞形態形成などがあるが、これに限定されるものではない。

一態様では、本発明は、HGF/c-metシグナル伝達経路を崩壊させるHGF/c-metアンタゴニストを提供する。例えば、本発明は、プロHGFのヘプシン切断(例えばR494-V495位置での切断)を阻害する分子を提供する。分子は、限定するものではないが、プロHGFのヘプシン切断が阻害されるヘプシン又はプロHGF何れかへの結合、プロHGFの切断が阻害されるヘプシン-プロHGF複合体への結合、および/またはヘプシンによるHGF切断の効果が阻害される(例えばヘプシンによる切断に続くHGFの放出の阻害)プロHGF又はヘプシンへの結合など、任意の方法でその阻害性機能を発揮してもよい。一実施態様では、本発明のアンタゴニスト分子は、c-metへのHGF結合を阻害しない。例えば、一実施態様では、アメリカ培養細胞系統保存機関寄託番号ATCC HB-11894(ハイブリドーマ1A3.3.13)又はHB-11895(ハイブリドーマ5D5.11.6)の下に寄託されるハイブリドーマ細胞株により産生される抗体と、本発明のアンタゴニスト分子は同種の抑制性及び/又は結合能力を有する抗体又はその断片でない。一実施態様では、本発明のアンタゴニスト分子は、HGF/c-met活性化と関係する生物学的活性を阻害する。

【0012】

一態様では、本発明のアンタゴニストは、肝細胞成長因子インヒビター(HAI-1、HAI-1B、HAI-2)がプロHGFのヘプシン活性化の強力なインヒビターであるという本明細書中の発見に由来する。一実施態様では、本発明はヘプシンによるプロHGF活性化のアンタゴニストを提供するものであり、該アンタゴニストはヒトHAI-1、HAI-1B又はHAI-2の少なくとも一部(全てを含む)を含んでなる。一実施態様では、前記部分は、ヘプシンによるプロHGF活性化を阻害することが可能なクーニッツ(Kunitz)ドメイン(KD)配列を含有する。一実施態様では、前記クーニッツドメイン配列は、HAI-1又はHAI-1Bのクーニッツドメイン1(KD1)である。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、ヒトHAI-1の野生型KD1と少なくともおよそ70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%の配列同一性を有する変異形KD1配列を含有し、該変異形配列はヒトプロHGFのヘプシン切断を阻害する野生型KD1に少なくとも匹敵する能力を有する。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、ヒトHAI-1の野生型KD1とおよそ70%から99%の間、およそ75%から98%の間、およそ80%から97%、85%から95%の配列同一性を有する変異形KD1配列を含有するものであり、該配列はヒトプロHGFのヘプシン切断を阻害する野生型KD1に少なくとも匹敵する能力を有する。一実施態様では、前記クーニッツドメイン配列

10

20

30

40

50

は、H A I - 2 のクーニツドメインの一または両方である。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、野生型ヒトH A I - 2 の対応するクーニツドメイン(一又は複数)と少なくともおよそ70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%の配列同一性を有する変異形H A I - 2 クーニツドメイン配列を含有するものであり、該変異形配列はヒトプロH G F のヘプシン切断を阻害する野生型H A I - 2 に少なくとも匹敵する能力を有する。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、野生型ヒトH A I - 2 の対応するクーニツドメイン(一又は複数)とおよそ70%から99%の間、およそ75%から98%の間、およそ80%から97%、85%から95%の配列同一性を有する変異形H A I - 2 クーニツドメイン配列を含有するものであり、該配列はヒトプロH G F のヘプシン切断を阻害する野生型H A I - 2 に少なくとも匹敵する能力を有する。

10

【0013】

いくつかの実施態様では、本発明のアンタゴニストは、小分子、ペプチド、抗体、抗体断片、アプタマー又はそれらの組合せを含んでなる。本明細書中に記載のアンタゴニストは、本明細書に記載のようにヘプシン、肝細胞増殖因子インヒビターおよびプロH G F の相互作用の発見に基づいて、当分野で公知の技術(以下に詳述するものも含む)を用いて慣例的に得ることができる。例えば、いくつかの実施態様では、本発明のアンタゴニストは、H G F への結合についてヘプシンと競合するが、ヘプシン切断部位でプロH G F を切断する能力を有しない。いくつかの実施態様では、本発明のアンタゴニストは、ヘプシンへの結合についてプロH G F と競合する。例えば、一実施態様では、前記アンタゴニストは、プロH G F (例えばヒト)と少なくともおよそ60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%の配列類似性又は同一性を有するアミノ酸配列を含有するか、これらから成るか、又は基本的にこれらからなるものであり、実質的にヘプシンに結合できるが、ヘプシン切断部位(例えば野生型ヒトH G F R 4 9 4 - V 4 9 5 ペプチド結合を含有するP₁部位)を欠いている、及び/又はc - m e t を活性化する能力を欠いている(例えば、該H G F 鎖は変異している、H G F 鎖又はその一部などが欠けている)。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、ヘプシンに結合可能なH G F 断片を含有するか、これらから成るか、又は基本的にこれらからなるものであり、該断片が野生型H G F と比較してc - m e t を活性化する活性を減弱するように、H G F 鎖の少なくとも一部が欠けている。

20

30

【0014】

ゆえに、本発明は、実質的にヘプシンに結合できるが野生型H G F と比較してH G F / c - m e t 調節活性が減弱しているH G F 突然変異体、例えばH G F 生物学的活性(例えば細胞成長刺激活性)を有しているが減弱しているH G F 変異体又はH G F / c - m e t 活性のアンタゴニストを提供する。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、野生型(インビボ)H G F の生物活性(このような生物活性には、細胞増殖の刺激、細胞生存の促進、血管新生の促進、細胞移動の誘導/促進を含むが、これに限定されるものではない)を阻害することが可能である。一実施態様では、本発明のアンタゴニストは、減弱した細胞成長(細胞増殖、細胞生存、血管形成、細胞移動を含むがこれらに限定するものではない)促進活性を提供する。

40

いくつかの実施態様では、本発明のアンタゴニストは本明細書に記載の発明のスクリーニング方法又は同定方法によって、得られる。

一態様では、本発明のアンタゴニスト分子は、細胞障害性剤などの毒素に結合される。これらの分子/物質は、添加物/促進剤、例えば放射線及び/又は化学療法剤と組み合わせて製剤されるか、投与されてもよい。

【0015】

一態様では、本発明はヘプシンによるプロH G F 切断を亢進できる分子を提供する。該分子はヘプシンとのH A I - 1、H A I - 1 B 及び/又はH A I - 2 相互作用を阻害できる。いくつかの実施態様では、本発明のエンハンサー分子は小分子、ペプチド、抗体、抗体断片、アプタマー又はそれらの組合せであるか、これらを含んでなる。例えば、本発明の

50

エンハンサー分子は、H A I - 1、H A I - 1 B 及び / 又は H A I - 2 の断片又はその変異体を含むか、これらから成るか、又は基本的にこれらからなるものであり、該断片はヘプシンに結合できるが、プロ H G F のヘプシン切断を実質的に阻害しない。一実施態様では、前記分子は、野生型 H A I - 1、H A I - 1 B 及び / 又は H A I - 2 のヘプシンへの結合を競合して阻害できる。一実施態様では、本発明のエンハンサー分子は、ヘプシンおよび H A I - 1、H A I - 1 B 及び / 又は H A I - 2 を含有する複合体の形成を阻害する抗体である。一実施態様では、本発明のエンハンサー分子はヘプシン又はその変異体(後に定義されるものを含む)であり、ヘプシン又はその変異体は R 4 9 4 - V 4 9 5 部位でのプロ H G F 切断をもたらすことが可能である。

また、本発明は、H G F / c - m e t シグナル伝達中枢の調節不全と関係する疾患状態を調整するために有用な方法および組成物を提供する。ゆえに、一態様では、本発明は、被検体の c - m e t 活性化の調節方法であって、被検体に本発明の H G F / c - m e t モジュレーター分子(例えば、本願明細書において、記述されるような、プロ H G F のヘプシン切断を阻害するアンタゴニスト分子)が投与されることを含み、それによって、c - m e t 活性化が調整される方法を提供する。一実施態様では、前記分子は、H G F / c - m e t 活性を阻害する H G F / c - m e t アンタゴニストである。一実施態様では、前記分子は、H G F / c - m e t 活性を増やすエンハンサー分子である。一態様では、本発明は、被検体の c - m e t の活性化に関する病的状態の治療方法であって、被検体に本発明の c - m e t アンタゴニスト(例えば本明細書に記載のヘプシンによるプロ H G F 切断の任意のアンタゴニスト)が投与されることを含み、それによって、c - m e t 活性化が阻害される方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

H G F / c - m e t シグナル伝達経路は、細胞成長促進(例えば細胞増殖、細胞生存、細胞移動、細胞形態形成)および血管新生などの複数の生物学的及び生理的機能に参与する。ゆえに、他の態様では、本発明は、c - m e t 活性化細胞成長(例えば増殖及び / 又は生存)を阻害する方法であって、細胞又は組織と本発明のアンタゴニストとを反応させることを含み、それによって、c - m e t 活性化と関係する細胞増殖が阻害される方法を提供する。さらに他の態様では、本発明は、血管新生阻害方法であって、異常な血管新生と関係する病態を有する細胞、組織及び / 又は被検体に本発明のアンタゴニストが投与されることを含み、それによって、血管新生が阻害される方法を提供する。さらに他の態様では、本発明は、血管新生を亢進する方法であって、血管新生の増加により利を得る症状及び / 又は標準以下の量の血管新生と関係する症状を有する細胞、組織及び / 又は被検体に本発明のエンハンサー分子が投与されることを含み、それによって、血管新生が亢進される方法を提供する。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び / 又は血管新生関連疾患などの疾患の治療的処置及び / 又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明のアンタゴニストの使用を提供する。アンタゴニストは、抗体、抗体断片、小分子(例えば有機分子)、ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)、核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は干渉 R N A などのオリゴヌクレオチド)、アプタマー、又はそれらの組合せを含む本願明細書に記述される任意の形態のものであってもよい。

【 0 0 1 7 】

一態様では、本発明は、創傷治癒(例えば、糖尿病、外傷、など関係している損傷)などの疾患の治療的処置及び / 又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明のエンハンサー分子の使用を提供する。エンハンサー分子は、抗体、抗体断片、小分子(例えば有機分子)、ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)、核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は干渉 R N A などのオリゴヌクレオチド)、アプタマー、又はそれらの組合せを含む本願明細書に記述される任意の形態のものであってもよい。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び / 又は血管新生関連疾患(例えば創傷治癒)などの疾患の治療的処置及び / 又は予防的処

10

20

30

40

50

置をするための医薬の製造における本発明の核酸の使用を提供する。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び/又は血管新生関連疾患(例えば創傷治癒)などの疾患の治療的処置及び/又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明のベクターの使用を提供する。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び/又は血管新生関連疾患(例えば創傷治癒)などの疾患の治療的処置及び/又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明の宿主細胞の使用を提供する。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び/又は血管新生関連疾患(創傷治癒)などの疾患の治療的処置及び/又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明の製造品の使用を提供する。

10

【0018】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫性(例えば自己免疫性)疾患及び/又は血管新生関連疾患(創傷治癒)などの疾患の治療的処置及び/又は予防的処置をするための医薬の製造における本発明のキットの使用を提供する。

一態様では、本発明はc-m e t活性化細胞増殖を阻害する方法であって、細胞又は組織と有効量の本発明のアンタゴニストとを反応させることを含み、それによって、c-m e t活性化に関係する細胞増殖が阻害される方法を提供する。

一態様では、本発明は被検体のc-m e t活性化の調節不全に關与する病理的症状を治療する方法であって、被検体に有効量の本発明のアンタゴニストが投与されることを含み、それによって、該症状が治療される方法を提供する。

20

一態様では、本発明は、c-m e t又は肝細胞増殖因子又はその両方を発現する細胞の成長を阻害する方法であって、該細胞と本発明のアンタゴニストとを反応させ、それによって、該細胞の成長が阻害されることを含む方法を提供する。一実施態様では、前記細胞は、異なる細胞により発現されるHGFと(例えば、パラ分泌を介して)反応する。

一態様では、本発明は、c-m e t又は肝細胞増殖因子又はその両方を発現する細胞を含有する癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、該哺乳動物に有効量の本発明のアンタゴニストが投与されることを含み、それによって、該哺乳動物が有効に治療される方法を提供する。一実施態様では、前記細胞は、異なる細胞により発現されるHGFと(例えば、パラ分泌を介して)反応する。

【0019】

30

一態様では、本発明は、ヘプシン、c-m e t及び/又は肝細胞増殖因子の発現又はその活性の亢進が關与する細胞増殖性疾患を治療する又は予防する方法であって、そのような処置を必要とする被検体に有効量の本発明のアンタゴニストが投与されることを含み、それによって、該細胞増殖性疾患が有効に治療ないしは予防される方法を提供する。一実施態様では、前記増殖性疾患は癌である。

一態様では、本発明は、細胞の成長がヘプシン、c-m e t及び/又は肝細胞増殖因子の成長促進効果に少なくともある程度依存している細胞の成長を阻害する方法であって、該細胞と有効量の本発明のアンタゴニストとを反応させることを含み、それによって、該細胞の成長が阻害される方法を提供する。一実施態様では、前記細胞は、異なる細胞により発現されるHGFと(例えば、パラ分泌を介して)反応する。

40

一態様では、本発明は、腫瘍の成長がヘプシン、c-m e t及び/又は肝細胞増殖因子の成長促進効果に少なくともある程度依存している哺乳動物の腫瘍を治療的に処置する方法であって、該細胞と有効量の本発明のアンタゴニストとを反応させることを含み、それによって、該腫瘍が有効に治療される方法を提供する。一実施態様では、前記細胞は、異なる細胞により発現されるHGFと(例えば、パラ分泌を介して)反応する。

【0020】

本発明の方法は、任意の好適な病理学的状態、例えばヘプシン及び/又はHGF/c-m e tシグナル伝達経路の調節不全にかかわる細胞及び/又は組織に効果を示すために用いられうる。一実施態様では、本発明の方法で標的とされる細胞は癌細胞である。例えば、癌細胞は、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、乳頭カルシノーマ細胞(例えば、甲

50

状腺の癌細胞)、大腸癌細胞、膵臓癌細胞、卵巣癌細胞、頸部癌細胞、中枢神経系癌細胞、前立腺癌細胞、骨原性肉種細胞、腎臓カルシノーマ細胞、肝細胞癌細胞、膀胱癌細胞、胃カルシノーマ細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞、メラノーマ細胞および白血病細胞からなる群から選択されるものでありうる。一実施態様では、本発明の方法で標的とされる細胞は過剰増殖性細胞及び/又は過形成細胞である。一実施態様では、本発明の方法で標的とされる細胞は形成異常細胞である。さらに他の実施態様では、本発明の方法で標的とされる細胞は転移性細胞である。

本発明の方法は、さらに後処理工程を含んでもよい。例えば、一実施態様では、方法は、標的とされる細胞及び/又は組織(例えば癌細胞)が放射線治療又は化学療法剤にさらされる工程を更に含む。

10

本願明細書において、記述されるように、c-met活性化は、その調節不全によって、数多くの病的状態が引き起こされる、重要な生物学的工程である。したがって、本発明の方法の一実施態様では、標的とされる細胞(例えば癌細胞)は、同じ組織起源の正常細胞と比較してc-metの活性が亢進されているものである。一実施態様では、本発明の方法によって、標的とされる細胞の死が引き起こされる。例えば、本発明のアンタゴニストと反応すると、細胞死となるc-met経路を介するシグナルに対して細胞が不活性となりうる。

【0021】

例えば、HGF(c-metの同系リガンド)及び/又はc-met自体の過剰発現を含め、多くの細胞性変化からc-met活性化の調節不全が生じうる。したがって、いくつかの実施態様では、本発明の方法は、c-met又は肝細胞増殖因子又はその両方が同じ組織起源の正常細胞と比較して、前記細胞(例えば癌細胞)によって、より多く発現される細胞を標的とすることを含んでなる。c-met発現細胞は、様々な起源からのHGFによって、すなわち自己分泌又はパラ分泌の方法で調節されうる。例えば、本発明の方法の一実施態様では、標的とされる細胞は、異なる細胞において、発現される肝細胞増殖因子と(例えば、パラ分泌効果を介して)反応する/結合する。前記異なる細胞は、同じ又は異なる組織起源のものであってもよい。一実施態様では、標的とされる細胞は、標的細胞自体により発現されるHGFと(例えば、自己分泌効果/ループを介して)反応する/結合している。

20

一態様では、本発明は、被検体に本発明のエンハンサー分子を投与することを含んでなる方法を提供する。この方法により治療される症状には、被検体のHGF/c-met活性が関与する血管新生の異常/望ましくない低生理的レベルと関係する任意の病的状態が、含まれる。このような症状の例として、創傷治癒、心肥大、心筋梗塞、肢乏血、末梢性動脈系疾患などがあるが、これに限定されるものではない。一態様では、本発明は、本発明の一つ以上のアンタゴニスト又はエンハンサーと担体を含有する組成物を提供する。一実施態様では、担体は薬学的に受容可能である。

30

【0022】

一態様では、本発明は、本発明のアンタゴニスト又はエンハンサー分子をコードする核酸を提供する。一実施態様では、本発明の核酸は、ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)であるか、ないしはこれを含んでなるアンタゴニスト又はエンハンサー分子をコードする。

40

一実施態様では、本発明の核酸は、抗体又はその断片であるか、ないしはこれを含んでなるアンタゴニスト又はエンハンサー分子をコードする。

一態様では、本発明は、本発明の核酸を含んでなるベクターを提供する。

一態様では、本発明は、本発明の核酸又はベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。ベクターは、例えば発現ベクターなどの組換えベクターなど任意の種類のものでよい。任意の様々な宿主細胞が用いられうる。一実施態様では、宿主細胞は原核細胞、例えば大腸菌である。一実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの哺乳類の細胞である。

一態様では、本発明は、本発明のアンタゴニスト又はエンハンサー分子の作製方法を提供する。例えば、本発明は、抗体(又はその断片)であるか、ないしは抗体(又はその断片)

50

を含有するアンタゴニストの作製方法であって、該抗体(又はその断片)をコードする本発明の組み換えベクターを好適な宿主細胞で発現させ、該抗体を回収することを含む方法を提供する。他の例では、本発明は、ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)であるか、ないしはポリペプチド(例えばオリゴペプチド)を含有するアンタゴニスト又はエンハンサー分子の作製方法であって、該ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)をコードする本発明の組み換えベクターを好適な宿主細胞で発現させ、該ポリペプチド(例えばオリゴペプチド)を回収することを含む方法を提供する。

【0023】

一態様では、本発明は、容器と、容器に具備される組成物を含んでなる製造品であって、該組成物が本発明の一つ以上のアンタゴニスト又はエンハンサー分子を含有するものである製造品を提供する。一実施態様では、組成物は本発明の核酸を含有する。一実施態様では、アンタゴニスト又はエンハンサー分子を含有してなる組成物は、いくつかの実施態様では、薬学的に受容可能である担体をさらに含有する。一実施態様では、本発明の製造品は、被検体に組成物(例えばアンタゴニスト又はエンハンサー分子)を投与するための指示書を更に含む。

10

一態様では、本発明は、本発明の一つ以上のアンタゴニスト又はエンハンサー分子を含有する組成物を具備する第一容器と、バッファを具備する第二容器を含むキットを提供する。一実施態様では、バッファは薬学的に受容可能である。一実施態様では、アンタゴニスト又はエンハンサー分子を含有する組成物は、いくつかの実施態様では、薬学的に受容可能である担体をさらに含有する。一実施態様では、キットは、被検体に組成物(例えばアンタゴニスト又はエンハンサー分子)を投与するための指示書を更に含む。

20

【0024】

(発明の実施の形態)

本発明は、HGF/c-metシグナル伝達経路のモジュレータを含む方法、組成物、キット及び製造品、並びにそのモジュレータの使用法を提供するものである。

これら方法、組成物、キット及び製造品の詳細は本明細書中に示される。

【0025】

典型的技術

本発明の実施は、特に明記しない限り、当業者の技術範囲内の分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を使用して行う。このような技術は、例えば以下のような文献に完全に明記されている。「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第2版(Sambrookら, 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait, 編, 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, 編, 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら, 編, 1987, and periodic updates); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullisら, 編, 1994); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988); 「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas 等, 2001)。

30

【0026】

定義

本明細書にて用いる「ヘプシン」なる用語は、天然配列のポリペプチド、天然配列のポリペプチドのポリペプチド変異体及びその断片、及び野生型ヘプシンと類似の様式でプロHGFを切断することができるポリペプチド変異体(本明細書中でさらに定義される)を包含する。本明細書中で記載のヘプシンは、ヒト組織種類ないしは他の供給源などの様々な供給源から単離するか、組み換え法ないしは合成法によって調整されたものでもよい。また、「ヘプシン」、「ヘプシンポリペプチド」、「ヘプシン酵素」及び「ヘプシタンパク質」なる用語は、本明細書中で記載のようなヘプシンポリペプチドの変異体を含む。

40

「天然配列ヘプシンポリペプチド」には、天然由来のヘプシンポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。一実施形態では、天然配列ヘプシンポリペプチドは、配列番号1(図7参照)のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、天

50

然配列ヘブシンポリペプチドは、配列番号2(図8参照)のアミノ酸配列を含む。このような天然配列ヘブシンポリペプチドは、天然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列ヘブシンポリペプチド」という用語には、特に、特定のヘブシンポリペプチドの天然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの天然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。

【0027】

「ヘブシンポリペプチド変異体」又はその変異体とは、ヘブシンポリペプチド、一般的には、ここに開示するような天然配列のヘブシンポリペプチド配列のいずれかと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なヘブシンポリペプチドを意味する。このようなヘブシンポリペプチド変異体には、例えば、天然アミノ酸配列のN末端又はC末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたヘブシンポリペプチドが含まれる。通常、ヘブシンポリペプチド変異体は、ここに開示する天然配列ヘブシンポリペプチド配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、ヘブシン変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、ヘブシン変異体ポリペプチドは、天然ヘブシンポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然のヘブシンポリペプチド配列に比較して2、3、4、5、6、7、8、9、又は10以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【0028】

ペプチド又はポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のペプチド又はポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、米国特許第6828146号に記載のような配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なDNAセグメントが結合されうる円形の二重鎖DNAループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に

10

20

30

40

50

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。

【0029】

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)、キレート剤を含むもの(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)、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。さらに、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支持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アミン又は有機キャップ基部分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。さらに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、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アリル、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、セドヘブツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0030】

ここで使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に一本鎖であり、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。

本願明細書において用いられるように、「肝細胞増殖因子」又は「HGF」なる用語は

10

20

30

40

50

、特別に又は文脈上別途示されない限り、HGF/c-metシグナル伝達過程を生じる条件下においてこの経路を活性化しうる任意の(天然/天然に生じるもの又は合成のものいずれにせよ)天然の又は変異形のHGFポリペプチドを指す。「野生型HGF」なる用語は、一般に、天然に生じるHGFタンパク質のアミノ酸配列を含有してなるポリペプチドを指す。「野生型HGF配列」なる用語は、一般に、天然に生じるHGFにおいてみられるアミノ酸配列を指す。

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われ、モノクローナル抗体(例えば完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、単価抗体、多価抗体、多特異性抗体(例えば所望の生物学的活性を示す限りの二重特異性抗体)及び本明細書で記載される抗体断片が含まれる。抗体はヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟したものであり得る。

10

【0031】

「抗体断片」は、無傷の抗体の部分のみを含有するものであり、該部分は完全な抗体中に存在する場合、その部分に通常伴う機能の少なくとも一、好ましくはほとんど又はすべてを保持する。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有しているために抗原への結合能を保持する。他の実施態様では、抗体断片、例えばFc領域を含有するものは、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能及び補体結合などの、完全抗体中に存在する場合のFc領域に通常関する、少なくとも一の生物学的機能を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体に実質的に類似のインビボ半減期を有する一価抗体である。例えばそのような抗体断片は、該断片にインビボ安定性を与えることができるFc配列を結合した抗原結合アームを含んでなる。

20

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原に対している。さらに、典型的に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

【0032】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物学的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。

30

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた最小配列を含むキメラ抗体である。多くの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。また、以下の概説文献及びここに挙げる引用文献も参照のこと: Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23

40

50

:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

【 0 0 3 3 】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を有するもの、及び/又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用して、つくられたものである。この定義におけるヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、*Bio/Technology*, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDRおよび/またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier他、*Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton他、*J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson他、*J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、*J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)に開示されている。

【 0 0 3 4 】

「ブロック抗体」又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか、減弱するものである。好適なブロック抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にないしは完全に阻害する。

本明細書中で用いられる「アゴニスト抗体」は、対象のポリペプチドの機能的な活性の少なくとも一を擬態する抗体である。

「疾病」は、本発明の物質/分子又は方法を用いた治療によって利益を得る任意の症状である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾病又は疾患を含む。限定的なものではなく、ここで治療する疾患の例には、悪性及び良性の腫瘍; 非白血病性及びリンパ球性悪性腫瘍; 神経系、神経膠系、星状性、視床下部系及び他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性及び胚盤胞性疾患; 及び炎症性、免疫性及び他の血管形成性関連疾患が含まれる。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」なる用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

【 0 0 3 5 】

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性的にかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

「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を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸管癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、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、肝臓性癌、並びに様々な頭頸部の癌が含まれる。

【 0 0 3 6 】

ここで使用されるところの「治療」は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるために用いられる。

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。

本発明の物質／分子の「治療的有效量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び個体の体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの能力のような因子に従って変わりうる。また、治療的有效量は物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回るものである。「予防的有效量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有效量は治療的有效量よりも少ないであろう。

【0037】

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指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位体）、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルピシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0038】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。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(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インブスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチロロメラミン(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（特にプラタシン及びプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール（ドロナビノール、MARINOL(登録商標)）；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopolectin)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；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チロホスファミド(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(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、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 1I及びカリケアマイシン I1(例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アク

10

20

30

40

50

チノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチ
 ノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィ
 リン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトル
 ビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ド
 キソルビシン(モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロ
 リノ-ドキシソルビシン及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン
 、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイト
 マイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オ
 リボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピ
 ユーロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(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)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フ
 ルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレ
 キセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリン
 アナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チ
 オグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、
 6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキ
 シフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロ
 ゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオ
 スタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；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)；アセグラトン；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)；
 ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamin
 e)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornit
 hine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(eto
 glucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；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(a
 nsamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamo
 l)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシ
 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)；テニューアゾン酸(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及びアンゲイジ
 ン(anguidine))；ウレタン；ピンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標)
)；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトプロニトール；ミトラクトール
 (mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「
 A r a - C」)；チオテパ；タキソイド類、例えばT A X O L(登録商標)パクリタキセル
 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、A B R A X A N ETM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 Pa
 rtners, Schaumburg, Illinois)、及びT A X O T E R E(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)
 (G E M Z A R(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；ピンブラスチン(V E L B A N
 (登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P - 1 6)；イホスファミド；マイトキサント
 ロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボピン(leuc
 ovovin)；ピノレルピン(N A V E L B I N E(登録商標))；ノバントロン(novantrone)
 ；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R F S 2 0 0 0 ；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；

10

20

30

40

50

レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(capecitabine) (XELODA (登録商標)；上述したもののいずれか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2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、及びプレドニゾン併用療法の略称であるC H O P、及び5-FU及びロイコボビン(leucovorin)とオキサリプラチン (ELOXATIN™) を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

【 0 0 3 9 】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節物質 (S E R M) を含み、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 (raloxifene)、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン (onapristone)、及び F A R E S T O N (登録商標) トレミフェン；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤 (ERD)；卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、例えばLUPRON (登録商標) 及びELIGARD (登録商標) 酢酸ロイプロリド等の黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン (tripterelin)；その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド (flutamide)、ニルタミド (nilutamide)、ピカルタミド；並びに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、M E G A S E (登録商標) 酢酸メゲストロール、A R O M A S I N (登録商標) エキセメスタン、フォルメスタニー (formestane)、ファドロゾール、R I V I S O R (登録商標) ポロゾール、F E M A R A (登録商標) レトロゾール、及びA R I M I D E X (登録商標) アナストロゾールである。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロン酸 (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) ゴレドロン酸/ゴレドロン酸、FOSAMAX (登録商標) アレンドロン酸、ARE DIA (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ビン (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、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C - 、R a f、及びH-R a s、及び上皮成長因子レセプター (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A L L O V E C T I N (登録商標) ワクチン、L E U V E C T I N (登録商標) ワクチン、及びV A X I D (登録商標) ワクチン；L U R T O T E C A N (登録商標) トポイソメラーゼ1阻害剤；A B A R E L I X (登録商標) r m R H；ラパチニブ (lapatinib ditosylate) (GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤) 及び上記のものいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【 0 0 4 0 】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、H G F / c - m e t 活性化に依存する細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期でH G F / c - m e t 依存性の細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を (S期以外の位置で) 阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス (ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「

10

20

30

40

50

Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、ブリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化する。

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

【0041】

II. 本発明の組成物及び方法

A. 抗体

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

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原(特に、合成ペプチドが用いられる場合)を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導體形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、 $SOCl_2$ 、又はR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=NRを用いて結合させることができる。

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

【0042】

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

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

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞(融

10

20

30

40

50

合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(HAT培地)。

【0043】

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

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

【0044】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスカッチャード分析によって測定することができる。

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

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

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

【0045】

更なる実施形態では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することが

できる。Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991)及び Marks等, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM 範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, *Nuc.Acids.Res.*, 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

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

【0046】

3. ヒト及びヒト化抗体

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

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者 [Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0047】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びHAMMA反応(ヒト抗-マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可

変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体のために受け入れる(Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

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

【0048】

ヒト化抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤(類)と結合していてもよい抗体断片、例えばFabであってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷IgG1抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993); Ruggeman等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm)); 同5545807号; 及び国際公開第97/17852号を参照されたい。

【0049】

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

10

20

30

40

50

パートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

【0050】

4. 抗体断片

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

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むFab及びF(ab')₂が、米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施形態では、選択する抗体は一本鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscFvは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0051】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、本明細書に記載のヘプシン、HGF及び/又はヘプシン:HGF複合体の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のポリペプチドに対する結合部位とそのものの結合部位とが結合しうる。あるいは、抗体は、ヘプシン及び/又はHGFを発現する細胞及び/又はヘプシン及び/又はHGFに結合する細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばCD3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はヘプシン、HGF及び/又はヘプシン:HGF複合体を発現する及び/又はヘプシン、HGF及び/又はヘプシン:HGF複合体に結合する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はポリペプチド結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗-ErbB2/抗-FcRIII抗

10

20

30

40

50

体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗-ErbB2/抗-FcRI抗体が開示されている。二重特異性抗-ErbB2/Fc抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5821337号は、二重特異性抗-ErbB2/抗-CD3抗体を教示するものである。

【0052】

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

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含むIg重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_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トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0053】

この手法の好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 1-7:210 (1986)を参照されたい。

米国特許第5731168号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの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。

【0054】

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合される。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲットングするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適

な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')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、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再変換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0055】

最近の進歩により、大腸菌からのF a b'-S H断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インピトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びE r b B 2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーによりV_LにV_Hを結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖F v (s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

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

【0056】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びH I V感染の治療のために[国際公開第91/00360; 国際公開第92/200373; 欧州特許第03089号]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インピトロで調製できると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

【0057】

7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位

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

【0058】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性(ADCC)及び/又は補体依存細胞障害性(CDC)を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0059】

9. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫コンジュゲート、又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に関する。

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4,975,278号)、論理的に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ら., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,

10

20

30

40

50

」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinche
 raら. (ed.s), 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ら., (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、ドキシソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる
 (Rowlandら., (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ら(2000) Jour. of the Nat. Cancer
 Inst. 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-
 1028; Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 139121
 3; Liuら., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン 10
 (Lodeら (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinmanら (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。

【 0 0 6 0 】

ゼバリン(ZEVALIN) (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab 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ら (20 20
 00) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wisemanら (2002) Blood 99(12):4336-42; W
 itzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 2
 0(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有す
 るが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイ
 シンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(M
 YLOTARG) (登録商標) (ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pha
 rmaceuticals) 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(Dru
 gs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第55850
 89号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001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 30
 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(Can
 tuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、Canaagを発現する癌、例として大腸、膵
 臓、胃などの治療用に第II相試験へと進んでいる。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 I
 nc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。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cBR96(癌細胞上のルイス
 Yに特異的)及びcAC10(血液系悪性腫瘍上のCD30に特異的)(Doroninaら (200
 3) 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 40
 ある。

【 0 0 6 1 】

このような免疫コンジュゲート(免疫コンジュゲート)の生成に有用な化学治療薬を上
 に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフ
 テリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖
 、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurite
 s 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(Ph
 ytolaca 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)、 50

ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコセセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vittita等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

10

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、トリコセセン(trichotheine)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。

【0062】

20

メイタンシン及びメイタンシノイド

一実施態様では、本発明の抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

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

30

【0063】

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。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

40

50

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。

【0064】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)

抗体-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。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、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChar i等、Cancer Research, 52:127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0065】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-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。特に好ましいカップリング剤には、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(SPD P)(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。好ましい実施形態において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0066】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖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、

10

20

30

40

50

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 、P S A G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Q F Aである。カリケアマイシン及びQ F A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。

【0067】

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、B C N U、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にL L - E 3 3 2 8 8複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アプリン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(P A P I、P A P I I及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクラーゼ又はD N A エンドヌクラーゼ、例えばデオキシリボヌクラーゼ; D N A 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。

【0068】

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、A t 211 、I 131 、I 125 、Y 90 、R e 186 、R e 188 、S m 153 、B i 212 、P 32 、P b 212 及びL u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 c $99m$ 又はI 123 、又は核磁気共鳴(N M R)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えばt c $99m$ 又はI 123 、R e 186 、R e 188 及びI n 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。

【0069】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)

10

20

30

40

50

、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

10

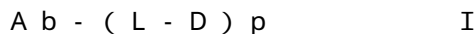
本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyI-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook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

【0070】

20

抗体薬剤コンジュゲートの調製

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



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末端アミノ基、(ii)側鎖アミノ基、例えばリシン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、および(iv)抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およ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、ハロギ酸および酸ハロゲン化物；(ii)アルキルおよ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、カルボキシルおよびマレイミド群、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。

30

40

【0071】

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を用いて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ノ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

50

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(アルデヒドおよびケトン)基が生じる。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 & Stroh, (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。

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、リンカー部分およ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およびアリールヒドラジド基：(i)活性エステル(例えばNHSEエステル、HOBTエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物)；(ii)アルキルおよ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、カルボキシルおよびマレイミド基、が含まれる。

【0072】

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。

【0073】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

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

【0074】

B. 結合オリゴペプチド

本発明の結合オリゴペプチドはここで記載される様なヘブシン、HGF及び/又はヘブシン:HGF複合体に、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25

10

20

30

40

50

、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等、in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等、J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等、J. Immunol., 140:611-616 (1988)、Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【0075】

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

【0076】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム（WO95/34683；米国特許第5627024号）、T4ファージディスプレイシステム（Ren等 Gene, 215:439 (1998)；Zhu等Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998)；Jiang等, Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997)；Ren等, Gene, 195(2):303-311 (1997)；Ren, Protein Sci., 5:1833 (1996)；Efimov等, Virus Genes, 10:173 (1995)及びT7ファージディスプレイシステム（Smith及びScott, Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993)；米国特許第5766905号）も知られている。

【0077】

10

20

30

40

50

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり (WO 98 / 1 4 2 7 7) 及びファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用 (WO 98 / 2 0 1 6 9 ; WO 98 / 2 0 1 5 9) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO 98 / 2 0 0 3 6) を分析及び制御するために使用されている。WO 97 / 3 5 1 9 6 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 97 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) タンパク質 A の親和性タグとしての使用も報告されている (Li 等, (1998) *Mol Biotech.*, 9:187)。WO 97 / 4 7 3 1 4 は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法は国際公開公報 97 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5 4 9 8 5 3 8 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、及び国際公開公報 98 / 1 5 8 3 3 に記載されている。

10

20

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

【 0 0 7 8 】

C . 結合小分子

結合小分子とは、好ましくは、ヘプシン、HGF 及び / 又はヘプシン : HGF 複合体に、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。結合有機小分子は既知の方法 (例えば PCT 公開第 WO 0 0 / 0 0 8 2 3 及び WO 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照) を用いて同定され、化学的に合成されうる。結合有機小分子は通常、約 2 0 0 0 ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約 1 5 0 0、7 5 0、5 0 0、2 5 0 又は 2 0 0 ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なヘプシン、HGF 及び / 又はヘプシン : HGF 複合体に、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機小分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機小分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する (例えば PCT 公開第 WO 0 0 / 0 0 8 2 3 及び WO 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照)。結合有機小分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N 置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

30

40

【 0 0 7 9 】

D . 所望の特性を有する抗体、結合オリゴペプチド及び結合小分子のスクリーニング抗体、オリゴペプチド及び小分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するよう

50

な、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は他の小分子をさらに選択することができる。

本発明の抗体、オリゴペプチド又は他の小分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はそれぞれの遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでヘプシン及び/又はプロHGFを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株、及びヘプシン及び/又はHGFポリペプチド形質移入細胞は、数日間（例えば、2 - 7）、種々の濃度の本発明のモノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の小分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はMTTで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗体、結合オリゴペプチド又は結合小分子の存在又は非存在下で処理した細胞の³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、DNAへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。腫瘍細胞は、ヘプシン及び/又はプロHGFポリペプチドを過剰発現するものとして行うことができる。抗体、結合オリゴペプチド又は結合有機小分子は、ある実施形態では約0.5から30 µg/mlの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約25 - 100%、より好ましくは約30 - 100%、そしてさらにより好ましくは約50 - 100%又は70 - 100%のヘプシン及び/又はプロHGFを発現する腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30 µg/ml又は0.5 nMから200 nMの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後1 - 10日で確かめられる。約1 µg/kgから約100 mg/kg体重での抗体の投与が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

【0080】

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

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

10

20

30

40

50

と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【 0 0 8 1 】

E . 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法 (A D E P T)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ (例えばペプチジル化学療法剤、国際公開 8 1 / 0 1 1 4 5 を参照) を活性化酵素へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、A D E P T において使用することができる。例えば国際公開 8 8 / 0 7 3 7 8 及び米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号を参照されたい。

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

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

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

【 0 0 8 2 】

F . 抗体変異体

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

ここに記載した抗体の変異は、例えば、米国特許第 5 3 6 4 9 3 4 号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗体の一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗体の配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミ

ノ酸置換の結果であるとする事ができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を、親配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【0083】

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

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

【0084】

特定の実施形態では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目でこの表に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、この表に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

10

20

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|---------|------------------------------------|--------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; 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 0 8 5 】

抗体又はポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の電荷又は分子疎水性、又は(c) 側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。アミノ酸は、それらの側鎖特性の類似性に従ってグループ分けすることができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp.73-75, Wo 40
rth Publisher, New York (1975)) :

(1) 無極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 無電荷極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性 : Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性 : Lys (K), Arg (R), His(H)

或いは、共通の側鎖特性に基づいて天然に発生する残基をグループ分けすることができる :

(1) 疎水性 : ノルロイシン、Met, Ala, Val, Leu, Ile;

50

- (2) 中性親水性： Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) 酸性： Asp, Glu;
- (4) 塩基性： His, Lys, Arg;
- (5) 鎖の方向に影響する残基： Gly, Pro;
- (6) 芳香性： Trp, Tyr, Phe

【 0 0 8 6 】

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

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

【 0 0 8 7 】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

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

【 0 0 8 8 】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位（例えば、6 - 7部位）を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原ポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によ

10

20

30

40

50

って調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、そして抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘発による、天然ソースからの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）又は調製が含まれる。

【0089】

G. 抗体及びポリペプチドの修飾

抗体及びポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗体又はポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗体又はポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗体又はポリペプチドを、抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

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

【0090】

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

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

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

【0091】

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

抗体又はポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

抗体又はポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)に、コロイド状薬物送達系(例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

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

【0092】

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

それに換わる実施形態では、キメラ分子は抗体又はポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えて抗体又はポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH₂及びCH₃、又

はヒンジ、 CH_1 、 CH_2 及び CH_3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

【0093】

H. 抗体及びポリペプチドの調製

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

10

【0094】

1. 抗体又はポリペプチドをコードするDNAの単離

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

20

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

30

【0095】

cDNAライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識ATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら, に示されている。

40

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

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

50

られる。

【 0 0 9 6 】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

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

10

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

20

【 0 0 9 7 】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31446);大腸菌X1776(ATCC31537);大腸菌株W3110(ATCC27325)及びK5772(ATCC53635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌(E. coli)、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)(例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2;完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4;完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^rを有する大腸菌W3110株27C7(ATCC 55,244);完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)16

30

40

50

9 degP ompT rbs7 ilvG kan^rを有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0098】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤（例えば、毒素）と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が不要な場合に、細菌で産生させることができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号（Carter等）、米国特許第5789199号（Joly等）、及び翻訳開始部位（TIR）及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第5840523号（Simmons等）を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテインA又はGカラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにして行うことができる。

【0099】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗体又はポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開の欧州特許第139383号)；クリュイベロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号；Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvincourt等, *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリス(*K. fragilis*) (ATCC12424)、クリュイベロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC16045)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ(*K. wickerhamii*) (ATCC24178)、クリュイベロミセス・ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC56500)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC36906；Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、クリュイベロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクリュイベロミセス・マルキシアナス(*K. marxianus*)；ヤロウイア(*yarrowia*) (欧州特許第402226号)；ピシア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号；Sreekrishna等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号)；アカパンカビ (Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第394538号)；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357)；及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]；Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]；Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピシア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【 0 1 0 0 】

グリコシル化抗体又はポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエ S 2 及びヨトウ (spodoptera) S f 9 等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ (Spodoptera frugiperda) (幼虫 (caterpillar))、ネッタイシマカ (蚊)、ヒトスジシマカ (蚊)、キイロショウジョウバエ (ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフェクション用のウイルス株、例えばオートグラフィア・カルフォルニカ (Autographa californica) NPV の L - 1 変異株、カイコ NPV の B m - 5 株が公に入手でき、このようなウイルスは、本発明に係るウイルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

10

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養 (組織培養) した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV 40 (COS - 7, ATCC CRL 1651) で形質転換させたサル腎 CV 1 細胞株; ヒト胚芽腎細胞株 (293 又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された 293 細胞, Graham 等, J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); マウスセルトリ細胞 (TM 4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞 (CV 1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎細胞 (VERO - 76, ATCC CRL - 1587); ヒト頸管腫瘍細胞 (HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34); パッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W 138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G 2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 細胞 (Mather 等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC 5 細胞; FS 4 細胞; 及びヒト肝臓癌細胞 (Hep G 2) である。

20

宿主細胞は、抗体又はポリペプチド生成のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【 0 1 0 1 】

30

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗体又はポリペプチドをコードする核酸 (例えば、cDNA 又はゲノム DNA) は、クローニング (DNA の増幅) 又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNA はこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

40

ポリペプチドは直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドの N - 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗体又はポリペプチド - コード化 DNA の一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp あるいは熱安定性エンテロトキシン II リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー (酵母菌属 (Saccharomyces) 及びクリュイペロミセス (Kluyveromyces) 因子リーダー) を含み、後者は米国特許第 5, 010, 182 号に記

50

載されている)、又は酸ホスホターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C.albicans*) グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0102】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

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

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、抗体又はポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在する

【0103】

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

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

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

のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。

【0104】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体又はポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、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、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

10

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

20

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

組換え脊椎動物細胞培養での抗体又はポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第117060号; 及び欧州特許第117058号に記載されている。

30

【0105】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗体又はポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham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; 又は米国特許再発行第30985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明

40

50

らかであろう。

【 0 1 0 6 】

5 . 遺伝子増幅 / 発現の検出

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

10

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

【 0 1 0 7 】

20

6 . 抗体及びポリペプチドの精製

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

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

30

【 0 1 0 8 】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

40

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー

50

、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が好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark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: 15671575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

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

【0109】

I. 製薬製剤

本発明に係る抗体、結合オリゴペプチド、結合有機又は無機小分子及び/又は本発明で用いられるポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th 版, Osol, A. 編. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液; アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤; 防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド; ヘキサメトニウムクロライド; ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド; フェノール、ブチル又はベンジルアルコール; メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; 及びm-クレゾールなど); 低分子量(約10残基未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸; 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等のキレート剤; トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー; スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖; ポリソルベート等の界面活性剤; ナトリウムなどの塩形成対イオン; 金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体); 及び/又はトウイーン(TWEEN)(登録商標)、プルロニクス(PLURONICS)(登録商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5 - 200 mg/mlの間、好ましくは10 - 100 mg/mlの間の濃度の抗体で構成される。

【0110】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗体、結合オリゴペプチド又は結合有機又は無機小分子に加えて、1つの製剤に、例えば、同じポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、更に化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗-ホルモン剤、及び/又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図す

る目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-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、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

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

【0111】

J. 抗体、結合オリゴペプチド及び結合有機/無機小分子を用いる治療

癌におけるポリペプチド(ヘプシン及び/又はHGF)発現を定量するために、種々の検出アッセイが利用可能である。一実施形態では、ポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学(IHC)によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイへ供してもよいし、次のようなポリペプチド染色強度基準と合致させてもよい:

スコア0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される。

スコア1+ - わずかに/弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

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

スコア3+ - 中程度から強い完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を越えて観察される。

ポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、ポリペプチドが過剰発現していないことを特徴としうるものであるのに対し、2+又は3+スコアの腫瘍はポリペプチドが過剰発現していることを特徴としうる。

【0112】

別に、又は付加的に、FISHアッセイ、例えばINFORM(登録商標)(Ventana, Arizonaから販売)又はPATHVISION(登録商標)(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍におけるポリペプチド過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

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

上に記載したように、本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機小分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、ポリペプチドを発現している癌の染色にとって有用である(例えば、ラジオイメージングで)。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からポリペプチド発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機小分子は、また、例えば、ELISA又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【 0 1 1 3 】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機小分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるポリペプチド発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射線標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び/又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子による治療は、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パルクタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した一又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を投与することができる。特に、パルクタキセル及び改変誘導体との組合せ治療が考えられる(例えば、欧州特許第0600517号を参照のこと)。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施形態では、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は化学療法剤、例えばパルクタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(PDR)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

10

20

【 0 1 1 4 】

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

30

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

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

40

【 0 1 1 5 】

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

他の実施形態では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗体(一又は複数)、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と一又は複数の化学療法剤又は成長阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン類(hydroxyureataxanes)(例えばパルクタ

50

キセル及びドキシセタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。

抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェン等の抗-エストロゲン化合物；抗-プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第616812号を参照)；又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性にな

10

【0116】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療疾患に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び/又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重1kg当たり約1µgないし50mg(例えば0.1-15mg/kg/用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約4mg/kgの初期負荷量、続いて1週間に約2mg/kgの維持用量の抗体を投与することからなってもよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1µg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

20

30

【0117】

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

40

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4892538号及び第5283187号参照)。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェ

50

クション、細胞融合、D E A E -デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソピボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0118】

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

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

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

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【0119】

本抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、哺乳動物におけるヘプシン及び/又はH G Fを発現する癌の治療、或いは一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。本発明の方法では、癌に関連する転移性の腫瘍の徴候を治療及び/又は緩和するのにアンタゴニストを用いる。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子アンタゴニストは、哺乳動物において該ポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。一実施形態では、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、インピボ又はインピトロでポリペプチドに結合し、ポリペプチドを発現するか及び/又は、ポリペプチドに応答する腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗体に付与することができる。一部の実施形態では、この細胞障害剤又は成長阻害剤は、小分子である。一部の実施形態では、毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導體が使用される。

【0120】

本発明は、本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と担体を含有する組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗体を含有し得る。さらなる実施形態においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む成長阻害剤又は細胞障害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を組合せて含有することもできる。また本発明は、本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と担体を含有する製剤も提供する。一実施形態では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

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

本発明は、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を治療的有效量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、ポリペプチド(ヘプシン及び/又はHGF)を発現する細胞及び/又はポリペプチド(ヘプシン及び/又はHGF)に応答する細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

10

本発明は少なくとも一つの抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有するキットは、例えば細胞殺傷アッセイ、細胞からのポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、ポリペプチドの単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有することができる。インビトロにおけるポリペプチドの検出及び定量化、例えばELISA又はウェスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【0121】

20

K. 製造品及びキット

本発明の他の実施形態は、非ホジキンリンパ腫等のポリペプチド(ヘプシン及び/又はHGF)発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(BWFI)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

30

種々の目的、例えばポリペプチド発現又は細胞殺傷アッセイ、細胞からのポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。ポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むことが可能である。インビトロにおけるポリペプチドの検出及び定量化、例えばELISA又はウェスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも一つの本発明の抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

40

【0122】

L. ポリペプチド及びポリペプチドコード核酸 - 特定の形態及び用途

ポリペプチドをコードする核酸配列(又はそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピング

50

において、及びアンチセンスRNA及びDNAプローブの生成において種々の用途を有している。また、ポリペプチドコード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるポリペプチドの調製に有用であり、これらポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗体の調製において用途を見出し得る。

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

【0123】

ポリペプチドコード核酸の他の有用な断片には、標的ポリペプチドmRNA（センス）又はポリペプチドDNA（アンチセンス）配列と結合できる一本鎖核酸配列（RNA又はDNAのいずれか）を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書中に記載のヘプシン、プロHGF又は結合断片をコードするDNAのコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen（Cancer Res. 48:2659, 1988）及びvan der Krol等（BioTechniques 6:958, 1988）に記載されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それらタンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格（又は他の糖結合、国際公開91/06629に記載のもの等）を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが（つまり、酵素分解に耐えうるが）、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【0124】

アンチセンス結合の好適な遺伝子内部位には、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始/開始コドン（5'-AUG/5'-ATG）又は終結/停止コドン（5'-UAA、5'-UAG及び5'-UGA/5'-TAA、5'-TAG及び5'-TGA）を含む領域が含まれる。これらの領域は翻訳開始又は終結コドンから何れかの方向（つまり5'又は3'）に約25から約50の近接ヌクレオチドを包含するmRNA又は遺伝子の一部を意味する。アンチセンス結合のための他の好適な領域には、イントロン；エキソン；イントロン-エキソン接合部；翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域であるオープン

リーディングフレーム (ORF) 又は「コード領域」; 5'-5'トリホスフェート結合を介して mRNA の 5'-最末端残基に結合した N7-メチル化グアノシン残基を含み、5'キャップ構造自体と同様にキャップに隣接する最初の 50ヌクレオチドを含む mRNA の 5'キャップ; 翻訳開始コドンから 5'方向の mRNA の部分で、mRNA 又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳開始コドンと 5'キャップ部位の間のヌクレオチドを含む 5'の未翻訳領域 (5'UTR); 及び翻訳終結コドンから 3'方向の mRNA の部分で、mRNA 又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの 3'末端と翻訳停止コドンの間のヌクレオチドを含む、3'未翻訳領域 (3'UTR) が含まれる。

【0125】

ポリペプチドの発現を阻害するのに有用な好適なアンチセンス化合物の特定の例には、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには骨格にリン原子を保持しているものと骨格にリン原子を有していないものが含まれる。この明細書の目的のために、また当該分野でしばしば引用されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドはまたオリゴヌクレオシドであると考えることができる。好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えばホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネートで、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むもの、ホスフィネート、ホスホルアミデートで、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むもの、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェートで通常の 3'-5'結合を持つもの、これらの 2'-5'結合類似体、及び一又は複数のヌクレオチド間結合が 3'から 3'、5'から 5'又は 2'から 2'結合である逆転された極性を持つものが含まれる。逆転した極性を持つ好適なオリゴヌクレオチドは単一の 3'から 3'結合を最も 3'側のヌクレオチド間結合、つまり、非塩基性(abasic)でありうる単一の逆転ヌクレオシド残基(核酸塩基がないか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する)を含む。様々な塩、混合された塩及び遊離の酸形態がまた含まれる。リン含有結合の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5194599; 5565555; 5527899; 5721218; 5672697及び 5625050 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0126】

リン原子をそこに含まない好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格は短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は一又は複数の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される)を有するもの; シロキサ骨格; スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格; ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格; メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格; リボアセチル骨格; アルケン含有骨格; スルファメート骨格; メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格; スルホネート及びスルホンアミド骨格; アミド骨格; 及び混合 N、O、S 及び CH₂ 成分部分を有する他のものが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 560

10

20

30

40

50

8 0 4 6 ; 5 6 1 0 2 8 9 ; 5 6 1 8 7 0 4 ; 5 6 2 3 0 7 0 ; 5 6 6 3 3 1 2 ; 5 6 3 3 6 0 ; 5 6 7 7 4 3 7 ; 5 7 9 2 6 0 8 ; 5 6 4 6 2 6 9 及び 5 6 7 7 4 3 9 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【 0 1 2 7 】

他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、糖とヌクレオシド間結合の双方、つまりヌクレオチド単位の骨格が新規な基と置換される。ベース単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を持つことが示されているオリゴヌクレオチド擬態体はペプチド核酸 (PNA) と呼ばれる。PNA 化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。PNA 化合物の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許 5 5 3 9 0 8 2 ; 5 7 1 4 3 3 1 ; 及び 5 7 1 9 2 6 2 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。PNA 化合物の更なる教示はNielsen等, Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

10

好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオネート骨格及び/又はヘテロ原子骨格、特に $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られる]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、及び上で参照した米国特許第 5 4 8 9 6 7 7 号に記載された $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [ここで天然ホスホジエステル骨格は $-O-P-O-CH_2-$ と表される] 及び上で参照された米国特許第 5 6 0 2 2 4 0 号のアミド骨格を含む。また好ましいものは上で参照した米国特許第 5 0 3 4 5 0 6 号のモルホリノ骨格構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【 0 1 2 8 】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一又は複数の置換糖部分を含みうる。好適なオリゴヌクレオチドは 2' 位に次のものの一つを含む: OH; F; O-アルキル、S-アルキル、又は N-アルキル; O-アルケニル、S-アルケニル又は N-アルケニル; O-アルキニル、S-アルキニル又は N-アルキニル; 又は O-アルキル-O-アルキルを含み、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は非置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルでありうる。特に好ましいものは $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、ここで n 及び m は 1 から約 10 である。他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは 2' 位に次のものの一つを含む: $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル又は O-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA 切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善する基、オリゴヌクレオチドの薬理的性質を改善する基、及び同様な性質を持つ他の置換基。好適な修飾は 2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2-メトキシエチル)又は 2'-MOE としても知られている 2'-O-CH₂CH₂OCH₃) (Martin 等, Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504)、つまりアルコキシアルコキシ基を含む。更に好適な修飾は、以下の実施例に記載されているように 2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、つまり 2'-DMAOE としても知られている $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び 2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は 2'-DMAEOE としても知られている)、つまり 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂) を含む。

30

40

【 0 1 2 9 】

更に好適な修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の 3' 又は 4' 炭素原子に結合され二環糖部分を形成する固定核酸 (Locked Nucleic Acids: LNAs) を含む。結合は好ましくは n

50

が1又は2である2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン(-CH₂-)_n基である。L N A s 及びその製造方法は国際公開98/39352及び国際公開99/14226に記載されている。

他の好適な修飾は2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-アリル(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-アリル(2'-O-CH₂-CH=CH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾はアラビノ(上)位置又はリボ(下)位置においてでありうる。好適な2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾はまたオリゴヌクレオチドの他の位置、特に3'末端ヌクレオチドの糖の3'位又は2'-5'結合オリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位になすことができる。オリゴヌクレオチドはまたペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬態体¹⁰を有しうる。そのような修飾糖構造の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; 5792747; 及び5700920が含まれ、その各々は出典明示により全体がここに取り込まれる。

【0130】

オリゴヌクレオチドにはまた核酸塩基(当該分野ではしばしば単に「塩基」と称される)の修飾又は置換が含まれうる。ここで使用される場合、「未修飾の」又は「天然の」核酸塩基にはプリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)及びピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-プロピル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロポニル(-C(CH₃)₂-CH₂-C(CH₃)₂-H)ウラシル及びシトシン及び他のピリミジン塩基のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン類及びグアニン類、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル類及びシトシン類、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが含まれる。更なる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン類、例えばフェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)が含まれる。修飾核酸塩基にはまたプリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンが含まれうる。更なる核酸塩基には米国特許第3687808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858-859頁, Kroschwitz, J.I.編 John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、及びEnglisch等, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613に開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のある種のあるものは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及びO-6置換プリンで、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含むものが含まれる。5-メチルシトシン置換は0.6-1.2⁵⁰

だけ核酸二重安定性を増大させることが知られており (Sanghvi等, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278)、より詳細には 2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、好適な塩基置換である。修飾核酸塩基の製造を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許 3 6 8 7 8 0 8 ; 並びに米国特許 4 8 4 5 2 0 5 ; 5 1 3 0 3 0 2 ; 5 1 3 4 0 6 6 ; 5 1 7 5 2 7 3 ; 5 3 6 7 0 6 6 ; 5 4 3 2 2 7 2 ; 5 4 5 7 1 8 7 ; 5 4 5 9 2 5 5 ; 5 4 8 4 9 0 8 ; 5 5 0 2 1 7 7 ; 5 5 2 5 7 1 1 ; 5 5 5 2 5 4 0 ; 5 5 8 7 4 6 9 ; 5 5 9 4 1 2 1 ; 5 5 9 6 0 9 1 ; 5 6 1 4 6 1 7 ; 5 6 4 5 9 8 5 ; 5 8 3 0 6 5 3 ; 5 7 6 3 5 8 8 ; 6 0 0 5 0 9 6 ; 5 6 8 1 9 4 1 及び 5 7 5 0 6 9 2 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

10

【 0 1 3 1 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを亢進する一又は複数の部分又はコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合させることを含む。本発明の化合物は第 1 級又は第 2 級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合したコンジュゲート基を含む。本発明のコンジュゲート基には、介入物 (インターカレーター)、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬理的性質を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、カチオン脂質、リン脂質、カチオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が含まれる。この発明の文脈における薬理的性質を増強する基には、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を亢進し、及び/又は RNA との配列特異的ハイブリダイゼーションを補強する基が含まれる。この発明の文脈における薬物動態学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込み、分散、代謝又は排出を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には限定されるものではないが、脂質分子、例えばコレステロール部分 (Letsinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸 (Manoharan等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1063)、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan等, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660-306-309; Manoharan等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser等, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison-Behmoaras等, *EMBOJ.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov等, *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等, *Biocchimie*, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム 1, 2 -ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート (Manoharan等, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea等, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan等, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan等, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra等, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237)、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた活性な薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 -トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロsporin、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗菌剤又は抗生物質にコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲート及びその製造方法は米国特許出願第 0 9 / 3 3 4 1 3 0 号 (1999年6月15日出願) 及び米国特許 4 8 2 8 9 7 9 ; 4 9 4 8 8 8 2 ; 5 2 1 8 1 0 5 ; 5 5 2 5 4 6 5 ; 5 5 4 1 3 1 3 ; 5 5 4 5 7 3 0 ; 5 5 5 2 5 3 8 ; 5 5 7 8 7 1 7 ; 5 5 8 0 7 3 1 ; 5 5 8 0 7 3 1 ; 5 5 9 1 5 8 4 ; 5 1 0 9 1 2 4 ; 5 1 1 8 8 0 2 ; 5 1 3 8 0 4 5 ; 5 4 1 4 0 7 7 ; 5 4 8 6 6 0 3 ;

20

30

40

50

5 5 1 2 4 3 9 ; 5 5 7 8 7 1 8 ; 5 6 0 8 0 4 6 ; 4 5 8 7 0 4 4 ; 4 6 0 5 7 3 5 ;
 4 6 6 7 0 2 5 ; 4 7 6 2 7 7 9 ; 4 7 8 9 7 3 7 ; 4 8 2 4 9 4 1 ; 4 8 3 5 2 6 3 ;
 4 8 7 6 3 3 5 ; 4 9 0 4 5 8 2 ; 4 9 5 8 0 1 3 ; 5 0 8 2 8 3 0 ; 5 1 1 2 9 6 3 ;
 5 2 4 1 1 3 6 ; 5 0 8 2 8 3 0 ; 5 1 1 2 9 6 3 ; 5 2 1 4 1 3 6 ; 5 2 4 5 0 2 2 ;
 5 2 5 4 4 6 9 ; 5 2 5 8 5 0 6 ; 5 2 6 2 5 3 6 ; 5 2 7 2 2 5 0 ; 5 2 9 2 8 7 3 ;
 5 3 1 7 0 9 8 ; 5 3 7 1 2 4 1 ; 5 3 9 1 7 2 3 ; 5 4 1 6 2 0 3 ; 5 4 5 1 4 6 3 ;
 5 5 1 0 4 7 5 ; 5 5 1 2 6 6 7 ; 5 5 1 4 7 8 5 ; 5 5 6 5 5 5 2 ; 5 5 6 7 8 1 0 ;
 5 5 7 4 1 4 2 ; 5 5 8 5 4 8 1 ; 5 5 8 7 3 7 1 ; 5 5 9 5 7 2 6 ; 5 5 9 7 6 9 6 ;
 5 5 9 9 9 2 3 ; 5 5 9 9 9 2 8 及び 5 6 8 8 9 4 1 に記載され、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

10

【 0 1 3 2 】

与えられた化合物の全ての位置を一様に修飾する必要はなく、実際、一を超える上述の修飾を単一化合物中に又はオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオシドにさえ導入することができる。本発明はまたキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈における「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、それぞれが少なくとも一モノマー単位、つまりオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドからなる2以上の化学的に区別される領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的にはオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞性取り込み、及び/又は標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾されている少なくとも一の領域を含む。オリゴヌクレオチドの更なる領域はRNA : DNA又はRNA : RNAハイブリッドを切断可能な酵素の基質となりうる。例を挙げると、RNAアーゼHはRNA : DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。故に、RNAアーゼHの活性化はRNA標的の開裂を生じ、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効果を大きく向上させる。従って、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をししばしば得ることができる。本発明のキメラアンチセンス化合物は上述の二以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド及び/又はオリゴヌクレオチド擬態体の複合構造体として形成されてもよい。好適なキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性を付与するために3'末端に少なくとも一の2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)とRNAアーゼH活性を付与するために少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ領域を含む。このような化合物はまた当該分野においてハイブリッド又はギャプマー(gapmers)とも呼ばれている。好適なギャプマーは少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ少なくとも一の領域で分離した3'末端と5'末端2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)の領域を持ち、好ましくはホスホロチオネート骨格結合を含む。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5013830 ; 5149797 ; 5220007 ; 5256775 ; 5366878 ; 5403711 ; 5491133 ; 5565350 ; 5623065 ; 5652355 ; 5652356 ; 及び5700922が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

20

30

40

【 0 1 3 3 】

本発明において使用されるアンチセンス化合物は固相合成のよく知られた技術によって簡便かつ常套的に製造することができる。そのような合成のための装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, Calif.)を含む幾つかのメーカーによって販売されている。当該分野で知られているそのような合成のための任意の他の手段を付加的に又は別に使用してもよい。オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオネート及びアルキル化誘導体を調製するために類似の技術を使用することはよく知られている。本発明の化合物は、また、取り込み、分散及び/又は吸収を補助するための他の分子、分子構造又は化合物混合物、例えばリポソーム、レセプター標的分子、経口、直腸、局所適用又は他の製剤と、混合、カプセル化、コンジュゲート又はその他、組み合わされてもよい。そのような取り込み、

50

分散及び/又は吸収を補助する製剤の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第 5 1 0 8 9 2 1 ; 5 3 5 4 8 4 4 ; 5 4 1 6 0 1 6 ; 5 4 5 9 1 2 7 ; 5 5 2 1 2 9 1 ; 5 5 4 3 1 5 8 ; 5 5 4 7 9 3 2 ; 5 5 8 3 0 2 0 ; 5 5 9 1 7 2 1 ; 4 4 2 6 3 3 0 ; 4 5 3 4 8 9 9 ; 5 0 1 3 5 5 6 ; 5 1 0 8 9 2 1 ; 5 2 1 3 8 0 4 ; 5 2 2 7 1 7 0 ; 5 2 6 4 2 2 1 ; 5 3 5 6 6 3 3 ; 5 3 9 5 6 1 9 ; 5 4 1 6 0 1 6 ; 5 4 1 7 9 7 8 ; 5 4 6 2 8 5 4 ; 5 4 6 9 8 5 4 ; 5 5 1 2 2 9 5 ; 5 5 2 7 5 2 8 ; 5 5 3 4 2 5 9 ; 5 5 4 3 1 5 2 ; 5 5 5 6 9 4 8 ; 5 5 8 0 5 7 5 ; 及び 5 5 9 5 7 5 6 が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

【 0 1 3 4 】

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

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インピボ又はエキソピボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(国際公開90/13641参照)を含む。

【 0 1 3 5 】

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

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

【 0 1 3 6 】

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、通常は少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、79

10

20

30

40

50

0、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

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

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

10

【0137】

ポリペプチドをアッセイに使用して、ポリペプチドとの結合性相互作用に關与する他のタンパク質又は分子を同定することができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、結合性相互作用のペプチド又は小分子阻害剤のスクリーニングに用いることができる。スクリーニングアッセイは、天然ポリペプチド又はポリペプチドのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計することができる。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにす。考慮される小分子は、合成有機化合物又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

20

また、ポリペプチド又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、ポリペプチドをコードするcDNAは、ポリペプチドをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、ポリペプチドをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4736866号や第4870009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのポリペプチド導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたポリペプチドをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はポリペプチドをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

30

40

【0138】

あるいは、ポリペプチドの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、ポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する遺伝子「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに

50

使用できる。ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターしたりするために使用する選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同組換えベクターについてはThomas及びCapecci, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターを胚幹細胞株に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

10

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

20

【0139】

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである(Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

30

40

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

本発明のポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、ポリペプチド

50

は、その他の組織と比較して1つの組織において、好ましくは同じ組織型の正常組織と比較して疾患性組織において特異的に発現する。核酸分子には、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0140】

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

10

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

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

【0141】

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

20

30

【0142】

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

40

50

ット (MATCHMAKER(商品名)) は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0143】

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

アンタゴニストを検定するために、ポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、ポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合ポリペプチドレセプター又はコード化されたレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。ポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパニング及びFACSソーティングにより同定できる。Coligan等、Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、ここではポリアデニル化RNAがポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したポリペプチドへ曝露する。ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、対話型サブプール化及び再スクリーニング法を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0144】

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

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

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

【0145】

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

【0146】

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

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

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

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0147】

単離されたポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にポリペプチドを生成するために用いることが可能である。次に、生成されたポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗体を生成するために用いることが可能である。

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

ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプ

チドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

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

【0148】

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

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

【実施例】

【0149】

試薬

色素生産性基質S2366はDiaPharma Group, Inc. (West Chester, OH)、Lys-プラスミノーゲンはHaematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT)から、および組織型プラスミノーゲン活性化因子(t-PA)はGenentech, Inc. (South San Francisco, CA)から入手した。血清がない条件下でチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において、発現され、HiTrapセファロースSPクロマトグラフィにより精製されたプロHGFは、David Kahn (Genentech)により入手した。記述される(34)ように、残基Val373-Arg407を含有するHGF Aはバキュロウイルス発現系において、発現され、精製された。ヒトの293細胞において、発現される、精製されたヒト組換えFVIIは、Mark O'Connell (Genentech)から贈与されたものであり、最近記述されている(42)。記述される(43)ように、基本的に、ジオレイル1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-(ホスホ-L-セリン)(PS)およびオレオイル1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PC)(Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL)は、PCPSベシクル(7:3モル比)を生産するために用いた。分子量マーカーは、SeeBlue Plus 2およびMultiMark標準物質(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた。

【0150】

ヘプシンの発現及び精製

I.M.A.G.E. consortium (ATCC, Manassas, VA)から入手の完全長ヘプシンのcDNAは、限定エンドヌクレアーゼEcoRIおよびNotI (New England Biolabs Inc. Beverly, MA)によって、消化し、真核生物発現ベクターpRK5Eに挿入した。分泌されたHisタグ付加ヘプシンcDNAは、ヒトヘプシンの細胞外ドメイン(Arg45-Leu417:番号付けシステムSomoza等, 2003(5)に従う)をコードするcDNAとヒトHGF(アミノ酸Met1-Gly31)のシグナル配列をコードするcDNAを融合することによって、構築した。加えて、真核生物発現ベクターpCMV.PD5に挿入された最終的なcDNAコンストラクトとLeu417の後のC末端にHis₈タグを付加した。基本的に、野生型sHAI-1Bの産生について記述される(34)ように、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞一時的発現システムでヘプシンを発現させ、ニッケル-ニトリロトリ酢酸(Ni-NTA)親和性クロマトグラフィによって精製した。

【0151】

sHAI-1B、sHAI-1B突然変異体およびsHAI-2の発現および精製

既に記述される(34)ように、全ての細胞外ドメインを含有するHAI-1Bの可溶型(sHAI-1B)はCHO細胞一時的発現システムで生産して、精製した。部位特異的突然変異を用いて、KD1(Arg260)およびKD2(Lys401)のP1残基をAlaにそれぞれ変異させ、結果として生じるタンパク質、sHAI-1B(R260A)およびsHAI-1B(K401A)を、記述される(34)ように、発現させて、精製した。

完全長HAI-2は、オリゴdT/NotI部位をプライマーおよび二本目の鎖のSa

10

20

30

40

50

1 I 部位を有するアダプターとして用いて、ヒト胎児肺 RNA 由来の cDNA ライブラリ (BD Biosciences Clontech, Palto Alto, CA) から入手した。cDNA は S a l I および N o t I によって消化し、2.8 kb より大きい cDNA は p R K 5 D に挿入した。ヒト肺 cDNA / p R K 5 D ライブラリの一本鎖 DNA は、標準物質分子生物学的方法を用いて生成した。リバースプライマ(5'-TTTCTTGAGGC ACTCCTCCTTG-3')は、一本鎖 cDNA プールにアニールし、T7 又は T4 DNA ポリメラーゼを用いて伸展させた。大腸菌に合成された二本鎖 DNA を形質移入し、コロニーを標準的なフィルタハイブリダイゼーション法を使用してスクリーニングした。挿入サイズは、PCR および制限エンドヌクレアーゼ消化 (X b a I) によって分析した。H A I - 2 完全長クローンを同定して、DNA 塩基配列決定によって確認した。H A I - 2 の可溶型 (s H A I - 2) は、H A I - 2 の細胞外ドメイン (A l a 2 8 - L y s 1 9 7、番号付けシステム Kawaguchi 等, 1997(39)に従う) をコードする cDNA を構築して、G l y スペースを有する C 末端 H i s₈ タグを付加することによって産生した。次いで、得られた cDNA を、p V L 1 3 9 3 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) から得られるバキュロウイルス発現ベクターに挿入した。基本的に、H G F 鎖の産生について記述される(44)ように、s H A I - 2 は、バキュロウイルス発現系において、発現させ、N i - N T A 親和性クロマトグラフィによって精製した。タンパク質濃度は定量的アミノ酸分析で測定した。

【0152】

F V I I およびプラスミノーゲン活性化アッセイ

0.11 mg / ml 濃度の F V I I を、230 nM のヘプシンを含有する 30 mM トリス-HCl、pH 8.4、30 mM イミダゾール、0.5 mM P C P S 溶媒存在下での 200 mM N a C l (トリス緩衝液) および 5 mM C a C l₂ によって、37 で活性化した。異なる時間点で採取した反応分割量を、4 - 20% の勾配ゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて S D S - P A G E (還元条件) によって分析した。ゲルは S i m p l y B l u e S a f e S t a i n (Invitrogen) にて染色した。

0.12 mg / ml のプラスミノーゲンを、40 nM のヘプシン又は 40 nM の t - P A (ポジティブコントロール) を含有する 20 mM H e p e s pH 7.5、150 mM N a C l (H e p e s バッファ) にて、37 でインキュベートした。F V I I 活性化アッセイについて記述されるように、異なる時間点で採取した反応分割量を S D S - P A G E によって、分析した。

【0153】

ヘプシンおよび H G F A によるプロ H G F 活性化

プロ H G F (0.3 mg / ml) を、40 nM のヘプシンを有する H e p e s バッファ又は 40 nM の H G F A を有する H e p e s バッファ中で 37 で 4 時間インキュベートし、後の使用まで - 20 で保存した。S D S - P A G E による消化された材料、H G F_h e p s i n および H G F_{H G F A} の分析により、95% より多くのプロ H G F が 2 - 鎖 H G F に転換したことが示された。

記述される(34、45)ように、プロ H G F 活性化アッセイおよびプロ H G F の¹²⁵I - 標識を行った。簡潔には、0.05 mg / ml の¹²⁵I 標識プロ H G F を含有する H e p e s バッファを、漸増濃度(0.16 - 40 nM) のヘプシン又は H G F A とともに 37 でインキュベートした。4 時間後、分割量を採取し、S D S - P A G E (4 - 20% の勾配ゲル) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) によって分析した。阻害研究のために、ヘプシン(15 nM) を 1 μM の s H A I - 1 B、s H A I - 1 B (K 4 0 1 A)、s H A I - 1 B (R 2 6 0 A) 又は s H A I - 2 とともに H e p e s バッファ中で 37 でインキュベートした。4 時間後、試料を S D S - P A G E によって分析し、S i m p l y B l u e S a f e S t a i n (Invitrogen) にて染色した。

【0154】

酵素阻害アッセイ

アッセイ条件は、色素生産性基質 S 2 3 6 6 (L - ピログルタミル - L - プロイル - L - アルギニン - p - ニトロアニリンヒドロクロライド) を用いた Somoza 等 2003(5) により記述さ

10

20

30

40

50

れるものと類似である。ヘプシン(終濃度 0.4 nM)を、漸増濃度のインヒビターとともにトリスバッファ中で室温で30分間インキュベートした。基質S2366を添加し、 405 nm の吸光度の変化を動態学的マイクロプレート読み取り機(Molecular Devices, Sunnyvale CA)にて測定した。この最終反応混合物中のヘプシン及びS2366の濃度はそれぞれ、 0.4 nM および 0.2 mM ($K_m = 0.2 \text{ mM}$ を測定)であった。阻害活性は、阻害されない酵素活性の部分的活性(v_i / v_0)として表した。 50% 阻害(IC_{50})を示すインヒビター濃度は、4つのパラメータ回帰曲線適合プログラム(Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA)にデータを合わせることによって算出した。それぞれのインヒビターについて少なくとも3回の独立した実験を行った。

【0155】

細胞増殖および移動アッセイ

増殖アッセイは、European Collection of Cell Cultures (CAMR, Centre for Applied Microbiology and Research, Salisbury, Wiltshire, UK)から入手したヒト膵臓腺癌細胞株BxPC3を用いて行った。細胞は、 10% FCS (Sigma, St. Louis, MO)、 10 mM HEPES、 2 mM グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン(Invitrogen, Carlsbad, CA)および $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (Invitrogen)を含有しているRPMI培養液中で生育した。集密的な細胞層をPBSで洗浄した後、 10 mM EDTA/PBSにて洗浄し、トリプシンにてインキュベーションの後に取り出した。細胞を、細胞増殖培養液中に再懸濁して、96ウェル白底のMTプレート(Cultur Plate™, Packard/PerkinElmer, Boston, MA)に播種した($10,000 - 15,000$ 細胞/ウェル)。24時間後、細胞増殖培養液をRPMI- 0.1% BSAと置き換えた。さらに24時間後、培養液を除去し、RPMI- 0.1% BSA中に様々な濃度のHGF_{hepsin}及びHGF_{HGF_A}を添加し、細胞を72時間生育させた。次いで、製造業者の指示に従ってCell Titer-Glo Luminescentキット(Promega, Madison, WI)を用いて細胞増殖を定量化した。Tropix TR717マイクロプレート照度計(Berthold 75323, Bad Wildbad, Germany)にて発光を測定した。バックグラウンドの値(HGFの非存在下での増殖量)を減算した後、HGF_{hepsin}およびHGF_{HGF_A}の活性を、 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ のHGFコントロール調製物(Dr. Ralph Schwall, Genentechから入手)に対するBxPC3増殖の割合として表した。

記述される(44)ように、乳癌細胞株MDA-MB435 (HTB-129, ATCC, Manassas, VA)を用いて細胞移動アッセイを行った。簡単に言うと、無血清培地に懸濁した 0.2 mL の細胞($0.6 - 0.8 \times 10^6$ 細胞/ mL)を、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のラット尾コラーゲンタイプI (Upstate, Lake Placid, NY)でプレコーティングした24ウェルトランスウェルプレート($8 \mu\text{m}$ 細孔径) (HTS Multiwell™ Insert System, Falcon, Franklin Lakes, NJ)の上部チャンバに添加した。HGF調製物を、無血清培地中の下部チャンバに添加した。13-14時間インキュベーションした後、膜の先端面上の細胞を除去し、基礎側に移動したものを 4% パラホルムアルデヒドに固定して、 0.5% クリスタルバイオレット溶液にて染色した。細胞を 10% 酢酸で溶解し、A₅₆₀をMolecular Devicesマイクロプレート読み取り機にて測定した。HGF突然変異体のプロ移動性活性を、HGFの非存在下での基礎移動を減算した後の、HGFコントロール調製物に対する割合として表した。

【0156】

Metレセプターリン酸化アッセイ

記述される(44)ように、キナーゼレセプター活性化アッセイ(KIRA)を行った。簡単に言うと、肺上皮癌A549細胞(CCL-185, ATCC, Manassas, VA)を1ウェルにつき $50,000$ 細胞の密度で、96ウェルプレートに播いた。37°Cで一晩インキュベーションした後、細胞増殖培養液を除去し、細胞を 0.1% FBSを含有する培養液中で30~60分間おいて、血清欠乏状態にした。 0.1% FBSを含有する培養液中に漸増濃度のHGF_{hepsin}及びHGF_{HGF_A}を添加した。対照として、我々は、切断部位が変異した(Arg494Glu) HGFの非切断一本鎖型(scHGF)を用いた(44

10

20

30

40

50

)。37 で10分インキュベーションした後、培養液を除去し、細胞をプロテアーゼインヒビター反応混液を添加した溶解バッファ(Cell Signaling Technologies, Beverly, MA)にて溶解した。BV-TAG標識4G10抗体およびビオチン化抗Met抗体を細胞溶解物に加えた。1.5~2時間インキュベーションした後、ストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynabeads, Bio Veris)を添加して、45分間インキュベートした。結合した材料(抗Met抗体/Met/抗ホスホチロシン抗体)を有するビーズを、外部から磁石にあてることによって、捕獲した。洗浄工程の後、光源により生成される化学発光シグナルを、Bio Veris計測器にて相対的な発光の単位として測定した。各々の実験について、HG F_{hep sin}、HG F_{HGF A}又はs cHG FによるMetリン酸化を、HG Fコントロール調整物で得られた最大シグナルに対する割合として表した。

10

【0157】

結果

ヘプシンによるプロHG Fのタンパク分解処理

全ての細胞外ドメインを含有するヘプシンの可溶型(Arg45-Leu417、番号付けシステムSomoza等, 2003(5)に従う)と、C末端His₈タグを、CHO細胞において、発現させた。精製工程の間、ヘプシン酵素前駆体は、おそらく自己活性化によって、自然発生的にその2-鎖型に変換した(図1A)(4)。30kDa以下のプロテアーゼドメイン(¹⁶³IVGGRDTS LGR¹⁷³)のN末端配列決定によって、予想されたArg162-Ile163ペプチド結合での切断が活性な酵素を生じることが確認された。ヘプシンが、能動的にFV I I酵素前駆体を2-鎖FV I I aに変換することは(図1B) 20、FV I I活性を決定するための細胞表面発現ヘプシンを用いたKazama等, 1995(9)により報告された実験と一致した。プロHG Fに対するヘプシン活性は、¹²⁵I標識プロHG Fの2-鎖HG Fへの変換を測定することによって、調べられた。結果は、プロHG Fが濃度依存的な様式でヘプシンにより切断されることが示された(図2A)。ヘプシン活性はHG F Aのものと同様であり(図2B)、両方の酵素は4-13nM濃度のプロHG Fを完全に変換した。同じアッセイシステムにおいて、プロHG F活性化第X I a因子、第X I I a因子および血漿カリクレインは、完全にプロHG Fを変換するためにはおよそ5-6倍の濃度が必要である(45)。36kDa以下および39kDa以下のHG F鎖のN末端配列決定によって、ヘプシンが予想されたArg494-Val495ペプチド結合でプロHG Fをプロセシングしたことを示す、同一の配列(⁴⁹⁵VVNG I P T R 30 T N I G⁵⁰⁶)が明らかとなった。第X I a因子および血漿カリクレインとは異なり、さらに長時間反応させた後であっても、ヘプシンは、(Arg424-His425間の切断によって)HG F 2-鎖断片を生成しなかった(45)。さらに、ヘプシン(40nM)は、5時間の反応の間、プラスミノゲンを活性化する能力を完全に欠いていた(図2C)。相対的に、およそ50%の酵素前駆体によって、t-P Aに効率的に処理されたプラスミノゲンは、0.5時間後には既に切断した(図2C)。

【0158】

ヘプシン消化により生成されるHG Fの生物活性

非標識プロHG F(0.3mg/ml)を、HG F_{hep sin}およびHG F_{HGF A}それぞれを求めるために、40nMのヘプシン又は40nMのHG F AにてHG Fに完全に 40 (>95%)変換させた(図3A)。A549肺カルシノーマ細胞を用いたキナーゼレセプターアッセイ(K I R A)では、両方のHG F調製物は同じように濃度依存的にMetリン酸化を誘導し、250ng/mlで最大活性となった(図3B)。既に示されている(44)ように、変更した切断部位(R494E)により切断されなかったHG Fの一本鎖型(s cHG F)は、活性を示さなかった(図3B)。対照実験では、ヘプシン又はHG F A単独は無効であったことが示された(データは示さない)。さらに、HG F_{hep sin}は、B x P C 3膵癌細胞の増殖を効率的に促進した。活性は、5-100ng/mlの範囲で試験したHG F_{HGF A}の活性と比較した(図4A)。コラーゲンコートトランスウェル移動システムを用いたMDA-MB435細胞による細胞移動アッセイでは同様の結果が得られた。細胞増殖アッセイでみられるように、HG F_{hep sin}のプロ遊走性の効果は濃度依 50

存性であり、 HGF_{HGF_A} の活性と区別がつかなかった(図4B)。

【0159】

sHAI-1BおよびsHAI-2によるヘプシン酵素活性の阻害

26個の市販の色素生産性基質の最初のスクリーニングでは、Somoza等, 2003(5)により報告される基質であるS2366が最も高い割合でヘプシンにより加水分解されたことが示された(データは示さない)。基質としてS2366を使用して、野生型HAI-1B(sHAI-1B)及びHAI-2(sHAI-2)の高度に精製された、可溶性型の阻害活性を測定した。加えて、我々は、2つのsHAI-1B突然変異体sHAI-1B(R260A)及びsHAI-1B(K401A)を生産した。この突然変異体はそれぞれのクーニツドメインがP₁残基(KD1のArg260およびKD2のLys401)をアラニンに置換されることによって、不活性である(34)。sHAI-1B及びsHAI-2の両方が、それぞれIC₅₀値21.1 ± 2.7 nM及び1.3 ± 0.3 nMで、ヘプシン酵素活性を強力に阻害したことを示した(図5)。さらに、機能しないKD2を含有する変異体sHAI-1B(K401A)は野生型sHAI-1Bと同等の効力であるが、一方sHAI-1B(R260A)は活性が47分の1より小さくなった(図5)。得られたIC₅₀値を表1にまとめる。

10

【0160】

表1 クーニツドメインインヒビターによるヘプシンの阻害

| インヒビター | IC ₅₀ (nM) |
|----------------|-----------------------|
| sHAI-1B wt | 21.1 ± 2.7 |
| sHAI-1B(K401A) | 18.2 ± 3.7 |
| sHAI-1B(R260A) | > 1000 |
| sHAI-2 | 1.3 ± 0.3 |

20

30

【0161】

ヘプシン媒介性プロHGF活性化の阻害

高分子基質処理を妨げるsHAI-1B及びsHAI-2の能力を、¹²⁵I-プロHGF活性化アッセイにおいて、測定した。得られた結果は、アミノリシスアッセイにおいて、測定されるそれらの阻害力と完全に一致した。1 μM濃度のsHAI-2、野生型sHAI-1B及びsHAI-1B(K401A)では、プロHGFの切断が完全に阻害された(図6)。対照的に、1 μMのsHAI-1B(R260A)は阻害を示さず、プロHGF活性化により完全に転換した(図6)。

40

【0162】

考察

HGF/Metシグナル伝達経路は、腫瘍浸潤及び転移を含むヒト生理機能及び病理学において、重要な役割を果たす。活性なHGFの局所の有効性は、細胞外環境における不活性なプロHGFの処理を制御する、キモトリプシン様セリンプロテアーゼおよびその同族インヒビターにより制御される。したがって、癌におけるこの「上流の」プロHGF転換酵素経路の混乱は、プロHGFプロセッシングを促進することによって、腫瘍成長を促進しうる。ここで、我々は、前立腺癌及び卵巣癌において、高度に上方制御されるセリンプロテアーゼであるヘプシンは、プロHGFの強力な活性化因子である。ゆえに、ヘプシン

50

はおそらく、前立腺癌(46 - 48)並びに卵巣がん(49、50)に関係している、HGF / Metシグナル伝達経路を活性化することによって、腫瘍成長をもたらすことにおいて、重要な役割を果たす。

ヘプシンは、第X I a因子および血漿カリクレインにより認識される部位であるクリングルドメイン4のArg 424-His 425でいかなる付加的な切断をすることなく、Arg 494 - Val 495ペプチド結合でプロHGFを蛋白質加水分解的に切断する(45)。ヘプシンにより生成される2-鎖HGFは十分に機能的であり、Metレセプターリン酸化を誘発して、HGF Aにより生成されるHGFと同等の活性で細胞増殖および移動を促進した。不活性なプロHGFの活性化成長因子へのヘプシン媒介性変換の基本となる分子メカニズムは、キモトリプシン様セリンプロテアーゼの酵素変換に対するタンパク分解性酵素前駆体と類似している。このことはプロHGF活性化の構造的結果についての近年の研究に裏付けられており、Arg 494 - Val 495で切断されると、プロテアーゼ様HGF鎖での立体配置的变化とMetレセプター結合部位の完全な成熟が引き起こされることが示されている(44、51)。この、HGFの「活性部位領域」及び「活性化ドメイン」に集中しているMet結合部位は、セリンプロテアーゼの基質処理領域と著しく似ている(44、51)。ゆえに、ヘプシンによるプロHGF切断により、HGF上の構造再配置が起こり、生産的なHGF / Metシグナル伝達複合体の形成を可能にする。プロHGFの非常に近い構造的ホモログであるプラスミノゲンを切断しなかったため、プロHGFに対するヘプシンのタンパク分解性活性は非常に特異的であるようである。ヘプシンは、他のセリンプロテアーゼ基質、例えばプロトロンビン、プロテインC、第X

【0163】

HGFヌルマウスを用いた研究では、HGF / Met経路が正常な胚発生及び生存に必須であることが示された(52、53)。対照的に、ヘプシン遺伝子に欠陥のあるマウスが正常に発生することは、胚発生の間ではヘプシンが主要なHGF活性化因子でないようであることを示唆する。ヘプシンと同様に、他の公知のプロHGF変換酵素マトリプターゼ(54)、第X I因子(55)、カリクレイン前駆体(56)及びu-PA(57)の欠損は胚性致死でない。胚発生及び出産後の生理機能におけるその重要性のために、HGF活性は、複数のプロHGF転換酵素システムによって、協調して制御される。その場合、プロHGF転換酵素遺伝子欠損が混在すると、HGFヌルマウスと類似の発生の欠損が生じうる。二者択一的に、胚発生の際にHGFプロセッシングを制御しているプロHGF転換酵素は、まだ特定されていない。

HAI-1B、HAI-1及びHAI-2は、上皮細胞表面インヒビターであって、多くの正常組織及び腫瘍において、発現される(34、58 - 63)。このように、それらは、上皮細胞発現型TTS P及びおそらく他の細胞表面関連セリンプロテアーゼの酵素活性を制御するために、理想的に位置する。実際、HAI-1スプライシング変異体HAI-1及びHAI-1Bは、強力にTTS Pマトリプターゼ(MT-S P 1)を阻害し、マトリプターゼとのHAI-1の複合体はヒト母乳において、みられた(38)。ここで、我々はs HAI-1B及びs HAI-2の両方がヘプシン酵素活性の強力なインヒビターでもあることを示した。さらに、P₁残基-定方向突然変異実験では、変異体s HAI-1B(R260A)がプロHGFアッセイにおいては不活性であり、アミド溶解性アッセイにおいては野生型及びKD2変異体活性の1%未満であったので、ヘプシンの阻害はs HAI-BのKD1に完全に媒介されることが示された。

【0164】

ゆえに、ヘプシン、マトリプターゼ及びHGF AはかなりのプロHGF変換活性を有しているだけでなく(34)、KD1特異的様式での等しい作用強度(16 - 30 nM)でs HAI-1Bにより阻害される(34、64)。スプライシング変異体HAI-1及びHAI-1Bは、KD1に対するC末端に位置する16アミノ酸の有無に違いがあるだけである。前立腺癌及び卵巣癌を含む組織における発現パターンは同一であり、従来、効力と標的プロテアーゼパターンにおいて、有意な差がみられなかった。したがって、我々は2つのスプ

ライシング変異体のインビボ機能は同等であると考慮する。H A I - 2 クーニツドメインの役割は、我々の研究では特に言及しなかった。大部分の標的酵素について、H A I - 2 は、N - 及び C - 末端クーニツドメインの両方を利用する(41、65)。

【0165】

インビトロでのH A I - 1 B 及びH A I - 2 とのヘプシンの機能的な作用と、インビボ上皮細胞表面への局在化とは、それらが生理的に関連する酵素-インヒビターシステムを構成しうることを示唆する。例えば、2つのH A I - 1 スプライシング変異体及びH A I - 2 は、正常な前立腺及び前立腺癌細胞株(34、59、61)において、発現され、H A I - 1 抗原は前立腺上皮の分泌細胞層に局所化していた(59)。興味深いことに、前立腺腫瘍でのヘプシン発現が同じ上皮の区画に局在化していることから、H A I - 1 及びおそらくH A I - 2 がインビボでヘプシンと作用すると言える(19、20)。ヘプシン発現が前立腺癌において、強く上方制御される一方(17-22)、Welsh 等, 2001(17)により報告される遺伝子発現結果によるとH A I - 1 及びH A I - 2 はわずかに増加するだけである(およそ1.5倍)。結果として、腫瘍のヘプシン酵素活性は、不十分に制御されてもよく、プロHGFプロセッシングと腫瘍発達の亢進を引き起こしうる。卵巣がんのマトリプターゼ/H A I - 1(62、63)、結腸直腸癌のHGF A / H A I - 1(66、67)及び腎臓細胞上皮癌のHGF A / H A I - 1(68)に関して、プロHGF 転換酵素/インヒビターシステムにおける同様な不均衡が記述されている。これらの癌にはヘプシンの上方制御された発現が、ある転換酵素/インヒビターシステムに複数の酵素が含まれており、そのために酵素/インヒビター比率が増加し、悪性腫瘍を引き起こす可能性を高めうることを示唆されるものもある。

結論として、示された結果により、ヘプシンが効率的にプロHGFを活性化することが示され、したがって、腫瘍上皮表面のヘプシンと不活性成長因子前駆体を含む細胞外基質との機能的な関連が明らかとなった。H A I - 1 B 及びH A I - 2 が、前立腺癌や卵巣癌で上方制御されるヘプシンの強力なインヒビターであるという発見により、癌治療のための新規な方法が提供される。例えば、H A I - 1 B 又はH A I - 2 の機能的なクーニツドメインはファージディスプレイ技術を用いてより特異的及び/又はより強力な酵素インヒビターを生成するための足場として役立つ。その技術は他のクーニツドメイン足場にうまく応用されている(69、70)。

【0166】

脚注/省略語

¹ 第V I I a 因子、第F V I I a 因子; H e p e s バッファ、20 mM H e p e s p H 7.5、150 mM N a C l ; トリス緩衝液、30 mM トリス-H C l , p H 8.4、30 mM イミダゾール、200 mM N a C l ; プロHGF、一本鎖肝細胞増殖因子、HGF、2-鎖肝細胞増殖因子; HGF A 肝細胞増殖因子活性化因子; H A I - 1、肝細胞増殖因子活性化因子インヒビター-1; H A I - 1 B、肝細胞増殖因子活性化因子インヒビター-1のスプライシング変異体; H A I - 2、肝細胞増殖因子活性化因子インヒビター-2; K D 1 及びK D 2、H A I - 1 B のN-及びC-末端クーニツドメイン; s H A I - 1 B、細胞外ドメインを包含するH A I - 1 B の可溶型; s H A I - 2、細胞外ドメインを包含するH A I - 2 の可溶型; HGF_{h e p s i n}、ヘプシンによるプロHGFの活性化により生産されるHGF; HGF_{HGF A}、HGF A によるプロHGFの活性化により生産されるHGF; s c HGF、変異した切断部位(A r g 494 G l u)により切断されない一本鎖HGF; u-P A、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子; t-P A、組織型プラスミノゲン活性化因子。N i - N T A、ニッケル-ニトリロトリ酢酸。

【0167】

一部の参考文献の一覧

1. Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M., and Bugge, T. H. (2003) *Thromb. Haemost.* 90, 185-193
2. Tsuji, A., Torres-Rosado, A., Arai, T., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Chou, S.-H., and Kurachi, K. (1991) *J Biol Chem* 266, 16948-16953

3. Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K., and Davie, E. W. (1988) *Biochemistry* 27, 1067-1074
4. Vu, T.-K. H., Liu, R. W., Haaksma, C. J., Tomasek, J. J., and Howard, E. W. (1997) *J Biol Chem* 272, 31315-31320
5. Somoza, J. R., Ho, J. D., Luong, C., Ghatge, M., Sprengeler, P. A., Mortara, K., Shrader, W. D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M. E., and Katz, B. A. (2003) *Structure* 11, 1123-1131
6. McCallum, C. D., Hapak, R. C., Neuenschwander, P. F., Morrissey, J. H., and Johnson, A. E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 28168-28175
7. Mutucumarana, V. P., Duffy, E. J., Lollar, P., and Johnson, A. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17012-17021 10
8. Husten, E. J., Esmon, C. T., and Johnson, A. E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12953-12961
9. Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C., and Kisiel, W. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 66-72
10. Wu, Q., Yu, D., Post, J., Halks-Miller, M., Sadler, J. E., and Morser, J. (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 321-326
11. Yu, I.-S., Chen, H.-J., Lee, Y.-S. E., Huang, P.-H., Lin, S.-R., Tsai, T.-W., and Lin, S.-W. (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 865-870
12. Zacharski, L. R., Ornstein, D. L., Memoli, V. A., Rousseau, S. M., and Kisiel, W. (1998) *Thromb. Haemost.* 79, 876-877 20
13. Rapaport, S. I., and Rao, L. V. M. (1995) *Thromb. Haemost.* 74, 7-17
14. Mann, K. G. (1999) *Thromb. Haemost.* 82, 165-174
15. Torres-Rosado, A., O'Shea, K. S., Tsuji, A., Chou, S.-H., and Kurachi, K. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7181-7185
16. Srikantan, V., Valladares, M., Rhim, J. S., Moul, J. W., and Srivastava, S. (2002) *Cancer Res.* 62, 6812-6816
17. Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson Jr., H. F., and Hampton, G. M. (2001) *Cancer Res.* 61, 5974-5978 30
18. Stamey, T. A., Warrington, J. A., Caldwell, M. C., Chen, Z., Fan, Z., Mahadevappa, M., McNeal, J. E., Nolley, R., and Zhang, Z. (2001) *J. Urol.* 166, 2171-2177
19. Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Catalona, W. J., Watson, M. A., and Milbrandt, J. (2001) *Cancer Res.* 61, 5692-5696
20. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001) *Nature* 412, 822-826
21. Luo, J., Duggan, D. J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C. M., Bittner, M. L., Trent, J. M., and Isaacs, W. B. (2001) *Cancer Res.* 61, 4683-4688 40
22. Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A., and Diamandis, E. P. (2004) *J. Urol.* 171, 187-191
23. Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G. P., and O'Brien, T. J. (1997) *Cancer Res.* 57, 2884-2887
24. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18231-18236
25. Takeuchi, T., Shuman, M. A., and Craik, C. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11054-11061 50

26. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925
27. Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300
28. Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M., and Birchmeier, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578
29. Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992) *EMBO J* 11, 2503-2510
30. Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119
31. Gak, E., Taylor, W. G., Chan, A. M.-L., and Rubin, J. S. (1992) *FEBS Lett.* 311, 17-21 10
32. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028
33. Lee, S.-L., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 36720-36725
34. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 36341-36349
35. Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. (1992) *EMBO J.* 11, 4825-4833 20
36. Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1995) *Eur. J. Biochem.* 229, 257-261
37. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6370-6376
38. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18237-18242
39. Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27558-27564 30
40. Marlora, C. W., Delaria, K. A., Davis, G., Muller, D. K., Greve, J. M., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12202-12208
41. Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlora, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Rocznik, S. O., and Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12209-12214
42. Kelley, R. F., Yang, J., Eigenbrot, C., Moran, P., Peek, M., Lipari, M. T., and Kirchhofer, D. (2004) *Biochemistry* 43, 1223-1229
43. Mimms, L. T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C., and Reynolds, J. A. (1981) *Biochemistry* 20, 833-840
44. Kirchhofer, D., Yao, X., Peek, M., Eigenbrot, C., Lipari, M. T., Billeci, K. L., Maun, H. R., Moran, P., Santelli, L., Wiesmann, C., and Lazarus, R. A. (2004) *J. Biol. Chem.* (in press) 40
45. Peek, M., Moran, P., Mendoza, N., Wickramasinghe, D., and Kirchhofer, D. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 47804-47809
46. Gmyrek, G. A., Walburg, M., Webb, C. P., Yu, H.-M., You, X., Darracott Vaughan, E., Vande Woude, G. F., and Kudson, B. S. (2001) *Am. J. Pathol.* 159, 579-590
47. Knudsen, B. S., Gmyrek, G. A., Inra, J., Scherr, D. S., Vaughan, E. D., Natus, D. M., Kattan, M. W., Gerald, W. L., and Vande Woude, G. F. (2002) *Urology* 60, 1113-1117
48. Zhu, X., and Humphrey, P. A. (2000) *Urology* 56, 1071-1074 50

49. Huntsman, D., Resau, J. H., Klineberg, E., and Auersperg, N. (1999) *Am. J. Pathol.* 155, 343-348
50. Wong, A. S. T., Pelech, S. L., Woo, M. M. M., Yim, G., Rosen, B., Ehlen, T., Leung, P. C. K., and Auersperg, N. (2001) *Oncogene* 20, 1318-1328
51. Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchhofer, D., and Wiesmann, C. (2004) *EMBO J.* 23, 2325-2335
52. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995) *Nature (London)* 373, 699-702
53. Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995) *Nature (London)* 373, 702-705 10
54. List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., Engelholm, L. H., Behrendt, N., and Bugge, T. H. (2002) *Oncogene* 21, 3765-3779
55. Gailani, D., Lasky, N. M., and Broze Jr., G. J. (1997) *Blood Coag. Fibrinol.* 8, 134-144
56. Hathaway, W. E., Wuepper, K. D., Weston, W. L., Humbert, J. R., Rivers, R. P. A., Genton, E., August, C. S., Montgomery, R. R., and Mass, M. F. (1976) *Am. J. Med.* 60, 654-664
57. Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., van den Oord, J. J., Collen, D., and Mulligan, R. C. (1994) *Nature* 368, 419-424 20
58. Hamasuna, R., Kataoka, H., Meng, J.-Y., Itoh, H., Moriyama, T., Wakisaka, S., and Kono, M. (2001) *Int. J. Cancer* 93, 339-345
59. Kataoka, H., Suganuma, T., Shimomura, T., Itoh, H., Kitamura, N., Nabeshima, K., and Kono, M. (1999) *J. Histochem. Cytochem.* 47, 673-682
60. Kataoka, H., Itoh, H., Uchino, H., Hamasuna, R., Kitamura, N., Nabeshima, K., and Kono, M. (2000) *Cancer Lett.* 148, 127-134
61. Parr, C., and Jiang, W. G. (2001) *Int. J. Oncol.* 19, 857-863
62. Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2001) *Am. J. Pathol.* 158, 1301-1311
63. Oberst, M. D., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Lin, C.-Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., al-Nafussi, A., Smyth, J. F., Gabra, H., and Sellar, G. C. (2002) *Clin. Cancer Res.* 8, 1101-1107 30
64. Denda, K., Shimomura, T., Kawaguchi, T., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 14053-14059
65. Qin, L., Denda, K., Shimomura, T., Kawaguchi, T., and Kitamura, N. (1998) *FEB Lett.* 436, 111-114
66. Kataoka, H., Hamasuna, R., Itoh, H., Kitamura, N., and Kono, M. (2000) *Cancer Res.* 60, 6148-6159
67. Kataoka, H., Uchino, H., Denda, K., Kitamura, N., Itoh, H., Tsubouchi, H., Nabeshima, K., and Kono, M. (1998) *Cancer Lett.* 128, 219-227 40
68. Yamauchi, M., Kataoka, H., Itoh, H., Seguchi, T., Hasui, Y., and Osada, Y. (2004) *J. Urol.* 171, 890-896
69. Dennis, M. S., and Lazarus, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22129-22136
70. Dennis, M. S., Herzka, A., and Lazarus, R. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 25411-25417

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図1】ヘプシン純度と第VII因子に対する活性。(A)CHO細胞発現型可溶性ヘプシンは、全ての細胞外ドメイン(Arg45-Leu417)およびC末端His₈タグを含有する。精製されたヘプシンの染色ゲル(還元状態)によって、ヘプシンがArg163-I 50

1 e 1 6 3 (N末端配列決定により検査される)で切断されて自然に2つの鎖に変換されていることを示す。(B) P C P S 溶媒と C a C l₂ 中のヘプシン(40 nM)、37 °C で2時間による第VII因子酵素前駆体の活性。F V I I 酵素前駆体、並びに F V I I a の軽鎖(l.c.)およびプロテアーゼドメイン(h.c.)の位置を示す。分子量マーカーを M_r × 10⁻³ で示す。

【図2】ヘプシンによるプロHGFの特異的活性化。¹²⁵I-標識プロHGF(0.05 mg/ml)を20 mM H e p e s , pH 7.5、150 mM N a C l (H e p e s バッファ)にて、レーン2の40 nMからレーン7の0.16 nMまで、酵素を3倍希釈させた漸減濃度のヘプシン及びHGF Aとともにインキュベートした。(A) ヘプシンおよび(B) HGF A。37 °C で4時間の後、試料を、還元下のSDS-PAGEの後にX線用フィルムへ曝露させて分析した。プロHGF、HGF 鎖およびHGF 鎖(二重線)の位置を下線で示した。レーン1は反応の開始直後の分割量である。(C) t-PAおよびヘプシンによるプラスミノゲンの活性化。プラスミノゲン(0.12 mg/ml)を、H e p e s バッファ中で、t-PA(40 nM)、ヘプシン(40 nM)又はバッファ(対照)とともにインキュベートした。異なる時間点で採取した分割量を、SDS-PAGE(還元条件)の後にSimply Blue Safe Stainで染色することによって、分析した。レーン1、0.5時間時のバッファ；レーン2、0.5時間時のt-PA；レーン3、0.5時間時のヘプシン；レーン4、5時間時のバッファ；レーン5、5時間時のt-PA；レーン6、5時間時のヘプシン。プラスミノゲン(Plg)およびプラスミン重鎖(h.c)の位置を下線で示す。

【図3】ヘプシンおよびHGF Aによって、活性化されるプロHGFによるMetのリン酸化。(A) 非標識プロHGF(0.3 mg/ml)を、95%より大きく変換されるように40 nMのヘプシン又は40 nMのHGF Aによって、切断した。ヘプシン切断(HGF_{hepsin})によって、及び、HGF A切断(HGF_{HGF A})により生産されるHGFを、SDS-PAGE(還元条件)の後に、Simply Blue Safe Stainで染色して分析した。(B) Metレセプターのリン酸化を、漸増濃度のHGF_{hepsin}(), HGF_{HGF A}(), 又はHGFの非切断短鎖形態であるs c HGF()にA549細胞を曝すことによるKIRAアッセイにおいて、測定した。活性は、HGF対照調製物で得られた最大のシグナルの割合をして表した。値は、3回の実験の平均 ± SDである。

【図4】ヘプシン(HGF_{hepsin})およびHGF A(HGF_{HGF A})によって、活性化されたプロHGFによる細胞増殖および移動。(A) HGF_{hepsin}(黒色棒)およびHGF_{HGF A}(白色棒)の漸増濃度下におけるB x P C 3細胞の細胞増殖。値は、2回の実験の平均である。(B) トランスウェル細胞移動システムの下部チャンバに添加したHGF_{hepsin}(黒色棒)およびHGF_{HGF A}(白色棒)の濃度増大により刺激される細胞移動の数量。値は、3回の実験の平均 ± SDである。増殖および移動アッセイの活性は、それぞれの実験で用いられる100 ng/mlの対照のHGF調整物に曝した対照細胞の割合として表した。

【図5】アミノリシスアッセイにおけるヘプシン酵素活性の障害。ヘプシン(0.4 nM)を、インヒビターとともに室温で30分間インキュベートし、S2366(0.2 mM ~ K_m)に対する酵素活性を動態学的マイクロプレート読み取り機にて測定した。() s H A I - 1 B、() s H A I - 1 B (R 2 6 0 A)、() s H A I - 2、() s H A I - 1 B (K 4 0 1 A)。

【図6】s H A I - 1 Bの変異体及びs H A I - 2によるプロHGF活性化の障害。¹²⁵I標識プロHGF(0.05 mg/ml)を、ヘプシン(15 nM)およびインヒビターとともに37 °C で4時間インキュベートした。反応液分割量は、図1にて説明したように分析した。15 nMのヘプシンを各々の試料に加えた。インヒビターは1 μMであった。レーン1、t = 0の分割量；レーン2、インヒビターなし；レーン3、s H A I - 1 B；レーン4、s H A I - 1 B (R 2 6 0 A)；レーン5、s H A I - 1 B (K 4 0 1 A)；レーン6、s H A I - 2。プロHGF、HGF 鎖およびHGF 鎖(二重線)の位置を下線で示した

10

20

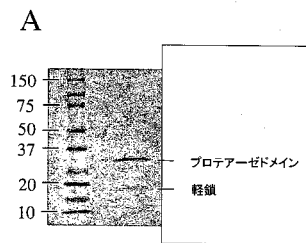
30

40

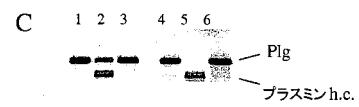
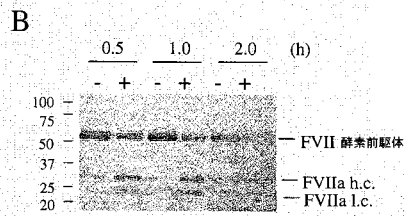
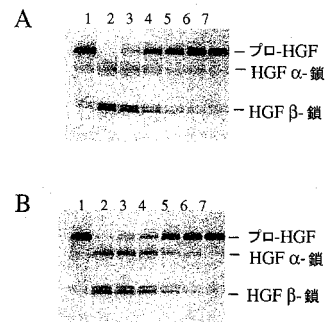
50

。【図7】天然のヒトヘプシンのアミノ酸配列の一実施態様。
【図8】天然のヒトヘプシンのアミノ酸配列の他の実施態様。

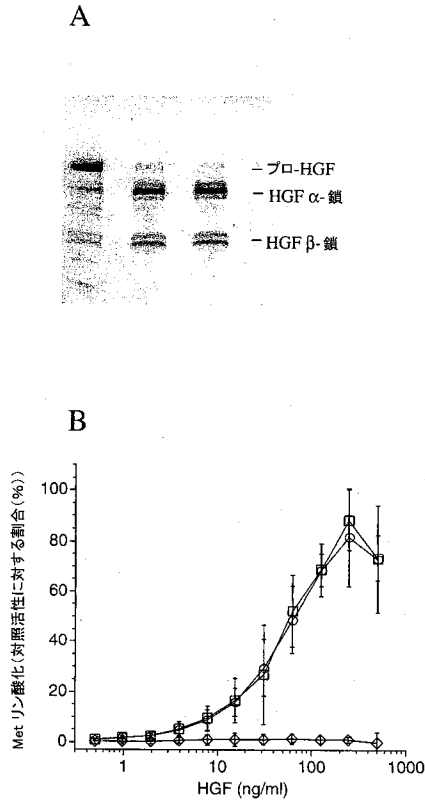
【図1】



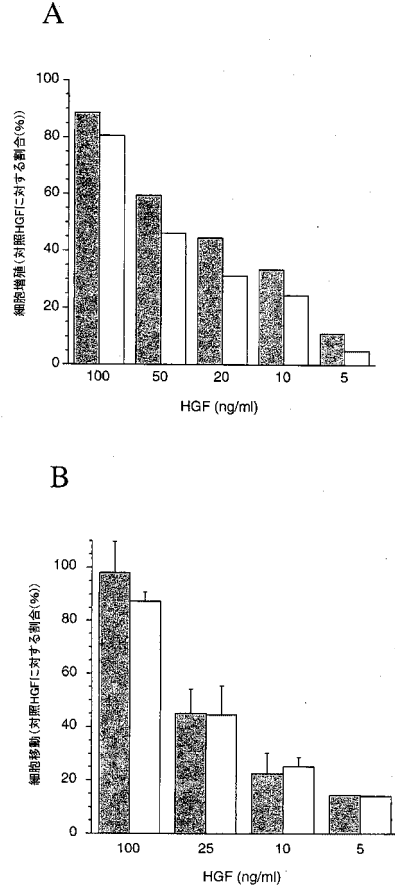
【図2】



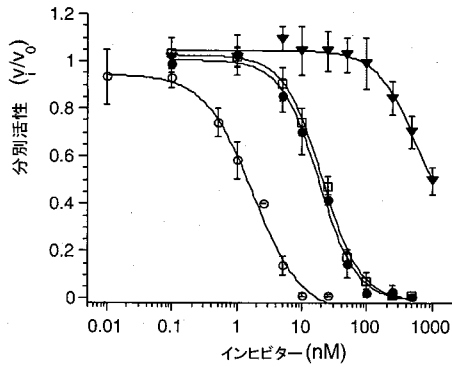
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 7 】

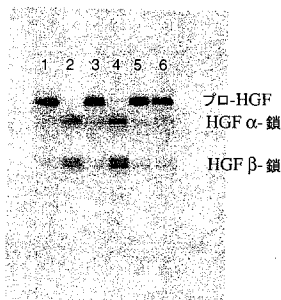
```

MAQKEGGRTPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIVAVLLRSDQPLYPVQVSSAD
ARLMVFDKTEGTWRLCSSRSKARVAGLSCCEEMGFRLALHSELVNRITAGANGTSGPCV
DEGRLPHTQLLEVISVCDPRGRFLAICQDCGRRLKLPVDRIVGGDRDLSLGRWPWQVSL
RYDGAHLCCGSLLSGDWVLTAAHCFERNRVLRSRWVFAQAVAAQASPHQLQGVQAVVYH
GGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSPLPLTEYIQVCLPAACQALVDGKICTVTGWGNTQ
YYGQAGVLEARVPHISNDVNCGADFYGNQIKPKMPCAGYPEGGIDACQGDSDGPFVCE
DSISRTPKRWLCGVSWGTGCALAQKPGVYTKVSDFRWFQAIKTHSEASGMVTQL

```

(配列番号:1)

【 図 6 】



【 8 】

A

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Gln | Lys | Glu | Gly | Gly | Arg | Thr | Val | Pro | Cys | Cys | Ser | Arg | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Thr | Ala | Gly | Thr | Leu | Leu | Leu | Thr | Ala | Ile | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Gly | Ala | Ala | Ser | Trp | Ala | Ile | Val | Ala | Val | Leu | Leu | Arg | Ser | Asp | Gln |
| | | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | |
| Glu | Pro | Leu | Tyr | Pro | Val | Gln | Val | Ser | Ser | Ala | Asp | Ala | Arg | Leu | Met |
| 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | | | | 65 | |
| Val | Phe | Asp | Lys | Thr | Glu | Gly | Thr | Trp | Arg | Leu | Leu | Cys | Ser | Ser | Arg |
| 65 | | | | 70 | | | | 75 | | | | | | 80 | |
| Ser | Asn | Ala | Arg | Val | Ala | Gly | Leu | Ser | Cys | Glu | Glu | Met | Gly | Phe | Leu |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | |
| Arg | Ala | Leu | Thr | His | Ser | Glu | Leu | Asp | Val | Arg | Thr | Ala | Gly | Ala | Asn |
| | | | | 100 | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Gly | Thr | Ser | Gly | Phe | Phe | Cys | Val | Asp | Glu | Gly | Arg | Leu | Pro | His | Thr |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | |
| Gln | Arg | Leu | Leu | Glu | Val | Ile | Ser | Val | Cys | Asp | Cys | Pro | Arg | Gly | Arg |
| 130 | | | | 135 | | | | 140 | | | | | | 145 | |
| Phe | Leu | Ala | Ala | Ile | Cys | Gln | Gly | Glu | Ile | Leu | Lys | Leu | Arg | Thr | Leu |
| | | | | 150 | | | | 155 | | | | | | 160 | |
| Ser | Phe | Arg | Pro | Leu | Gly | Arg | Pro | Arg | Pro | Leu | Lys | Leu | Pro | Arg | Met |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | |
| Gly | Pro | Cys | Thr | Phe | Arg | Pro | Pro | Arg | Ala | Gly | Pro | Ser | Leu | Gly | Ser |
| | | | | 180 | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| Gly | Asp | Leu | Gly | Ser | Ser | Pro | Leu | Ser | Pro | Pro | Pro | Ala | Asp | Pro | Cys |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | |
| Pro | Thr | Asp | Cys | Gly | Arg | Arg | Lys | Leu | Pro | Val | Asp | Arg | Ile | Val | Gly |
| | | | | 210 | | | | 215 | | | | | | 220 | |
| Gly | Arg | Asp | Thr | Ser | Leu | Gly | Arg | Trp | Pro | Trp | Gln | Val | Ser | Leu | Arg |
| 225 | | | | 230 | | | | 235 | | | | | | 240 | |

B

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Asp | Gly | Ala | His | Leu | Cys | Gly | Gly | Ser | Leu | Leu | Ser | Gly | Asp | Trp |
| | | | | 245 | | | | 250 | | | | | | 255 | |
| Val | Leu | Thr | Ala | Ala | His | Cys | Phe | Pro | Glu | Arg | Asn | Arg | Val | Leu | Ser |
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | | | 270 | |
| Arg | Trp | Arg | Val | Phe | Ala | Gly | Ala | Val | Ala | Gln | Ala | Ser | Pro | His | Gly |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | |
| Leu | Gln | Leu | Gly | Val | Gln | Ala | Val | Val | Tyr | His | Gly | Gly | Tyr | Leu | Pro |
| 290 | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | 305 | |
| Phe | Arg | Asp | Pro | Asn | Ser | Glu | Glu | Asn | Ser | Asn | Asp | Ile | Ala | Leu | Val |
| | | | | 310 | | | | 315 | | | | | | 320 | |
| His | Leu | Ser | Ser | Pro | Leu | Pro | Leu | Thr | Glu | Tyr | Ile | Gln | Pro | Val | Cys |
| | | | | 325 | | | | 330 | | | | | | 335 | |
| Leu | Pro | Ala | Ala | Gly | Gln | Ala | Leu | Val | Asp | Gly | Lys | Ile | Cys | Thr | Val |
| | | | | 340 | | | | 345 | | | | | | 350 | |
| Thr | Gly | Trp | Gly | Asn | Thr | Gln | Tyr | Tyr | Gly | Gln | Gln | Ala | Gly | Val | Leu |
| | | | | 355 | | | | 360 | | | | | | 365 | |
| Gln | Glu | Ala | Arg | Val | Pro | Ile | Ile | Ser | Asn | Asp | Val | Cys | Asn | Gly | Ala |
| | | | | 370 | | | | 375 | | | | | | 380 | |
| Asp | Phe | Tyr | Gly | Asn | Gln | Ile | Lys | Pro | Lys | Met | Phe | Cys | Ala | Gly | Tyr |
| | | | | 385 | | | | 390 | | | | | | 395 | |
| Pro | Glu | Gly | Gly | Ile | Asp | Ala | Cys | Gln | Gly | Asp | Ser | Gly | Gly | Pro | Phe |
| | | | | 405 | | | | 410 | | | | | | 415 | |
| Val | Cys | Glu | Asp | Ser | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Arg | Trp | Arg | Leu | Cys | Gly |
| | | | | 420 | | | | 425 | | | | | | 430 | |
| Ile | Val | Ser | Trp | Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Leu | Ala | Gln | Lys | Pro | Gly | Val |
| | | | | 435 | | | | 440 | | | | | | 445 | |
| Tyr | Thr | Lys | Val | Ser | Asp | Phe | Arg | Glu | Trp | Ile | Phe | Gln | Ala | Ile | Lys |
| | | | | 450 | | | | 455 | | | | | | 460 | |
| Thr | His | Ser | Glu | Ala | Ser | Gly | Met | Val | Thr | Gln | Leu | | | | |
| 465 | | | | 470 | | | | 475 | | | | | | | |

(配列番号 :2)

フロントページの続き

- (72)発明者 モラン, ポール, エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530-3345, エルセリト シー ヴュー ドライヴ
112
- (72)発明者 ピーク, マーク デイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94591, バレーオ, グレイシャー コート 3912

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 J. Biol. Chem., 2003年, Vol. 278, No. 38, pp.36341-36349
J. Biol. Chem., 1997年, Vol. 272, No. 44, pp.27558-27564
J. Biol. Chem., 2002年, Vol. 277, No. 49, pp.47804-47809
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993年, Vol. 90, pp.7181-7185
EMBO J., 1992年 7月, Vol. 11, No. 7, pp.2503-2510

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)