

TGTCAAGCTCAAAATCAACCAACCACTGGGAGAGAAAGCTCTGGGGGCTCAGAGGTCTCTC
 CAGACTCTGCTGTCAACACTCTCTCTCTCTCTGCTGCTGCTGTCTGTCTCAGGGCCCT
 GGGTCCAGGGCCCTCTGGATGATCAAGAAGTCCAGCACTATGTAGTGTGAGCTCTGGGGAGA
 GAGCCCACTCTCAATGCTCCGCACTATAGCAAGACAAGCGCAACTCATCTGGTGGCGC
 GTCTCCTATGGCACTACAGCTGGCCCCCTAGTCTTGGGGCCGGGCGAGGACCCCAAT
 GGTACGCTGATCATCCAGAAATGTGAACAAGAGCACTGGGGGCACTCTCTGCTGGGGTCT
 CAGGAGAGGACAACAGTATATACCAAGCTCTGCGCAAGCACTATCTCGGTGTGGGCGGCG
 CCCCCCAAGCTCTTCTGCACTATGGGGAGGGCACTCAAGAACCCGAATCTCTCAGAGCCGAG
 GGGATCATCTCTCTTCTGTGGCGGTGTGTCTGGAGCAGCTGTGCTTGTACAGAAACAT
 TGGCAAGACGAGAAGCTCGGTGTGGATCGCGGGATGAATATGAAGATGAAATCACTTAT
 GAGAGCTGAACACTGCAAGCTGCTCATGATATGAGGACACTCTCCGGGCGCTCCAGGCG
 ACCTACAGAGATATGAGGAGCTCAACATAGGAGATGTCACTGAGTGGAGAAGGCCATCAC
 CCTACTCTCTCGAGGCTGCCGCCCGCTGCTGTCAACCGCACTCAGATGTCTCAGCTACAT
 TCTTCTGGGACATCTCTCTCAGGCCCTCTGGGGGCTCTTACTGATCATATCCCCCACT
 GGGGGTGGGGAGGTAACTCACTTCTCCAGCGAGGCGCTCTGTGGAATCTCCCTGGAGG
 GTGTGCGACTCTTCTCTCCATTAACCTGCCGCCGCTCTCAACTCACTTCTCCCAAGCCGCG
 TGCCCTTCCAGGCTCCCTCTCAGGCGGTAATGAGCCCTTAATGCTGTCTCATAGG
 GAGTGATGTAGCAGCTCTCTTGTAGTGTGACACCCCTCTCTGATCTCAGGGCCACT
 TGCTGATATAATTTCTCCCACTGC

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする DNA 分子；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする DNA 分子であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードする DNA 分子であって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードする DNA 分子であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列；

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域；又は

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) の相補鎖に対し、少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つヌクレオチド配列を有する、単離された核酸。

【請求項 2】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列であって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列；

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域；又は

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) の相補鎖を有する単離された核酸。

【請求項 3】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列

番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードする核酸であって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードする核酸であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの、

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列；

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域；又は

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) の相補鎖にハイブリダイズする、単離された核酸。

【請求項 4】

ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーションが起こる、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】

少なくとも約 5 ヌクレオチド長である、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 6】

請求項 1、2 又は 3 の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 7】

前記核酸が、ベクターで形質転換した宿主細胞によって認識されるコントロール配列に対して作用可能に連結している、請求項 6 に記載の発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

CHO 細胞、大腸菌又は酵母細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

ポリペプチドの生産方法において、前記ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記ポリペプチドを回収する方法。

【請求項 11】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの、；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

10

20

30

40

50

に対し、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を持つ、単離されたポリペプチド。

【請求項 1 2】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 1 3】

異種ポリペプチドに融合した請求項 1 1 又は 1 2 に記載のポリペプチドを含むキメラポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記異種ポリペプチドが、免疫グロブリンのエピトープタグ配列又は F c 領域である、請求項 1 3 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 1 5】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を持つポリペプチドに結合する、単離された抗体。

【請求項 1 6】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する、単離された抗体。

【請求項 17】

モノクローナル抗体である、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 18】

抗体断片である、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 19】

キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 20】

増殖抑制剤にコンジュゲートする、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 21】

細胞傷害剤にコンジュゲートする、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 22】

細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 24】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 25】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 26】

細菌中で生産される、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 27】

CHO 細胞中で生産される、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 28】

結合する細胞に死滅を誘発する、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

検出可能に標識される、請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体。

【請求項 30】

請求項 15、16、334 から 338 又は 339 から 347 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を有する、単離された核酸。

【請求項 31】

ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に連結している、請求項 30 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 33】

CHO 細胞、大腸菌又は酵母細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

請求項 32 に記載の宿主細胞を、前記抗体の発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記抗体を回収する、抗体生産方法。

【請求項 35】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する、単離されたオリゴペプチド。

【請求項 36】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列

10

20

30

40

50

番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列

を有するポリペプチドに結合する、単離されたオリゴペプチド。

【請求項 37】

増殖抑制剤にコンジュゲートする、請求項 35 又は 36 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 38】

細胞傷害剤にコンジュゲートする、請求項 35 又は 36 に記載のオリゴペプチド。

10

【請求項 39】

細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 38 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 40】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 38 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 41】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 40 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 42】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 40 に記載のオリゴペプチド。

20

【請求項 43】

結合する細胞に死滅を誘発する、請求項 35 又は 36 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 44】

検出可能に標識される、請求項 35 又は 36 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 45】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

30

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

40

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する T A H O 結合有機分子。

【請求項 46】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連

50

するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列

を有するポリペプチドに結合する請求項 4 5 に記載の有機分子。

【請求項 4 7】

増殖抑制剤にコンジュゲートする、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の有機分子。

【請求項 4 8】

細胞傷害剤にコンジュゲートする、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の有機分子。

【請求項 4 9】

細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 4 8 に記載の有機分子。

【請求項 5 0】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 4 8 に記載の有機分子。

【請求項 5 1】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 5 0 に記載の有機分子。

【請求項 5 2】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 5 0 に記載の有機分子。

【請求項 5 3】

結合する細胞に死滅を誘発する、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の有機分子。

【請求項 5 4】

検出可能に標識される、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の有機分子。

【請求項 5 5】

(a) 請求項 1 1 に記載のポリペプチド；

(b) 請求項 1 2 に記載のポリペプチド；

(c) 請求項 1 5 に記載の抗体；

(d) 請求項 1 6 に記載の抗体；

(e) 請求項 3 3 2 に記載の抗体；

(f) 請求項 3 3 3 に記載の抗体；

(g) 請求項 3 3 4 に記載の抗体；

(h) 請求項 3 3 5 に記載の抗体；

(i) 請求項 3 3 6 に記載の抗体；

(j) 請求項 3 5 に記載のオリゴペプチド；

(k) 請求項 3 6 に記載のオリゴペプチド；

(l) 請求項 4 5 に記載の T A H O 結合有機分子；又は

(m) 請求項 4 6 に記載の T A H O 結合有機分子

を担体と組み合わせて含む組成物。

【請求項 5 6】

前記担体は製薬的に許容可能な担体である、請求項 5 5 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

10

20

30

40

50

(a) 容器：及び

(b) 前記容器中に収容される請求項 55 に記載の組成物を含む生産品。

【請求項 58】

前記組成物が癌の治療又は診断的検出に使用できることを記載した、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器内に含まれるパッケージ挿入物を更に含む、請求項 57 に記載の生産品。

【請求項 59】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

10

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

20

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞の、増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子に接触させ、前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の、前記タンパク質に対する結合により、前記細胞の増殖を阻害する方法。

30

【請求項 60】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記抗体が抗体断片である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 62】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 63】

前記抗体が配列番号 11 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 64】

40

前記抗体が配列番号 34 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 32 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 65】

前記抗体が配列番号 42 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 40 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 66】

前記抗体が表 24 に記載の任意の ATCC 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 67】

前記抗体が配列番号 16 及び配列番号 17 のアミノ酸配列からなる群から選択されるア

50

ミノ酸配列に結合する、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 68】

前記細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 69】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 70】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 71】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 72】

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 73】

前記抗体が CHO 細胞中で生産される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 74】

前記細胞が造血細胞である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 75】

前記造血細胞が、リンパ球、白血球、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞からなる群より選択される、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

前記リンパ球が B 細胞又は T 細胞である、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記リンパ球が癌細胞である、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 78】

前記癌細胞を、更に放射線治療又は化学療法剤に曝す、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記癌細胞が、リンパ腫細胞、骨髄腫細胞及び白血病細胞かなる群より選択される、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 80】

前記タンパク質が、非造血細胞より造血細胞に多く発現する、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 81】

前記細胞の死滅を誘発する、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 82】

前記タンパク質が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

10

20

30

40

50

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列を有する、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 83】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞を含む癌性腫瘍を持つ哺乳動物の治療法であって、前記哺乳動物に対し、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子の治療的有効量を投与することにより、前記哺乳動物を効果的に治療する方法。

【請求項 84】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記抗体が抗体断片である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 86】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 87】

前記抗体が配列番号 11 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 88】

前記抗体が配列番号 34 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 32 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 89】

前記抗体が配列番号 42 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 40 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 90】

前記抗体が表 24 に記載の任意の ATCC 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 91】

前記抗体が配列番号 16 及び配列番号 17 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 92】

前記細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択

10

20

30

40

50

される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 93】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 94】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 96】

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 83 に記載の方法。

10

【請求項 97】

前記抗体が CHO 細胞中で生産される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 98】

前記腫瘍を、更に放射線治療又は化学療法剤に曝す、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 99】

前記腫瘍が、リンパ腫、白血病、又は骨髓腫である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 100】

前記タンパク質が、前記腫瘍の非造血細胞より造血細胞に多く発現する、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 101】

20

前記タンパク質が、前記腫瘍の正常造血細胞より前記腫瘍の癌性造血細胞に多く発現する、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記タンパク質が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチド細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

30

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチド細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列

40

を有する、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 103】

タンパク質を有すると思われる試料中における前記タンパク質の存在を決定する方法であって、前記タンパク質が：

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチ

50

ドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有し、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド又は有機分子に前記試料を曝し、前記試料中の前記タンパク質に対する前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合を測定することを含み、前記タンパク質に前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が結合することにより、前記試料中における前記タンパク質の存在が示される方法。

【請求項 104】

前記試料が、前記タンパク質を発現すると思われる細胞を含む、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記細胞が癌細胞である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 106】

前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子を検出可能に標識する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 107】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 108】

前記抗体が抗体断片である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 109】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 110】

前記抗体が配列番号 11 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 111】

前記抗体が配列番号 34 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 32 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 112】

前記抗体が配列番号 40 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号 42 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 113】

前記抗体が表 24 に記載の任意の A T C C 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 114】

前記抗体が配列番号 16 及び配列番号 17 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 115】

10

20

30

40

50

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 116】

前記抗体が CHO 細胞中で生産される、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 117】

前記タンパク質が、前記腫瘍の非造血細胞より造血細胞に多く発現する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 118】

前記タンパク質が、前記腫瘍の正常造血細胞より前記腫瘍の癌性造血細胞に多く発現する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 119】

前記タンパク質が：

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるアミノ酸配列

を有する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 120】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対し、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の発現又は活性の増大に関連する増殖性傷害の治療又は予防法であって、そのような治療を要する患者に対し

10

20

30

40

50

、前記タンパク質のアンタゴニストの有効量を投与することにより、前記細胞増殖性傷害を効果的に治療又は予防する方法。

【請求項 1 2 1】

前記細胞増殖性傷害が癌である、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記アンタゴニストが、抗 T A H O ポリペプチド抗体、T A H O 結合オリゴペプチド、T A H O 結合有機分子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記抗 T A H O ポリペプチド抗体が配列番号：1 1 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 0 の方法。

【請求項 1 2 4】

前記抗体が配列番号：3 4 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：3 2 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 0 の方法。

【請求項 1 2 5】

前記抗体が配列番号：4 2 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：4 0 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 0 の方法。

【請求項 1 2 6】

前記抗 T A H O ポリペプチド抗体が表 2 4 に記載の任意の A T C C 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記抗 T A H O ポリペプチド抗体が配列番号：1 6 及び配列番号：1 7 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード領域によってコードされるポリペプチド

に対して少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞に、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を結合させる方法において、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、細胞傷害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、又は増殖阻害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子を前記細胞に接触させ、前記タンパク質に抗体、オリゴペプチド又は有機分子を結合させることにより、前記抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、細胞傷害剤にコンジュゲート化した前記抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、又は増殖

10

20

30

40

50

阻害剤にコンジュゲート化した前記抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子の前記タンパク質への結合を起こし、前記細胞に結合させる方法。

【請求項 1 2 9】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記抗体が抗体断片である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記抗体が配列番号：11の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：9の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 8 の方法。 10

【請求項 1 3 3】

前記抗体が配列番号：34の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：32の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 8 の方法。

【請求項 1 3 4】

前記抗体が配列番号：42の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：40の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 1 2 8 の方法。

【請求項 1 3 5】

前記抗体が表 2 4 に記載の任意の A T C C 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 1 2 8 に記載の方法。 20

【請求項 1 3 6】

前記抗 T A H O ポリペプチド抗体が配列番号：16及び配列番号：17のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 1 2 8 に記載の方法。 30

【請求項 1 4 0】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記抗体が C H O 細胞中で生産される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記細胞が造血細胞である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記造血細胞が、リンパ球、白血球、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞からなる群より選択される、請求項 1 4 3 に記載の方法。 40

【請求項 1 4 5】

前記リンパ球が B 細胞又は T 細胞である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記リンパ球が癌細胞である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記癌細胞を、更に放射線治療又は化学療法剤に曝す、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記癌細胞が、白血病細胞、リンパ腫細胞、及び骨髓腫細胞からなる群より選択される 50

、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記タンパク質が、非造血細胞より造血細胞に多く発現する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記細胞の死滅を誘発する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 から 5 又は請求項 3 0 の何れかに記載の核酸の使用法。

【請求項 1 5 2】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 から 5 又は請求項 3 0 の何れかに記載の核酸の使用法。

【請求項 1 5 3】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 1 から 5 の何れかに記載の核酸の使用法。

【請求項 1 5 4】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 6 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 1 5 5】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 6 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 1 5 6】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 6 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 1 5 7】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 8 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 1 5 8】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 8 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 1 5 9】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 8 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 1 6 0】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 1 6 1】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 1 6 2】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 1 6 3】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 5、1 6、3 3 4 から 3 3 8 又は 3 3 9 から 3 4 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 1 6 4】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 5、1 6、3 3 4 から 3 3 8 又は 3 3 9 から 3 4 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 1 6 5】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 1 5、1 6、3 3 4 から 3 3 8 又は 3 3 9 から 3 4 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 1 6 6】

10

20

30

40

50

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 1 6 7】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 1 6 8】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 1 6 9】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 1 7 0】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 1 7 1】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 1 7 2】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 5 に記載の組成物の使用法。

【請求項 1 7 3】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 5 に記載の組成物の使用法。

【請求項 1 7 4】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 5 に記載の組成物の使用法。

【請求項 1 7 5】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 7 に記載の生産品の使用法。

【請求項 1 7 6】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 8 に記載の生産品の使用法。

【請求項 1 7 7】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 8 に記載の生産品の使用法。

【請求項 1 7 8】

細胞の増殖阻害方法であって、前記細胞の増殖が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

10

20

30

40

50

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード化ドメインによってコードされるポリペプチド

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の増殖促進効果に、少なくとも部分的に依存しており、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、前記タンパク質に結合する細胞傷害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、又は増殖阻害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子を前記細胞に接触させ、前記細胞の増殖を阻害する方法。

【請求項 179】

前記細胞が造血細胞である、請求項 178 に記載の方法。

10

【請求項 180】

前記タンパク質が前記細胞によって発現される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 181】

前記タンパク質への前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合が、前記タンパク質の細胞増殖促進活性をアンタゴナイズする、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 182】

前記タンパク質への前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合が前記細胞の死滅を誘発する、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 183】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 178 に記載の方法。

20

【請求項 184】

前記抗体が抗体断片である、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 185】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 186】

前記抗体が配列番号：11 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 178 の方法。

【請求項 187】

前記抗体が配列番号：34 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：32 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 178 の方法。

30

【請求項 188】

前記抗体が配列番号：42 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：40 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 178 の方法。

【請求項 189】

前記抗体が表 78 に記載の任意の ATCC 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 190】

前記抗体が配列番号：16 及び配列番号：17 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 191】

前記細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 178 に記載の方法。

40

【請求項 192】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 193】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 194】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 195】

50

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 196】

前記抗体が CHO 細胞中で生産される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 197】

前記タンパク質が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列を有する、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 198】

哺乳動物の腫瘍を治療する方法であって、前記腫瘍の増殖が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連するシグナルペプチドを欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されたヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されたヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるポリペプチド

に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の増殖促進効果に少なくとも部分的に依存し、前記タンパク質に結合する抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、前記タンパク質に結合する細胞傷害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子、又は増殖阻害剤にコンジュゲート化した抗体、オリゴペプチド若しくは有機分子を前記細胞に接触させ、前記腫瘍を効果的に治療する方法。

【請求項 199】

前記タンパク質が前記腫瘍の細胞によって発現される、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 200】

前記タンパク質への前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合が、前記タンパク質の細胞増殖促進活性をアンタゴナイズする、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 201】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 202】

前記抗体が抗体断片である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 203】

前記抗体がキメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 204】

前記抗体が配列番号：11 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 198 の方法。

【請求項 205】

前記抗体が配列番号：34 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：32 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 198 の方法。

【請求項 206】

前記抗体が配列番号：42 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：40 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体である、請求項 198 の方法。

【請求項 207】

前記抗体が表 78 に記載の任意の ATCC 受託番号の下に寄託された単離された抗体である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 208】

前記抗体が配列番号：16 及び配列番号：17 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 209】

前記細胞傷害剤が、毒素、抗体、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 210】

細胞傷害剤が毒素である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 211】

毒素が、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項 210 に記載の方法。

【請求項 212】

毒素がメイタンシノイドである、請求項 210 に記載の方法。

【請求項 213】

前記抗体が細菌中で生産される、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 214】

前記抗体が CHO 細胞中で生産される、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 215】

前記タンパク質が、

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(c) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を伴うもの；

(d) 図 2 (配列番号 2)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6) 及び図 8 (配列番号 8) に示すアミノ酸配列からなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインの

10

20

30

40

50

アミノ酸配列であって、その関連するシグナルペプチド配列を欠くもの；

(e) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；又は

(f) 図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 5 (配列番号 5) 及び図 7 (配列番号 7) に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列

を有する、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 216】

請求項 13 に記載のキメラポリペプチドを含む組成物。

10

【請求項 217】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 30 に記載の核酸の使用法。

【請求項 218】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 7 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 219】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 31 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 220】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 7 に記載の発現ベクターの使用法。

20

【請求項 221】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 31 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 222】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 7 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 223】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 31 に記載の発現ベクターの使用法。

【請求項 224】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 9 に記載の宿主細胞の使用法。

30

【請求項 225】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 32 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 226】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 33 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 227】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 9 に記載の宿主細胞の使用法。

40

【請求項 228】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 32 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 229】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 33 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 230】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 9 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 231】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 32 に記載の宿主細胞の使用法。

50

【請求項 2 3 2】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 3 3 に記載の宿主細胞の使用法。

【請求項 2 3 3】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 3 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 4】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 4 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 5】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 3 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 6】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 4 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 7】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 1 3 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 8】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 1 4 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 2 3 9】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 0】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 8 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 1 9 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 2】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 0 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 3】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 1 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 4】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 2 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 5】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 3 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 6】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 4 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 7】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 5 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 8】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 6 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 4 9】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 5 0】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 8 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 5 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 2 9 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 5 2】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 7 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 5 3】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 1 8 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 5 4】

10

20

30

40

50

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 19 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 255】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 20 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 256】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 21 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 257】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 22 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 258】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 23 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 259】	10
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 24 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 260】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 25 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 261】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 26 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 262】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 27 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 263】	
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 28 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 264】	20
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 29 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 265】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 17 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 266】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 18 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 267】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 17 に記載の抗体の使用法。	30
【請求項 268】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 18 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 269】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 19 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 270】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 20 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 271】	40
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 21 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 272】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 22 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 273】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 23 に記載の抗体の使用法。	
【請求項 274】	
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 24 に記載の抗体の使用法。	50

用法。

【請求項 2 7 5】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 2 5 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 7 6】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 2 6 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 7 7】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 2 7 に記載の抗体の使用法。

10

【請求項 2 7 8】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 2 8 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 7 9】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 2 9 に記載の抗体の使用法。

【請求項 2 8 0】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 3 7 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 3 8 に記載のオリゴペプチドの使用法。

20

【請求項 2 8 2】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 3 9 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 3】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 0 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 4】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 1 に記載のオリゴペプチドの使用法。

30

【請求項 2 8 5】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 2 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 6】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 3 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 7】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 4 に記載のオリゴペプチドの使用法。

40

【請求項 2 8 8】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 3 7 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 8 9】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 3 8 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 9 0】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 3 9 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 9 1】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 0 に記載のオリゴペプチドの使用法。

【請求項 2 9 2】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 1 に記載のオリゴペプチドの使用法。

50

- 【請求項 2 9 3】
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 2 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 4】
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 3 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 5】
腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 4 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 6】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 3 7 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 7】 10
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 3 8 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 8】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 3 9 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 2 9 9】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 0 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 3 0 0】 20
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 1 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 3 0 1】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 2 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 3 0 2】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 3 に記載のオリゴペプチドの使用法。
- 【請求項 3 0 3】
細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 4 に記載のオリゴペプチドの使用法。 30
- 【請求項 3 0 4】
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 7 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 0 5】
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 8 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 0 6】
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 4 9 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 0 7】 40
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 0 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 0 8】
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 1 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 0 9】
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 2 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。
- 【請求項 3 1 0】 50
癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 3 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

機分子の使用法。

【請求項 3 1 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 4 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 2】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 7 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 3】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 8 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

10

【請求項 3 1 4】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 4 9 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 5】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 0 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 6】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 1 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 7】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 2 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

20

【請求項 3 1 8】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 3 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 1 9】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 4 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 0】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 7 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

30

【請求項 3 2 1】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 8 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 2】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 4 9 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 3】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 0 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

40

【請求項 3 2 4】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 1 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 5】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 2 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 6】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 3 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 7】

50

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 4 に記載の T A H O 結合有機分子の使用法。

【請求項 3 2 8】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 6 に記載の組成物の使用法。

【請求項 3 2 9】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 6 に記載の組成物の使用法。

【請求項 3 3 0】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 6 に記載の組成物の使用法。

【請求項 3 3 1】

癌の治療又は診断的検出用の薬物の調製における、請求項 5 8 に記載の生産品の使用法。

【請求項 3 3 2】

腫瘍の治療用の薬物の調製における、請求項 5 8 に記載の生産品の使用法。

【請求項 3 3 3】

細胞増殖性傷害の治療又は予防用の薬物の調製における、請求項 5 8 に記載の生産品の使用法。

【請求項 3 3 4】

配列番号：1 1 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：9 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体。

【請求項 3 3 5】

配列番号：3 4 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：3 2 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体。

【請求項 3 3 6】

配列番号：4 2 の核酸配列によってコードされる重鎖及び配列番号：4 0 の核酸配列によってコードされる軽鎖を含む単離された抗体。

【請求項 3 3 7】

表 2 4 に示される任意の A T C C 受託番号の下に寄託された単離された抗体。

【請求項 3 3 8】

配列番号 1 6 及び配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列に結合する、単離された抗体。

【請求項 3 3 9】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：9 8 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項 3 4 0】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：9 7 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項 3 4 1】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：9 8 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：9 7 アミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインとを含む抗体。

【請求項 3 4 2】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：1 0 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項 3 4 3】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：9 9 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項 3 4 4】

C D 7 9 b に結合する抗体であって、配列番号：1 0 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9

10

20

30

40

50

0 %の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：99のアミノ酸配列に少なくとも90 %の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項345】

CD79bに結合する抗体であって、配列番号：102のアミノ酸配列に少なくとも90 %の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項346】

CD79bに結合する抗体であって、配列番号：101のアミノ酸配列に少なくとも90 %の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。

【請求項347】

CD79bに結合する抗体であって、配列番号：102のアミノ酸配列に少なくとも90 %の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：101のアミノ酸配列に少なくとも90 %の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。

10

【請求項348】

抗体が、一又は複数の遊離システインアミノ酸を含むシステイン改変抗体であって、ここで、システイン改変抗体が、親抗体の一又は複数のアミノ酸残基を遊離システインアミノ酸によって置換することを含む方法によって調製される、請求項15から16、334から338又は339から347の抗体。

【請求項349】

一又は複数の遊離システインアミノ酸が0.6から1.0の範囲のチオール反応性値を有する、請求項348に記載の抗体。

20

【請求項350】

チオ反応試薬との反応性が親抗体よりも高い、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

【請求項351】

前記方法が、チオール反応性の試薬とシステイン改変抗体を反応させることによってシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することをさらに含み、このとき該システイン改変抗体がチオール反応試薬との反応性において親抗体よりも高い、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

【請求項352】

一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置している、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

30

【請求項353】

抗体が、細胞傷害性剤に共有結合的に付着したシステイン改変抗体を含むイムノコンジュゲートである、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

【請求項354】

細胞傷害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤部分、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解性酵素から選択される、請求項353に記載のシステイン改変抗体。

【請求項355】

抗体が捕捉標識、検出標識又は固形支持体に共有結合的に付着されている、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

40

【請求項356】

抗体がビオチン捕捉標識に共有結合的に付着されている、請求項348に記載のシステイン改変抗体。

【請求項357】

抗体が蛍光色素検出標識に共有結合的に付着されている、請求項355に記載のシステイン改変抗体。

【請求項358】

蛍光色素が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッド及びこれらのアナログから選択される、請求項357に記載のシステイン改変抗体。

50

【請求項 359】

抗体が、³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹At、及び²¹³Biから選択される放射性核種検出標識に共有結合的に付着している、請求項 355 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 360】

抗体がキレートリガンドによって検出標識に共有結合的に付着されている、請求項 355 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 361】

キレートリガンドがDOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及びTETAから選択される、請求項 360 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 362】

アルブミン結合ペプチドを含む、請求項 15 から 16、334 から 338 又は 339 から 347 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 363】

アルブミン結合ペプチドが配列番号：246 から 250 から選択される、請求項 361 に記載の抗体。

【請求項 364】

抗体が、カバット番号付け表現法に従うところの軽鎖の15、43、110、144、168及び205と、カバット番号付け表現法に従うところの重鎖の41、88、115、118、120、171、172、282、375及び400と、EU番号付け表現法に従うところの重鎖の118、120、282、375及び400から選択される一又は複数の位置に一又は複数の遊離システインアミノ酸を更に含む、請求項 15 から 16、334 から 338 又は 339 から 347 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 365】

システインが軽鎖の位置 205 にある、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 366】

システインが重鎖の位置 118 にある、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 367】

システインが重鎖の位置 400 にある、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 368】

抗体がモノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体から選択される、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 369】

抗体断片である、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 370】

抗体断片がFab断片である、請求項 369 に記載の抗体。

【請求項 371】

キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体から選択される、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 372】

細菌において生産される、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 373】

CHO細胞において生産される、請求項 364 に記載の抗体。

【請求項 374】

CD79bタンパク質を含むことが疑われる試料においてCD79bタンパク質の存在を決定する方法であって、該試料を請求項 364 に記載の抗体にさらし、該試料中の該CD79bタンパク質への該抗体の結合を決定することを含み、このとき該タンパク質に対する抗体の結合が該試料中の該タンパク質の存在を表すものである、方法。

【請求項 375】

前記試料は、前記CD79bタンパク質を発現することが疑われる細胞を含む、請求項

10

20

30

40

50

374に記載の方法。

【請求項376】

前記細胞がB細胞である、請求項374に記載の方法。

【請求項377】

抗体が、蛍光色素、放射性同位体、ビオチン又は金属-錯体形成リガンドから選択される標識に共有結合的に付着している、請求項374に記載の方法。

【請求項378】

請求項364に記載の抗CD79b抗体と薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤とを含有する薬学的製剤。

【請求項379】

10

抗体がアウリスタチン又はメイタンシノイド薬剤部分に共有結合的に付着しており、それによって抗体薬剤コンジュゲートが形成される、請求項364に記載の抗体。

【請求項380】

抗体(Ab)とアウリスタチン又はメイタンシノイド薬剤部分(D)とを含み、このときシステイン改変抗体がリンカー部分(L)によって一又は複数の遊離システインアミノ酸によってDに付着しており、化合物が以下の式Iを有し、



ここで、pが1、2、3又は4である、請求項379に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

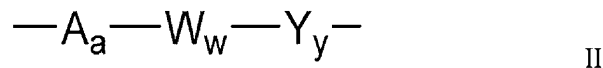
20

【請求項381】

pが2である、請求項380に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項382】

Lが以下の式を有し、



ここで：

Aがシステイン改変抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合的に付着したストレッチャー単位であり、

30

aが0又は1であり、

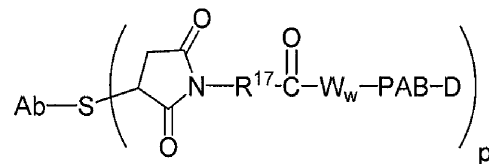
各々のWが独立したアミノ酸単位であり、

wが0から12までの整数であり、

Yが、薬剤部分に共有結合的に付着したスペーサー単位であり、yが0、1又は2である、請求項380に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項383】

以下の式を有し、



40

ここで、PABがパラ-アミノベンジルカルバモイルであり、R¹⁷が、(CH₂)_r、C₃—C₈カルボシクリル、O—(CH₂)_r、アリーレン、(CH₂)_r—アリーレン、—アリーレン—(CH₂)_r—、(CH₂)_r—(C₃—C₈—カルボシクリル)、(C₃—C₈カルボシクリル)—(CH₂)_r、C₃—C₈ヘテロシクリル、(CH₂)_r—(C₃—C₈ヘテロシクリル)、(C₃—C₈ヘテロシクリル)—(CH₂)_r—、—(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r—、—(CH₂CH₂O)_r—、—(CH₂CH₂O)_r—CH₂—、—(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r—、—(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r—CH₂—、—(CH₂C

50

$\text{H}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 、及び $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r-$ から選択される二価の基であり、このとき R^b が H 、 C_1-C_6 アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、 r がそれぞれ1から10までの整数である、請求項382に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 384】

W_w がバリリン-シトルリンである、請求項 382 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

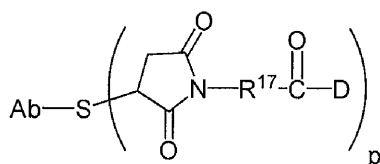
【請求項 385】

R¹⁷が(CH₂)₅又は(CH₂)₂である、請求項382に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

10

【請求項 386】

以下の式を有する、請求項 382 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



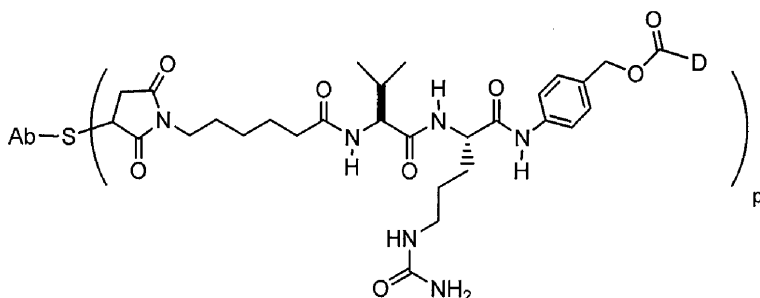
【請求項 387】

R¹⁷が(CH₂)₅又は(CH₂)₂である、請求項386に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

20

【請求項 388】

以下の式を有する、請求項 382 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



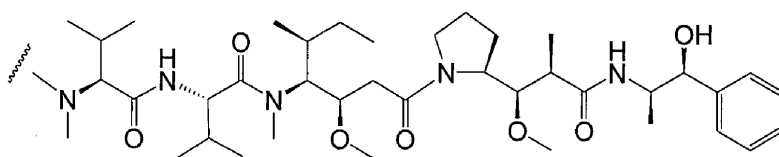
30

【請求項 389】

LがSMCC、SPP、SPDB又はBMPEOである、請求項380に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 390】

DがMMAEであり、以下の構造を有し、

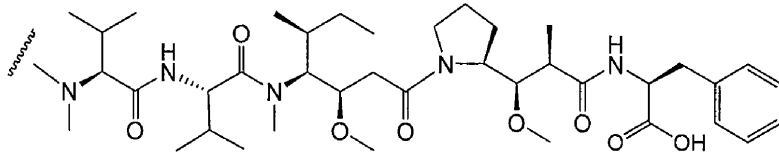


40

ここで、波形の線がリンカー L への付着部位を示す、請求項 380 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 3 9 1】

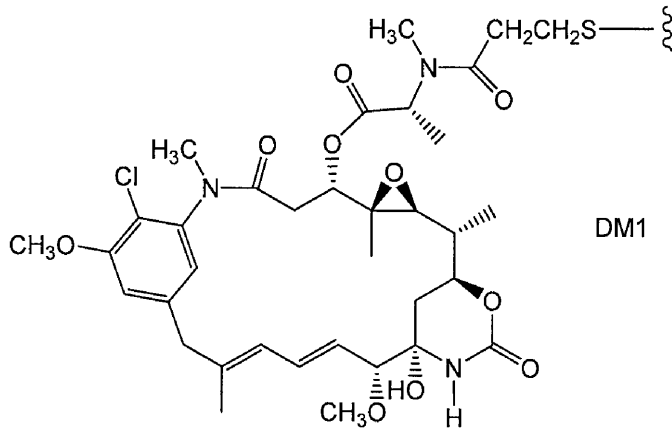
DがMMAFであり、以下の構造を有し、



ここで、波形の線がリンカー L への結合部位を示す、請求項 380 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 392】

D が DM1 であり、以下の構造を有し、



10

20

ここで、波形の線がリンカー L への結合部位を示す、請求項 380 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 393】

抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及び抗体断片から選択される、請求項 379 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 394】

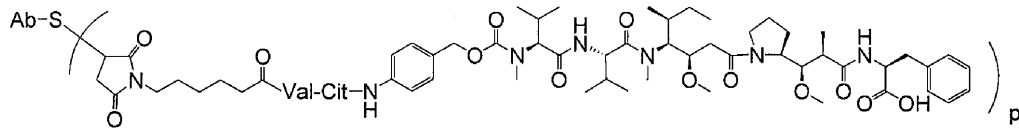
抗体断片が F a b 断片である、請求項 379 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物

。

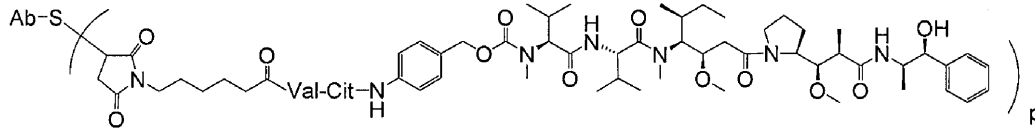
【請求項 395】

以下の構造：

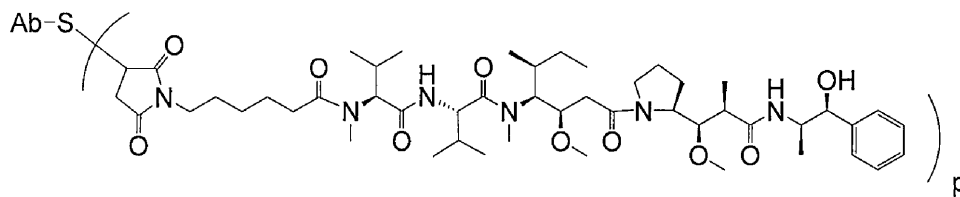
30



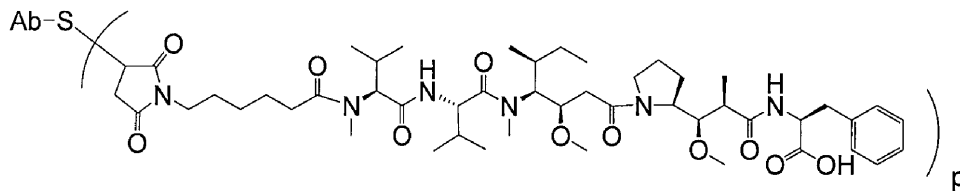
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



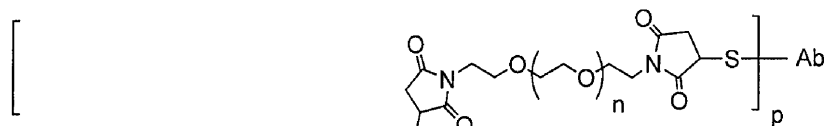
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

から選択され、

このとき、Valがバリンであり、Citがシトルリンであり、pが1、2、3又は4であり、Abが請求項364に記載の抗体である、抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項396】

アウリスタチンがMMAE又はMMAFである、請求項379に記載の抗体薬剤コンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項 397】

LがMC-v a l - c i t - P A B又はMCである、請求項 380 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項 398】

B細胞を検出するためのアッセイにおいて、

(a) 細胞を請求項 379 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物にさらし、

(b) 抗体-薬剤コンジュゲート化合物の細胞への結合の程度を決定することを含むアッセイ。

【請求項 399】

請求項 379 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物にて、細胞培養培地中の哺乳類の癌性B細胞を処置することを含み、これによって癌性B細胞の増殖が抑制される、細胞増殖の阻害方法。

【請求項 400】

請求項 379 に記載の抗体-薬剤コンジュゲートと、薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤とを含有する、薬学的製剤。

【請求項 401】

請求項 400 に記載の薬学的製剤を患者に投与することを含む、癌の治療方法。

【請求項 402】

癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、高悪性度NHL、再発性高悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 228 に記載の方法。

【請求項 403】

患者が、抗体-薬剤コンジュゲート化合物と組み合わせて細胞傷害性剤が投与される、請求項 401 に記載の方法。

【請求項 404】

請求項 400 に記載の薬学的製剤と、

容器と、

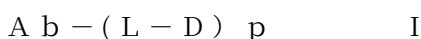
化合物がCD79bポリペプチドの過剰発現に特徴がある癌の治療に用いられることを示すパッケージ挿入物又はラベルとを具備する生産品。

【請求項 405】

癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、高悪性度NHL、再発性高悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 404 に記載の生産品。

【請求項 406】

請求項 191 に記載の抗CD79b抗体(Ab)とアウリスチン又はメイタンシノイド薬剤部分(D)とを含む抗体薬剤コンジュゲート化合物の生産方法であって、このとき該抗体がリンカー部分(L)によって一又は複数の改変システインアミノ酸によってDに結合しており、該化合物が以下の式Iを有し、



ここで、pが41、2、3又は4であり、

(a) 抗体の改変システイン基をリンカー試薬と反応させ、抗体-リンカー中間生成物Ab-Lを形成させ、そして、

(b) 活性化された薬剤部分DとAb-Lを反応させ、これによって、抗体-薬剤コンジュゲートが形成される

工程を含むか、又は、

10

20

30

40

50

(c) 薬剤部分の求核基をリンカー試薬と反応させ、薬剤－リンカー中間生成物 D－L を形成させ、

(d) D－L を抗体の改変システイン基と反応させ、これによって、抗体－薬剤コンジュゲートが形成される

工程を含む方法。

【請求項 4 0 7】

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において抗体を発現させる工程をさらに含む、請求項 4 0 6 に記載の方法。

【請求項 4 0 8】

発現された抗体を還元剤にて処理する工程をさらに含む、請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 0 9】

還元剤が T C E P 及び D T T から選択される、請求項 4 0 8 に記載の方法。

【請求項 4 1 0】

還元剤にて処理した後に、発現された抗体を酸化剤にて処理する工程をさらに含む、請求項 4 0 9 に記載の方法。

【請求項 4 1 1】

酸化剤が硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸及び空気から選択される、請求項 4 1 0 に記載の方法。

【請求項 4 1 2】

配列番号：1 2 又は 5 9 のいずれか一から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 3】

配列番号：1 0 又は 5 8 のいずれか一から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 4】

配列番号：1 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖配列と、配列番号：5 9 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列とを含む、請求項 1 9 1 に記載の抗体。

【請求項 4 1 5】

配列番号：5 8 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖配列と、配列番号：1 2 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列とを含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 6】

配列番号：4 3 又は 6 1 のいずれか一から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 7】

配列番号：4 1 又は 9 6 のいずれか一から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 8】

配列番号：4 1 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖配列と、配列番号：6 1 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列とを含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 1 9】

配列番号：9 6 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖配列と、配列番号：4 3 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖配列とを含む、請求項 3 6 4 に記載の抗体。

【請求項 4 2 0】

抗体が、

(a) 配列番号：4 のアミノ酸 2 9 から 3 9 を含むアミノ酸配列；

(b) 配列番号：8 のアミノ酸 3 0 から 4 0 を含むアミノ酸配列；又は

10

20

30

40

50

(c) 配列番号：13のアミノ酸配列29から39を含むアミノ酸配列を含む群から選択されるCD79bの領域中のエピトープに結合する、請求項15から16、334から338又は339から347の抗体。

【請求項421】

位置30、34及び36のアミノ酸がArgである、配列番号：4のアミノ酸29から39からのCD79bの領域中のエピトープに抗体が結合する、請求項420の抗体。

【請求項422】

位置35のアミノ酸がLeuである、配列番号：8のアミノ酸30から40からのCD79bの領域中のエピトープに抗体が結合する、請求項420の抗体。

【請求項423】

抗体が、CD79bの領域中のエピトープに結合し、ここで、前記エピトープが

(a) 配列番号：4のアミノ酸29から39を含むアミノ酸配列；

(b) 配列番号：8のアミノ酸30から40を含むアミノ酸配列；又は

(c) 配列番号：13のアミノ酸配列29から39を含むアミノ酸配列

に対し、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項15から16、334から338又は339から347の抗体。

【請求項424】

位置30、34及び36のアミノ酸がArgである、配列番号：4のアミノ酸29から39からのCD79bの領域中のエピトープに抗体が結合する、請求項423の抗体。

【請求項425】

位置35のアミノ酸がLeuである、配列番号：8のアミノ酸30から40からのCD79bの領域中のエピトープに抗体が結合する、請求項423の抗体。

【請求項426】

請求項15から16、334から338又は339から347の抗体に競合する抗体及び／又は請求項15から16、334から338又は339から347の抗体の重鎖又は軽鎖を含む抗体。

【請求項427】

癌性腫瘍を有する哺乳類の治療の安全性を試験するための、請求項15から16、334から338又は339から347の何れかの抗ヒトCD79b抗体又は抗ヒトCD79bを含むADCを使用する方法において、前記治療が請求項15から16、334から338又は339から347の何れかの抗ヒトCD79b抗体又は抗ヒトCD79bを含むADCの投与を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物における造血性腫瘍の治療に有用な物質の組成物と、同用途のために該物質の組成物を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第2の主要な死亡原因である（Boring等、CA Cancer J. Clin. 43:7(1993)）。癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍塊を形成する異常な又は腫瘍形成性の細胞の数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節や遠くの部位に転移と呼ばれる過程を介して広がる悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。

血球新生、すなわちリンパ球、白血球、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞等の血液の細胞要素が産生されるプロセスの間に産生される細胞に関与する癌を造血性癌と呼ぶ。血液及びリンパ組織中に見られるリンパ球は免疫応答に重要であり、2つの主要なリンパ球の種類に分類される。すなわち、Bリンパ球（B細胞）及びTリンパ球（T細胞）

10

20

30

40

50

であり、これらはそれぞれ、体液性免疫と、細胞媒介性免疫を媒介する。

B細胞は骨髄中において成熟し、その細胞表面に抗原結合性抗体を発現して骨髄を出る。ナイーブなB細胞は、その膜結合性抗体が特異的に結合する抗原に初めて遭遇すると、急速に分裂を始め、その子孫は記憶B細胞及び「プラズマ細胞」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。記憶B細胞の寿命は長く、元の親細胞と同じ特異性を持つ膜結合性抗体を発現し続ける。プラズマ細胞は膜結合性抗体を産生しないが、代わりに分泌可能な形態の抗体を産生する。分泌された抗体は、体液性免疫の主要なエフェクター分子である。

T細胞は、未成熟T細胞の増殖及び分化の環境となる胸腺の中で成熟する。T細胞が成熟する間に、T細胞では、T細胞レセプターを産生する遺伝子の再構成と、成熟T細胞の細胞表面における表現型を決定する助けとなるポジティブ及びネガティブ選択が行われる。成熟T細胞の特徴的な細胞表面マーカーは、CD3：T細胞レセプター複合体及びコアレセプターのCD4又はCD8の一方である。

【0003】

癌の治療に効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、一又は複数の特定の型の癌細胞の表面に特に発現する膜貫通又はさもなくば膜結合型のポリペプチドの同定を探索してきた。しばしば、このような膜結合ポリペプチドは非癌性細胞の表面と比べて癌細胞の表面により豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介する癌細胞を標的として特異的に破壊する能力を生み出す。この点、抗体ベースの治療が、ある種の癌の治療において非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）（双方共にジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター2（HER2）プロト-オンコジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組換えDNA誘導ヒト化モノクローナル抗体である。HER2タンパク質の過剰発現は、25-30%の原発性乳癌に観察される。リツキサン（登録商標）は、正常及び悪性Bリンパ球の表面に見出されるCD20抗原に対する遺伝子操作キメラマウス／ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方共、CHO細胞中で組換え操作によって産生される。

癌の治療に効果的な細胞標的を発見する他の試みでは、研究者達は、（1）非癌性正常細胞の一又は複数の特定の型による場合と比較して癌細胞の一又は複数の特定の型によって特異的に産生される非膜結合ポリペプチド、（2）一又は複数の正常な非癌性細胞のものより有意に高い発現レベルで癌細胞により産生されるポリペプチド、又は（3）癌性及び非癌性状態の双方（例えば正常な前立腺及び前立腺腫瘍組織）においてその発現が一つの組織型（あるいは非常に制限された数の異なった細胞型）のみに特異的に限られているポリペプチドを探索してきた。このようなポリペプチドは癌細胞によって分泌されるか又は細胞内に残ったままでありうる。更に、このようなポリペプチドは、癌細胞自体ではなく、癌細胞に増強又は成長亢進効果を有するポリペプチドを産生及び／又は分泌する細胞によってむしろ発現されうる。そのような分泌ポリペプチドは、しばしば正常細胞を超える成長有利性を癌細胞に与えるタンパク質であり、例えば血管形成因子、細胞付着因子、成長因子等の物を含む。このような非膜結合ポリペプチドのアンタゴニストの同定は、このような癌の治療のための効果的な治療剤となることが期待される。更に、このようなポリペプチドの発現パターンの同定は、哺乳動物における特定の癌の診断に役立つであろう。

哺乳動物の癌治療は上記のような進歩を見ているが、それぞれ哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性の細胞成長を有効に抑制するためのさらなる治療薬に対する需要は依然大きい。従って、本発明の目的は、ポリペプチド、細胞膜関連ポリペプチド、単一（又は限定された数の）組織型に発現が限定された分泌ポリペプチド又は細胞内ポリペプチド、造血組織を、癌性及び非癌性状態の双方において同定し、それらポリペプチドとそれらのコード化核酸を使用して哺乳動物の造血性癌の治療的処置に有用な組成

物を生成することである。

【0004】

CD79は、CD79a(Ig、mb-1)及びCD79b(Ig、B29)を含有する共有結合性ヘテロ二量体からなるB細胞レセプターのシグナル伝達構成成分である。CD79a及びCD79bは、各々細胞外イムノグロブリン(Ig)ドメイン、膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメイン、イムノレセプターチロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)ドメインを含有する。CD79はB細胞上及び非ホジキンリンパ腫細胞(NHL)において発現される(Cabezudo et al., Haematologica, 84:413-418 (1999); D'Arena et al., Am. J. Hematol., 64: 275-281 (2000); Olejniczak et al., Immunol. Invest., 35: 93-114 (2006))。CD79a及びCD79b及びsIgのすべては、CD79の表面発現に必要である(Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7)(2001))。NHL上のCD79bの平均表面発現は、正常なB細胞上の平均表面発現と同程度であるが、範囲は広い。

【0005】

従って、特に慢性的な治療のために患者に投与した際に抗原性が最小であるか又は全くないCD79a及びCD79b抗原に対する治療的抗体を製造することが有益である。本発明はこれ及び他の必要を満たすものである。本発明は、現在の治療的組成物の制限を克服する抗CD79a及び抗CD79b抗体を提供し、並びに以下の詳細な説明から明白となる更なる利点を示す。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、つまり、癌の治療において腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬のために抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を使う(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151-172; 米国特許第4975278号)と、薬剤成分を腫瘍へ目的通りに運搬して、そこで細胞内蓄積させることが可能となる。コンジュゲートさせていない薬剤を全身投与すると、排除しようとする腫瘍細胞だけでなく正常な細胞に許容されないレベルの毒性が生じうる(Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506)。治療的インデックス、つまりADCの最大の効率及び最小の毒性を改善するための努力は、ポリクローナル抗体(Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)及びモノクローナル抗体(mAb)の選択、並びに薬剤結合及び薬剤放出性質(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549)に集中していた。抗体薬剤コンジュゲートに用いられる薬剤成分には、ジフテリア毒素などの細菌性タンパク質毒素、リシンなどの植物タンパク質毒素、アウリスタチン、ゲルダナマイシン(Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic and; Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第1391213号; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、カリケアマイシン(Lode et al (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342)、ダウノマイシン、ドキソルビシン、及びビンデシン(上掲のRowland et al (1986))などの小分子毒素が含まれる。薬剤成分は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害などの細胞障害性及び細胞分裂停止性の機能に影響しうる。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。

【0006】

アウリスタチンペプチドである、アウリスタチンE(AE)とドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン(MMAE)(国際公開02/088172)は、(i) キメラモノクローナル抗体cBR96(カルチノーマ上のルイスYに特異的)、(ii) 血液系悪

性腫瘍上のCD30に特異的であるcAC10(Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4): 1458-1465; 米国公開特許2004/0018194)、(iii) CD20発現癌及び免疫不全の治療のためのリツキサンなどの抗CD20抗体(国際公開04/032828)、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗EphB2抗体2H9(Mao et al (2004) Cancer Research 64(3): 781-788)、(v) Eセレクトイン抗体(Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394)、(vi) トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標)、米国公開特許2005/0238649)、及び(vi) 抗CD30抗体(国際公開03/043583)へ、薬剤成分としてコンジュゲートされていた。アウリスタチンEの変異体は、米国特許第5767237号及び米国特許第6124431号において開示される。モノクローナル抗体にコンジュゲートされるモノメチルアウリスタチンEは、2004年3月28日に発表されたSenter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623において開示される。アウリスタチン類似体MMAE及びMMAFは、様々な抗体にコンジュゲートされている(米国公開特許2005/0238649)。

【0007】

抗体に薬剤成分を付着させる、すなわち共有結合により結合させる従来の手段では、一般的に、薬剤成分が抗体上の多くの部位で付着している分子の不均一な混合物となる。例えば、典型的に、細胞毒性薬剤は、抗体の時に多くのリジン残基を介して抗体にコンジュゲートされ、不均一な抗体薬剤コンジュゲート混合物を生じていた。反応条件に応じて、典型的に、不均一な混合物は、0からおよそ8又はそれ以上の薬剤成分が付着している抗体の分布を含む。さらに、抗体に対する薬剤成分をある整数比で有するコンジュゲートの各サブグループ内では、薬剤成分が抗体上の様々な部位で付着している潜在的に不均一な混合物である。分析方法及び調製方法は、コンジュゲート反応により生じる不均一な混合物内の抗体-薬剤コンジュゲート種分子を分離し特徴付けるために不十分でありうる。抗体は大きく、複雑で、構造的に多様な生体分子であり、反応性の官能基を多く有することが多い。リンカー試薬及び薬剤-リンカー中間生成物との反応性は、pH、濃度、塩濃度及び共存溶媒などの因子に依存している。さらに、複数の工程のコンジュゲート工程は、反応条件の調節や反応物と中間生成物の特徴付けが難しいため、再現性がないかもしれない。

【0008】

システインチオールは、陽子が付加される多くのアミンとは異なり、中性pHで反応性であり、pH7付近ではほとんど求核性基でない。遊離チオール(RSH、スルフヒドリル)基は相対的に反応性であるので、システイン残基を有するタンパク質は、ジスルフィド結合オリゴマーとして酸化型で存在することが多いか、又は内部で架橋したジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般に遊離チオールを有しない(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55)。一般に、抗体システインチオール基は、求電子性のコンジュゲート試薬に対して、抗体アミンやヒドロキシ基よりも反応性が高い、すなわち求核性が高い。システイン残基は、リガンドへの共有的付着を形成させるため、ないしは新たに分子内ジスルフィド結合を形成させるために、遺伝学的操作技術によりタンパク質内に導入されていた(Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15): 8480-8484; 米国特許第6248564号)。しかしながら、タンパク質の様々なアミノ酸残基をシステインアミノ酸に変異させることによるシステインチオール基の操作は、対になっていない(遊離Cys)残基又は相対的に反応又は酸化に接触しやすいものの場合に特に問題となりやすい。大腸菌周辺質、培養物上清又は一部ないし完全に精製されたタンパク質内のタンパク質が濃縮された溶液では、タンパク質の表面上の対になっていないCys残基は対

になり、酸化されて、分子内ジスルフィドを形成し、ゆえにタンパク質二量体又は多量体となることができる。ジスルフィド二量体形成は、新規のCysを、薬剤、リガンド又は他の標識へのコンジュゲートに対して非反応性にする。さらに、タンパク質が新たに操作されたCysと既存のCys残基との間で分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成する場合、両Cysチオール基は活性部位関与にも相互作用にも利用されない。さらに、タンパク質は、三次構造の欠損又はミスホールドにより、不活性化ないしは非特異的になるかもしれない(Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9)。

【0009】

システイン-改変抗体は、Fab抗体断片(チオFab)として設定され、完全長IgGモノクローナル(チオMab)抗体として発現されていた(Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; 米国特許公開2007/0092940、これらの内容は出典明記により援用される)。抗体薬剤コンジュゲート(ThioADC)を調節するために、ThioFab及びThioMab抗体は、チオール反応性リンカー試薬及び薬剤ーリンカー試薬によって新たに導入されたシステインチオールでリンカーによりコンジュゲートされていた。

特許公報及び出版物を含む本明細書において引用されるすべての文献は、出典明記によってその全体が援用される。

【0010】

発明の概要

A. 実施態様

本明細書において、本出願人は、特定の種類の細胞、例えばリンパ球、白血球、赤血球及び血小板等の血液新生段階において産生される細胞の、腫瘍細胞及び正常細胞の両方が特異的に発現する種々の細胞性ポリペプチド(及びそれらのコード核酸又はその断片)の同定について最初に記載する。ここで、上記のポリペプチドは全て、造血系起源腫瘍抗原(Tumor-Antigens of Hematopoietic Origin polypeptide)ポリペプチド(「TAHO」ポリペプチド)と呼ばれ、哺乳動物における癌治療の効果的な標的となることが予想される。

本発明は、抗CD79a及び抗CD79b抗体又はその機能化断片とその造血腫瘍の治療における使用法を提供する。

従って、本発明の一実施態様では、本発明は、造血系起源ポリペプチドの腫瘍抗原又はその断片(「TAHO」ポリペプチド)をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。

【0011】

ある態様では、単離された核酸分子は、(a)ここで開示されるアミノ酸配列を有する完全長TAHOポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くTAHOポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通TAHOポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを含む又は含まないもの、又はここに開示される完全長TAHOポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここで開示される完全長TAHOポリペプチドcDNAのコード化配列、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くTAHOポリペプチドのコード化配列、ここに開示される膜貫通TAHOポリペプチドの細胞外ドメインのシグナルペプチドを含む又は含まないコード化配列、又はここに開示される完全長TAHOポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片のコード化配列、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98

%、99%又は100%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0012】

更なる態様では、本発明は、(a) ここで開示されるATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの何れかの完全長コード領域によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b) (a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

本発明の他の態様は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかである、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列と相補的であるTAHOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここで開示されている。従って、ここに記載のTAHOポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0013】

他の態様では、本発明は、(a) ここで開示される完全長アミノ酸配列を有するTAHOポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くTAHOポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通TAHOポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを伴う又は伴わないもの、又はここで開示される完全長TAHOポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は(b) (a)のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば、検出プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得る、ここに開示される、完全長TAHOポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖、又は抗TAHOポリペプチド抗体、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHOポリペプチドに結合する他の小有機分子の結合部位を含むポリペプチドを任意にコードし得る完全長TAHOポリペプチドのコード化断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約5のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。TAHOポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してTAHOポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのTAHOポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうるということが知られている。そのようなTAHOポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるTAHOポリペプチド断片、好ましくは抗TAHO抗体、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHOポリペプチドに結合する他の小有

10

20

30

40

50

機分子に対する結合部位を含んでなる T A H O ポリペプチド断片である。

【0014】

ある実施態様では、本発明は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有する T A H O ポリペプチド、ここに開示されるシグナルペプチドを欠く T A H O ポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示されるシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通 T A H O ポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示される核酸配列の任意のもの、又はここに開示される完全長 T A H O ポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された T A H O ポリペプチドに関する。

10

【0015】

更なる態様では、本発明は、ここに開示されて A T C C に寄託されたヒトタンパク質 c D N A の何れかによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約 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するアミノ酸配列を含む単離された T A H O ポリペプチドに関する。

特定の態様では、本発明は、N 末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離された T A H O ポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、T A H O ポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含有するベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物から T A H O ポリペプチドを回収することを含む。

20

【0016】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失したか又は膜貫通ドメインが不活性化している単離された T A H O ポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、T A H O ポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物から T A H O ポリペプチドを回収することを含む。

30

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているポリペプチドの何れかをコードする D N A を含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞は C H O 細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに開示されているポリペプチドの何れかの製造方法がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することを含んでなる。

【0017】

他の実施態様では、本発明は、異種（非-T A H O）ポリペプチドに融合した、ここに開示の T A H O ポリペプチドの何れかを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンの F c 領域等の異種ポリペプチドと融合したここに開示の T A H O ポリペプチドの何れかを含む。

40

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの何れかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v 断片を含む抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体又は抗 T A H O ポリペプチド抗体がその各抗原性エピトープと結合するのを競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の抗体は、場合によっては C H O 細胞又は細菌細胞で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する

50

。検出のために、本発明の抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりする。

【0018】

別の実施態様では、本発明は、抗TAHO抗体を提供し、ここで、そのような抗TAHO抗体が、ヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合し、ここで、このような抗TAHO抗体は、

(a) 配列番号：97、99又は101から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号：98、100又は102から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

10

【0019】

別の実施態様では、本発明は、抗TAHO抗体を提供し、ここで、そのような抗TAHO抗体が、ヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合し、ここで、このような抗TAHO抗体は、

(a) 配列番号：10、33又は41から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号：12、35又は43から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

20

【0020】

別の実施態様では、本発明は、抗TAHO抗体を提供し、ここで、そのような抗TAHO抗体が、ヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合し、ここで、このような抗TAHO抗体は、

(a) 配列番号：4のアミノ酸29から39を含むアミノ酸配列；

(b) 配列番号：8のアミノ酸30から40を含むアミノ酸配列；又は

(c) 配列番号：13のアミノ酸29から39を含むアミノ酸配列；

からなる群から選択されるヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のようなTAHOポリペプチドの領域中のエピトープに結合する。

30

【0021】

更なる実施態様では、本発明は、抗TAHO抗体を提供し、ここで、そのような抗TAHO抗体が、ヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合し、ここで、このような抗TAHO抗体は、エピトープに結合し、ここで、前記エピトープは、位置30、34及び36のアミノ酸がArgである配列番号：4のアミノ酸29から39を含む。更なる実施態様では、本発明は、抗TAHO抗体を提供し、ここで、そのような抗TAHO抗体が、ヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合し、ここで、このような抗TAHO抗体は、エピトープに結合し、ここで、前記エピトープは、位置35のアミノ酸がLeuである配列番号：8のアミノ酸29から39を含む。

40

【0022】

一態様では、本発明の抗体は、国際公開2006/034488；米国公開特許2007/0092940 (本明細書において出典明記によって全体が援用される) に開示されるように、親抗体の一又は複数のアミノ酸が遊離したシステインアミノ酸に置換されるシステイン改変抗体を包含する。抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体の任意の形態が改変、すなわち変異されてもよい。例えば、親Fab抗体断片を改変して、本明細書中で「ThioFab」と称するシステイン改変Fabを形成してもよい。同様に、親のモノクローナル抗体を改変して、「ThioMab」を形成してもよい。単一の部位突然変異によりThioFa

50

bの単一の改変したシステイン残基が生じるのに対して、IgG抗体の二量体の性質のためにThioMa bでは、単一の部位突然変異により2つの改変したシステイン残基が生じる。抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、本発明のシステイン改変抗TAHO抗体には、ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、細胞関連のTAHOポリペプチドを選択的に結合するモノクローナル抗体、ヒト化ないしはキメラのモノクローナル抗体、及び抗体の抗原結合断片、融合ポリペプチド及びアナログが含まれる。あるいは、システイン改変抗体は、必ずしも親抗体を変える必要はなく、例えばファージディスプレイ抗体の設定や選別によって、又は軽鎖及び／又は重鎖フレームワーク配列と定常領域のデノボ設定によって、抗体の配列設定及び／又は選別により生じる、抗体又はFabの本明細書において開示される位置にシステインを含む抗体を包含する。システイン改変抗体は、0.6～1.0、0.7～1.0又は0.8～1.0の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含む。遊離したシステインアミノ酸は、親抗体内で改変されているシステイン残基であり、ジスルフィド架橋の一部でない。システイン改変抗体は、例えばマレイミド又はハロアセチルによる改変されたシステインの部位での、細胞障害性化合物及び／又は造影(イメージング)化合物の接着に有用である。Cys残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はN末端アミノ基などのタンパク質の任意の他のアミノ酸官能基の、およそ1000倍である。ヨードアセチル及びマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応するが、より高いpH(>9.0)及びより長い反応時間が必要とされるであろう必要かもしれない(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【0023】

ある態様では、本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体は以下のいずれか一の位置に改変したシステインを含み、この位置は、軽鎖ではカバット等(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照)に従った、重鎖(Fc領域を含む)ではEU番号付け(上掲のKabat等 (1991)を参照)に従った数であり、図30A、31A、35A及び36Aの下線で示す軽鎖定常領域は位置109(カバット番号付け)で始まり、図30B、31B、35B及び36Bの下線で示す重鎖定常領域は位置118(EU番号付け)で始まる。また、位置は、図30-31及び49に示す完全長軽鎖ないしは重鎖のアミノ酸を順次番号付けする際にその位置で表されてもよい。本発明の一実施態様では、抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、LC-V205Cに改変されたシステインを含む(カバット番号: Val205、図27A及び49Aの順次番号209はその位置でCysになるように改変される)。軽鎖の改変されたシステインを図30A及び36Aにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、HC-A118Cに改変されたシステインを含む(EU番号: A1a118; カバット番号114; 図31B又は35Bの順次番号118はその位置でCysになるように改変される)。重鎖の改変されたシステインを図31B又は35Bにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、Fc-S400Cに改変されたシステインを含む(EU番号: Ser400; カバット番号396、31B又は35Bの順次番号400はその位置でCysになるように改変される)。他の実施態様では、重鎖(Fc領域を含む)の改変されたシステインは、以下の位置のいずれか一である(カバット番号付けに従い、EU番号付けは括弧内に示す)。5、23、84、112、114(118EU番号付け)、116(120EU番号付け)、278(282EU番号付け)、371(375EU番号付け)又は396(400EU番号付け)。したがって、本発明の抗ヒト79b (TAHO5) 抗体のような、親キメラ抗

TAHO抗体についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、Q5C、K23C、S84C、S112C、A114C(A118C EU番号付け)、T116C(T120C EU番号付け)、V278C(V282C EU番号付け)、S371C(S375C EU番号付け)又はS396C(S400C EU番号付け)である。したがって、本発明の親抗カニクイザルCD79b抗体(TAHO40)についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、Q5C、T23C、S84C、S112C、A114C(A118C EU番号付け)、T116C(T120C EU番号付け)、V278C(V282C EU番号付け)、S371C(S375C EU番号付け)又はS396C(S400C EU番号付け)である。他の実施態様では、軽鎖の改変されたシステインは、以下の何れか一である(カバット番号付けに従う)。15、110、114、121、127、168、205。したがって、本発明の親キメラ抗ヒト79b(TAHO5)抗体についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、L15C、V110C、S114C、S121C、S127C、S168C又はV205Cである。したがって、本発明の親抗カニクイザルCD79b抗体(TAHO40)についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、L15C、V110C、S114C、S121C、S127C、S168C又はV205Cである。

【0024】

抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体は、一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含み、抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体がヒトCD79b(TAHO5)又はカニクイザルCD79b(TAHO40)ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合するものであり、抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、親の抗TAHO抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製され、ここで、該親抗体が

(a) 配列番号：97、99又は101から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号：98、100又は102から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【0025】

抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体は、一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含み、抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体がヒトCD79b(TAHO5)又はカニクイザルCD79b(TAHO40)ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに結合するものであり、抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、親の抗TAHO抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製され、ここで、該親抗体が

(a) 配列番号：10、33又は41から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；及び／又は

(b) 配列番号：12、35又は43から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。

【0026】

ある態様では、本発明は、本明細書において開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、又は本明細書において開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列に対して、少なくともおよそ80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくともおよそ81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗ヒトCD79b

(T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、システイン改変抗 T A H O 抗体に関する。

【0027】

より更なる態様では、本発明は、(a) 本明細書に開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、(b) 本明細書に開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列、(c) 本明細書に開示した、シグナルペプチドを持つ又は持たない、膜貫通型システイン改変抗体タンパク質の細胞外ドメイン、(d) 本明細書に開示したいずれかの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、又は(e) 本明細書に開示した完全長システイン改変抗体アミノ酸配列の任意の他の特異的に定義される断片、をコードする D N A 分子の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離された抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、システイン改変抗 T A H O 抗体に関する。

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列を持たない及び／又は開始メチオニンを持たない単離された抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、システイン改変抗 T A H O 抗体を提供し、この抗体は本明細書中に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

【0028】

本発明の他の態様では、膜貫通ドメインを削除するか膜貫通ドメインを不活性化してある単離された抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、システイン改変抗 T A H O 抗体を提供する。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

他の態様では、本発明は、異種性(非ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は非カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、非 T A H O) のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む、単離された抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、抗 T A H O 抗体キメラシステイン改変抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、例えばエプトタグ配列又はイムノグロブリンの F c 領域などの異種性のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む。

【0029】

抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のような、システイン改変抗 T A H O 抗体は、それぞれの抗原エプトへの抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗 T A H O 抗体ポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又は抗体であってもよい。本発明の抗体は場合によって、例えばアウリスタチン、メイタンシノイド、ドラスタチン誘導体又はカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解性の酵素などを含む毒素などの増殖阻害性剤ないしは細胞障害性剤にコンジュゲートさせてもよい。本発明の抗体は場合によって、C H O 細胞又は細菌内で産生され、結合する細胞の成長ないし増殖を阻害するか、又は死を誘導することが好ましい。診断目的のために、本発明の抗体は、固体担体などに付着して検出可能に標識されてもよい。

【0030】

システイン改変抗体は癌の治療において有用であり、細胞表面及び膜貫通型レセプター、及び腫瘍関連抗原(T A A)に特異的な抗体が含まれる。このような抗体は、ネイキッド抗体(薬剤又は標識成分にコンジュゲートしていない)として、あるいは抗体-薬剤コンジュゲート(A D C)として用いられてもよい。本発明のシステイン改変抗体は、チオール反

応性の試薬と、部位特異的かつ効率的にカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャ標識試薬、蛍光体試薬又は薬剤ーリンカー中間生成物であってもよい。システイン改変抗体は、検出可能な標識により標識され、固相担体に固定され、及び／又は、薬剤成分とコンジュゲートされもよい。L 1 0－L 2 0、L 1 0 5－L 1 1 5、L 1 0 9－L 1 1 9、L 1 1 6－L 1 2 6、L 1 2 2－L 1 3 2、L 1 6 3－L 1 7 3、L 2 0 0－L 2 1 0のアミノ酸範囲から選択される軽鎖の範囲内、及びH 1－H 1 0、H 1 8－H 2 8、H 7 9－H 8 9、H 1 0 7－H 1 1 7、H 1 0 9－H 1 1 9、H 1 1 1－H 1 2 1のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内、及びH 2 7 0－H 2 8 0、H 3 6 6－H 3 7 6、H 3 9 1－4 0 1から選択される範囲内のFc領域において、反応性のシステインアミノ酸によるアミノ酸の置換を持つ抗体に対してチオール反応が生じうる。このとき、アミノ酸位の番号付けはカバット番号付けシステム(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)の位置1から始め、その後は国際公開第2006034488号に開示されるように、順次続ける。また、チオール反応は、抗体の特定のドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン(CL)及び重鎖定常ドメイン、CH 1、CH 2 及びCH 3 に対して生じうる。0.6以上のチオール反応値となるシステイン置換は、インタクト抗体、つまりIg GサブクラスIg G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 及びIg A 2を含むIg A、Ig D、Ig E、Ig G 及びIg Mの重鎖定常ドメイン α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ にあってよい。このような抗体及びそれらの使用は、国際公開2006/034488；米国公開特許2007/0092940に開示される。

10

20

【0031】

本発明のシステイン改変抗体は、それらの野生型、親抗体相当物の抗原結合能を保持するのが好ましい。ゆえに、システイン改変抗体は、抗原へ結合することができる、好ましくは抗原に特異性がある。このような抗原には、例えば、腫瘍関連抗原(TAA)、細胞表面レセプタータンパク質及び他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に伴う分子、脈管形成に伴う分子、及び血管新生に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子が含まれる。腫瘍関連抗原はクラスター分化因子(すなわち、ヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 又はカニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドに限定されないCDタンパク質)であってもよい。本発明の抗ヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 又は抗カニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) 抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体はその親の抗ヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 又は抗カニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) 抗体のような、抗TAHO抗体相当物の抗原結合能を保持する。ゆえに、本発明の抗ヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 又は抗カニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) 抗体のような、システイン改変抗TAHO抗体は、抗ヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 又は抗カニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) のような、ヒト抗TAHOアイソフォーム β 及び／又は α を含むヒトCD 7 9 b (TAHO 5) 及び／又はカニクイザルCD 7 9 b (TAHO 4 0) のような、(B細胞に限らず細胞の表面上に抗原が発現される場合も含む)TAHO抗原に対して、結合、好ましくは特異的に結合することができる。

30

40

【0032】

一態様では、本発明の抗体は、反応性成分、活性化成分、又は反応性システインチオール基によって抗体に共有結合して付着されうる標識成分とコンジュゲートされてもよい(Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL)。付着された標識は、(i) 検出可能なシグナルを提供する、(ii) 第二標識と反応して、例えばFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)が生じるように第一又は第二標識によって生じる検出可能なシグナルを改変する、(iii) 抗原又はリ

50

ガンドとの相互作用を安定させるか又は結合の親和性を増加する、(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的なパラメータによって可動性、例えば電気泳動易動度又は細胞透過性に作用する、又は(v) キャプチャ成分を与えて、リガンド親和性、抗体／抗原結合又はイオン錯体形成を調節する、ように機能しうる。

【0033】

標識されたシステイン改変抗体は、例えば、特定の細胞、組織又は血清における対象の抗原の発現を検出するための診断的検査法に有用となりうる。診断用適用のために、抗体は一般的に検出可能な成分により標識されるであろう。多くの標識が利用可能であり、通常、以下のカテゴリに分類することができる：

ラジオアイソトープ(放射性核種)、例えば ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、又は ^{213}Bi 。放射性同位体標識抗体は、レセプター標的撮像実験において有用である。抗体は、Immunology, Volume 1 and 2, Coligen等, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて、リガンド試薬が抗体の改変システインチオールと反応性がある場合に、キレートを結合するか、あるいはラジオアイソトープ金属と複合化する該リガンド試薬により標識することができる。金属イオンを複合化しうるキレートリガンドには、DOTA、DTP、DOTMA、DTPA及びTETA(Macrocy clics, Dallas, TX)が含まれる。放射性核種は、本発明の抗体－薬剤コンジュゲートとの複合体化によりターゲティングされうる(Wu等 (2005) Nature Biotechnology 23(9): 113 7-1146)。

【0034】

DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル-DOTA)などのリンカー試薬は、イソプロピルクロロフォルメート(Aldrich)によって活性化される4-マレイミド酪酸(Fluka)とアミノベンジル-DOTAを反応させて、その後Axworthy等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807の手順によって調製されうる。DOTA-マレイミド試薬は、システイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸と反応して、抗体上の金属錯体形成リガンドを提供する(Lewis等 (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。DOTA-NH₂(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬は市販されている(Macrocy clics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出及び定量化によって経路活性化のマーカーとなりうる(Albert等 (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。コンジュゲートした放射性金属はリソソーム分解後に細胞内に残りうる。

造影実験のための抗体標識として好適な金属-キレート複合体は以下に開示される。米国特許第5342606号、米国特許第5428155号、米国特許第5316757号、米国特許第5480990号、米国特許第5462725号、米国特許第5428139号、米国特許第5385893号、米国特許第5739294号、米国特許第5750660号、米国特許第5834456号、Hnatowich等 (1983) J. Immunol. Methods 65: 147-157; Meares等 (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh等 (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares等 (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26; Izard等 (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula等 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 2105-2110; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Camera等 (1994) J. Nucl. Med. 21: 640-646; Ruegg等 (1990) Cancer Res. 50: 4221-4226; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Lee等 (2001) Cancer Res. 61: 4474-4482; Mitchell,等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1105-1112; Kobayashi等 (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer等 (2004) J. Nucl. Med. 45: 129-137; DeNardo等 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend等 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula等 (1999) J. Nucl. Med. 40: 166-76; Kobayashi等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 82

9-36; Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

【0035】

蛍光標識、例えば希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6カルボキシフルオレセインを含むフルオレセイン種; TAMRAを含むローダミン種; ダンシル; リサミン; シアニン; フィコエリトリン; テキサスレッド; 及びこれらの類似体。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光色素及び蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)及びPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものが含まれる。

10

【0036】

様々な酵素基質標識は利用可能であり、開示されてもいる(米国特許第4275149号)。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学ルミノメーターを用いて)か、又はエネルギーを蛍光受容基に与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivan等, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzymology (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

20

【0037】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる:

30

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

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

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

40

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第4275149号及び同第4318980号を参照。

【0038】

標識は、アミノ酸側鎖、活性化されたアミノ酸側鎖、システイン改変抗体などと間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな3つの分類のうちの何れかはアビジン又はストレプトアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にストレプトアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド変異体と標識とを間接的にコンジュゲートさせるために、ポリペプチド変異体は小ハプテン(例えばジゴキシン)とコンジュゲートさせ

50

、前述した標識の異なるタイプのうちの1つは抗ハプテンポリペプチド変異体(例えば抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。したがって、ポリペプチド変異体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる(Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego)。

【0039】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばE L I S A、競合結合アッセイ、直接的及び間接的なサンドイッチアッセイ及び免疫沈降アッセイに用いられてもよい(Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。

検出標識は、結合又は認識事象を局所化し、視覚化して、数量化するために有用となる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出する。検出可能に標識した抗体についての他の使用は、蛍光標識抗体とビーズをコンジュゲートさせ、リガンド結合時の蛍光シグナルを検出することを含む、ビーズに基づく免疫キャプチャの方法である。同様の結合検出方法論は、表面プラスモン共鳴(S P R)効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定して検出するものである。

蛍光色素及び化学発光色素などの検出標識(Briggs等 (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058)は検出可能なシグナルを提供し、通常、好ましくは以下のような特性により標識化抗体に応用することができる。(i) 標識抗体は、少量の抗体が無細胞アッセイ及び細胞に基づくアッセイにおいて敏感に検出されるように低いバックグラウンドで非常に高いシグナルを産生するものである、さらに、(ii) 標識抗体は、有意に写真を退色させることなく蛍光シグナルが観察され、モニターされ、記録されるように、光安定性を有するものである。膜又は細胞表面、特に生きている細胞への標識抗体の細胞表面結合を伴う用途では、標識は、(iii) 有効なコンジュゲート濃度と検出感度が達成されるように良好な水溶性であり、(iv) 細胞の正常な代謝過程が破壊されないか、又は早期に細胞死を引き起こさないように生きている細胞に対して毒性がないことが好ましい。

【0040】

細胞性蛍光強度の直接の定量化と蛍光標識事象、例えば、ペプチド-色素コンジュゲートの細胞表面結合の算出は、生きている細胞又はビーズによる非放射性アッセイである、混合と読み取り(mix-and-read)を自動化するシステム(F M A T (登録商標) 8 1 0 0 H T S システム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.)で実施してもよい(Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4: 193-204)。また、標識抗体の使用には、細胞表面レセプター結合アッセイ、イムノキャプチャアッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ(F L I S A)、カスパーゼ切断(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; 米国特許第 6 3 7 2 9 0 7 号)、アポトーシス(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51)及び細胞障害性アッセイが含まれる。蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術を用いて、細胞表面を標識とする分子によって上方制御又は下方制御を同定することができる(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51)。

【0041】

本発明の標識抗体は、様々な方法及び以下のような生医学的かつ分子的撮像法の技術によってバイオマーカーやプローブを造影する際に有用である。(i) M R I (磁気共鳴画像法)、(ii) M i c r o C T (コンピューター断層撮影法)、(iii) S P E C T (単一光子放射型コンピューター断層撮影法)、(iv) P E T (ポジトロン放出断層撮影) Chen等 (2004) B

ioconjugate Chem. 15:41-49、(v) バイオルミネセンス、(vi) 蛍光、及び(vii) 超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質によって標識された抗体が動物又はヒト患者に投与される造影手順であり、画像は抗体が局在する身体の部分のものである(米国特許第6528624号)。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病理性プロセス、又は治療的介入に対する薬理学的応答の指標として評価されてもよい。バイオマーカーはいくつかの種類がある。タイプ0は、疾患の自然な成長マーカーであって、公知の臨床指標、例えば関節リウマチの滑液炎症のMRI評価と縦方向に相関する。タイプIマーカーは、例えばメカニズムが臨床転帰と関係していなくても、作用のメカニズム(mechanism-of-action)の関係として介入の効果を捕らえる。タイプIIマーカーは代理のエンドポイントとして機能するものであり、該バイオマーカーの変化又は該バイオマーカーのシグナルから、関節リウマチの骨浸食をCTで測定するなどの目的の応答を「有効と認める」ために臨床的な利点を予測する。したがって、造影バイオマーカーは、(i) 標的タンパク質の発現、(ii) 標的タンパク質に対する治療用の結合、すなわち選択性、及び(iii) クリアランス及び半減期の薬物動態学的データについての薬物動態学的(PD)治療的情報を提供しうる。研究室ベースのバイオマーカーと比較したときのインビボ造影バイオマーカーの利点には、非侵襲性処置、定量化できる、全身評価、反復性投与及び評価、すなわち複数の時点の投与と評価、及び臨床前(小動物)の結果を臨床(ヒト)の結果に潜在的に置き換えることができる結果が含まれる。用途によっては、バイオイメージングは、前臨床研究の多くの動物実験の代替となるか又は最小化する。

【0042】

ペプチド標識方法は周知である。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer等 (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pflleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; 及びWong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez等 (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155; Lewis等 (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li等 (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier等 (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237を参照。

十分近接した蛍光レポーターとクエンチャーの2つの成分にて標識されたペプチドとタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を受ける。レポーター基は、一般的に、特定の波長で光に励起され、エネルギーをアクセプター又はクエンチャーに転移して、その結果、最大の明るさで発光するための適切なストークスシフトが生じる蛍光色素である。蛍光色素には、広範な芳香族性を有する分子、例としてフルオレセイン及びローダミン、ないしこれらの誘導体が含まれる。蛍光レポーターは、完全なペプチドのクエンチャー成分によって部分的あるいは有意に失活されうる。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断時に、蛍光の検出可能な増加が測定されうる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

【0043】

また、本発明の標識抗体は親和性精製剤として用いられてもよい。この方法では、標識抗体は、当分野で公知の方法を用いて、セファデックス樹脂又は濾紙などの固相に固定される。固定された抗体は、精製される抗原を含む試料と接触させ、その後、支持体を、精製される抗原以外の試料中の実質的にすべての物質を取り除く適切な溶媒にて洗浄し、固定されたポリペプチド変異体に結合させる。最後に、抗原をポリペプチド変異体から放す

ように、支持体を他の適切な溶媒、例えばグリシンバッファ、pH 5.0にて洗浄する。

標識化試薬は、一般的に、(i) 標識抗体を形成するためにシステイン改変抗体のシステインチオールと直接、(ii) リンカー-標識中間生成物を形成するためにリンカー試薬と、又は(iii) 標識抗体を形成するためにリンカー抗体と、反応しうる反応官能基を保持する。標識試薬の反応性官能基には、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、及びホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基も用いられてよい。

【0044】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチンや蛍光色素のカルボキシル置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。標識のNHSエステルを予め造っても、単離しても、及び／又は特徴付けてもよく、あるいはインサイツで形成して、抗体の求核基と反応させてもよい。典型的には、標識のカルボキシル型を、カルボジイミド試薬、例としてジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はユーロニウム試薬、例としてTSTU (O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム テトラフルオロボレート)、HBTU (O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、又はHATU (O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、標識のNHSエステルを与えるためのアクチベーター、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、及びN-ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組み合わせと反応させることによって活性化する場合によって、標識のインサイツ活性化と抗体との反応によって標識と抗体をカップリングさせて、一工程で標識-抗体複合体を形成させてもよい。他の活性化試薬及びカップリング試薬には、TBTU (2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1,3,3-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、TFFH (N,N',N'',N'''-テトラメチルユーロニウム 2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP (ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート)、EDQ (2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド)；DIPCDI (ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT (1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール、及びアリールスルホニルハロゲン化物、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニルクロライドが含まれる。

【0045】

本発明のアルブミン結合ペプチド-Fab化合物：

一態様では、本発明の抗体はアルブミン結合タンパク質に融合される。血漿タンパク質結合は、生存が短い分子の薬物動態学的性質を向上させる有効な手段となりうる。アルブミンは血漿中で最も多いタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド類(ABP)は、組織取り込み、浸透及び拡散の変更を含む、融合した活性なドメインタンパク質の薬物動態を変えうる。これらの薬物動態学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列を特異的に選別することによって調製されうる(米国特許公開20040001827)。一連のアルブミン結合ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングによって同定された(Dennis等 (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043；国際公開第01/45746号)。本発明の化合物には、(i) Dennis等 (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038、(ii) 米国特許公開20040001827の[0076] 配列番号9から22、及び(iii) 国際公開第01/45746号の12～13頁に示されるABP配列が含まれ、これらの文献はすべて出典明記によって本明細書中に援用される。アルブミン結合(ABP)-Fabは、1:1の化学量比(1ABP/1Fab)で、Fab重鎖のC末端にアルブミン結合ペプチドを融合させることによって作製した。アルブミンとのこれらABP-Fabの会合により、抗体の半減期がウサギ及びマウス

の25倍以上に増加したことが示された。したがって、上記の反応性のCys残基をこれらABP-Fabに導入し、細胞障害性剤と部位特異的にコンジュゲートさせた後にインビボ動物実験に用いることができる。

例示的なアルブミン結合ペプチド配列には、以下に列挙する配列番号52から56のアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

CDKTHTTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF 配列番号：52

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF 配列番号：53

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF 配列番号：54

RLIEDICLPRWGCLWEDD 配列番号：55

DICLPRWGCLW 配列番号：56

10

【0046】

抗体-薬剤コンジュゲート

他の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を提供する。他の態様では、本発明はさらに、イムノコンジュゲートの使用方法を提供する。一態様では、イムノコンジュゲートは、細胞障害性剤又は検出可能な薬剤に共有結合して付着した前記いずれかの抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体を含む。

【0047】

20

一実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体は、他の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、他のTAHO抗体によって結合されるヒトCD79b(TAHO5)又はカニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、TAHOポリペプチド上の同じエピトープと結合する。他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体は、Rosewell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成したSN8モノクローナル抗体、配列番号：10(図10)及び配列番号：12(図12)の可変ドメインを含むモノクローナル抗体又はRosewell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成した何れかの抗体の可変ドメイン及びIgG1からの不変ドメインを含むキメラ抗体、又は、配列番号：10(図10)及び配列番号：11(図2)の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインのFab断片によって結合されるヒトCD79b(TAHO5)又はカニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、TAHOポリペプチド上の同じエピトープに結合する。他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体は、他のTAHO抗体(すなわち、CB3.1(BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、AT105-1(AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、AT107-2(AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトCD79b(TAHO5)抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))

30

40

【0048】

他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体は、他の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、他のTAHO抗体によって結合されるエピトープとは異なる、ヒトCD79b(TAHO5)又はカニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、TAHOポリペプチド上のエピトープと結合する。他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b(TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体のような、抗TAHO抗体は、Rosewell Park Ca

50

ncer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成したS N 8モノクローナル抗体、配列番号：10 (図10) 及び配列番号：12 (図12) の可変ドメインを含むモノクローナル抗体又はRosewell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成した何れかの抗体の可変ドメイン及びIgG1からの不変ドメインを含むキメラ抗体、又は、配列番号：10 (図10) 及び配列番号：12 (図12) の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインのFab断片によって結合されるエピトープとは異なる、ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、TAHOポリペプチド上の同じエピトープに結合する。他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、他のTAHO抗体(すなわち、CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))によって結合されるヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、TAHOポリペプチド上の同じエピトープに結合する。

【0049】

他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、Rosewell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成したS N 8モノクローナル抗体、配列番号：10 (図10) 及び配列番号：12 (図12) の可変ドメインを含むモノクローナル抗体又はRosewell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得たハイブリドーマから生成した何れかの抗体の可変ドメイン及びIgG1からの不変ドメインを含むキメラ抗体、又は、配列番号：10 (図10) 及び配列番号：12 (図12) の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインのFab断片とは異なる(すなわち、それではない)。他の実施態様では、本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体は、他のTAHO抗体(すなわち、CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))のFab断片とは異なる(すなわち、それではない)。

【0050】

一実施態様では、本発明の抗体は、第一動物種のCD79bに特異的に結合し、第二動物種のCD79bには特異的に結合しない。一実施態様では、第一動物種はヒト及び／又は霊長類(例えばカニクイザル)であり、第二動物種はマウス(例えばマウス)及び／又はイヌである。一実施態様では、第一動物種はヒトである。一実施態様では、第一動物種は霊長類、例えばカニクイザルである。一実施態様では、第二動物種はマウス、例えばマウスである。一実施態様では、第二動物種はイヌである。

【0051】

本発明の他の実施態様では、本発明はここで開示されている、システイン改変抗体を含む、抗体の何れかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、この宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されている抗体の製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチド(「ヒトCD79b (TAHO5) 結合オリゴペプチド」又は「カニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オ

リゴペプチド」のような、「TAHO結合オリゴペプチド」)を提供する。場合によっては、本発明のヒトCD79b (TAHO5) 結合オリゴペプチド又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合ポリペプチドは、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等とコンジュゲートされうる。本発明のヒトCD79b (TAHO5) 結合オリゴペプチド又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合ポリペプチドは、場合によってはCHO細胞又は細菌細胞中で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。検出のために、本発明のヒトCD79b (TAHO5) 結合オリゴペプチド又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合ポリペプチドは、検出可能に標識されたり、固体支持体等に付着させられたりする。

10

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチドの何れかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されているヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチドの任意のものを製造する方法が更に提供され、所望するオリゴペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養からその所望するオリゴペプチドを回収することを含んでなる。

20

他の実施態様では、本発明は、上記の又は下記のヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチドの何れかに、好ましくは特異的に、結合する小有機分子(「ヒトCD79b (TAHO5) 結合有機分子」又は「カニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子」のような、「TAHO結合有機分子」)を提供する。場合によっては、本発明のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子は、例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような成長阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等とコンジュゲートし得る。本発明のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子は、好ましくは、それが結合する細胞の死を誘導する。検出のために、本発明のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子は、検出可能に標識したり、固体支持体等に付着したりできる。

30

【0052】

より更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わせられて、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチド、ここに記載のキメラヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、キメラTAHOポリペプチド、ここに記載の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチド、又はここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子を含有する組成物に関する。場合によっては、この担体は薬学的に受容可能な担体である。

40

更に他の実施態様では、本発明は、容器及び容器内に収容された組成物を含む製造品に関し、その組成物には、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチド、ここに記載のキメラヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、キメラTAHOポリペプチド、ここに記載の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO

50

抗体、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチド、又はここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子が含まれ得る。製造品は、更に場合によっては、治療的処置のためのこの組成物の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を含みうる。

一態様では、本発明は、1以上の本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体を含む組成物を含む第1の容器とバッファを含む第2の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許容可能である。一実施態様では、アンタゴニスト抗体を含む組成物は担体を更に含み、ある実施態様では、薬学的に許容可能なものである。一実施態様では、キットは、被検体への組成物(例えば抗体)の投与についての指示を更に含む。

【0053】

本発明の他の実施態様は、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 及び／又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、TAHOポリペプチド、ここに記載のキメラヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) ポリペプチドのような、キメラTAHOポリペプチド、ここに記載の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチド、又はここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子に反応する症状の治療に有用な医薬の調製のための、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、キメラTAHOポリペプチド、ここに記載の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、抗TAHO抗体、ここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 結合オリゴペプチドのような、TAHO結合オリゴペプチド、又はここに記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 結合有機分子のような、TAHO結合有機分子の使用に関する。

【0054】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のような、TAHO抗体の使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明の核酸の使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

【0055】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明の発現ベクターの使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(

10

20

30

40

50

NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明の宿主細胞の使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

10

【0056】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明の製造品の使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

一態様では、本発明は、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患などの疾患の治療的及び／又は予防的処置のための医薬の調製における本発明のキットの使用を提供する。一実施態様では、癌、腫瘍及び／又は細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。

20

【0057】

一態様では、本発明は、任意の上又は下に記載のヒトCD79b(TAH05)又はカニクイザルCD79b(TAH040)のような、TAHOポリペプチドを発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、該細胞を本発明の抗体と接触させることを含み、これによって該細胞の増殖の阻害が生じる方法を提供する。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

30

一態様では、本発明は、任意の上又は下に記載のヒトCD79b(TAH05)又はカニクイザルCD79b(TAH040)のような、TAHOポリペプチドを発現する細胞を含む癌性の腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、該哺乳動物に本発明の抗体の治療上有効量を投与することを含み、それによって、該哺乳動物を効果的に処置される方法を提供する。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

一態様では、本発明は、任意の上又は下に記載のヒトCD79b(TAH05)又はカニクイザルCD79b(TAH040)のような、TAHOポリペプチドの発現増加と関連する細胞増殖性疾患の治療又は予防方法であって、本発明の抗体の有効量を該処置が必要な被検体に投与することを含み、これによって該細胞増殖性疾患が効果的に治療又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。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

40

【0058】

一態様では、本発明は、細胞の増殖の阻害方法であって、この細胞の増殖の少なくとも一部は任意の上又は下に記載のヒトCD79b(TAH05)又はカニクイザルCD79b(TAH040)のような、TAHOポリペプチドの増殖亢進作用に依存しているもの

50

であり、該細胞を有効量の本発明の抗体と接触させることを含み、これによって該細胞の増殖が阻害される方法を提供する。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

一態様では、本発明は、哺乳動物の腫瘍を治療的に処置する方法であって、この腫瘍の増殖の少なくとも一部は任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの増殖亢進作用に依存しているものであり、該細胞を有効量の本発明の抗体と接触させることを含み、これによって該腫瘍が効果的に処置される方法を提供する。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

10

【0059】

一態様では、本発明は、本明細書中に記載のイムノコンジュゲート、薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有する薬学的製剤を患者に投与することを含む、癌の治療方法を提供する。一実施態様では、癌は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施態様では、患者は、抗体-薬剤コンジュゲート化合物と組み合わせた細胞障害性剤が投与される。

一態様では、本発明は、B細胞増殖の阻害方法であって、ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドに対するイムノコンジュゲートの結合に許容される条件下で本発明の抗体を含むイムノコンジュゲートに細胞をさらすことを含む方法を提供する。一実施態様では、B細胞増殖は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施態様では、B細胞は異種移植片である。一実施態様では、曝露はインビトロで行う。一実施態様では、曝露はインビボで行う。

20

【0060】

一態様では、本発明は、任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドを含有することが疑われる試料において任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの存在を決定する方法であって、該試料を本発明の抗体にさらし、該試料において任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドへの該抗体の結合が該試料における該タンパク質の存在を表す方法を提供する。一実施態様では、試料は生体試料である。さらなる実施態様では、生体試料はB細胞を含む。一実施態様では、生体試料は、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫を含む、B細胞疾患及び/又はB細胞増殖性疾患に罹患しているか、又は罹患することが疑われる哺乳動物から得る。

30

一態様では、本発明は、任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドを発現する、B細胞などの細胞の増加と関連する細胞増殖性疾患の診断方法であって、生体試料中の試験細胞を上記いずれかの抗体と接触させ、任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドに

40

50

対する抗体の結合を検出することによって、試料において試験細胞に結合した抗体のレベルを決定し、そして、コントロール試料において細胞に結合した抗体のレベルを比較することを含み、このとき、結合した抗体のレベルが試験試料及びコントロール試料における任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) 発現細胞のような、TAHO発現細胞の数に正規化され、コントロール試料と比較して試験試料において結合した抗体のレベルが高い場合に、任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドを発現する細胞と関連する細胞増殖性疾患の存在を示す方法を提供する。

【0061】

一態様では、本発明は、血液又は血清における可溶性の任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの検出方法であって、B細胞増殖性疾患の発症の疑いのある哺乳動物からの血液又は血清の試験試料を本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体を含む、抗TAHO抗体と接触させ、正常な哺乳動物からの血液又は血清のコントロール試料と比較して試験試料における可溶性の任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの増加を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、検出方法は、哺乳動物の血液又は血清中の可溶性の任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの増加と関係しているB細胞増殖性疾患を診断する方法として有用である。

一態様では、任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドを発現する細胞への本発明の抗体の結合方法であって、本発明の抗体と該細胞を接触させることを含む。一実施態様では、抗体は細胞障害性剤にコンジュゲートされる。一実施態様では、抗体は増殖阻害性剤にコンジュゲートされる。

【0062】

本発明の方法は、任意の好適な病理学的状態、例えば任意の上又は下に記載のヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドの発現と関連する細胞及び／又は組織に作用する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、造血性細胞である。例えば、造血性細胞は、リンパ球、白血球、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞からなる群から選択されるものであってもよい。一実施態様では、本発明の方法で標的とされる細胞は、B細胞又はT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、癌細胞である。例えば、癌細胞は、リンパ腫細胞、白血病細胞又は骨髓腫細胞からなる群から選択されるものであってもよい。

本発明の方法は、更なる処理工程を更に含んでもよい。例えば、一実施態様では、方法はさらに、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含む。

【0063】

本明細書において記述されるように、CD79bはB細胞レセプターのシグナル伝達構成成分である。したがって、本発明の方法のある実施態様では、標的とされる細胞(例えば癌細胞)は、ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドを発現しない細胞と比較して、ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチドが発現されるものである。更なる実施態様では、標的とされる細胞は、同じ組織タイプの正常な非癌細胞と比較してヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、TAHOポリペプチド発現が亢進されている癌細胞である。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生じる。

本発明の他の態様は、抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) を含む抗TAHOポリペプチド抗体に応答する症状の治療に有用な医薬の調製のための、本明細書中に記載の抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) を含む抗TAHOポリペプチド抗体の使用に関する。

本発明の他の態様は、癌性腫瘍を有する哺乳類の治療の安全性を試験するための、ここに記載の、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体若しくはシステイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体、又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体若しくはシステイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体を含むADCの使用法を提供し、ここで、前記治療は、ここに記載の抗ヒトCD79b (TAHO40) 抗体若しくはシステイン改変抗ヒトCD79b (TAHO40) 抗体、又は抗ヒトCD79b (TAHO40) 抗体若しくはシステイン改変抗ヒトCD79b (TAHO40) 抗体を含む。

本発明の他の態様は、抗体当たりの平均薬剤負荷がおよそ2からおよそ5、又はおよそ3からおよそ4である式Iの抗体-薬剤化合物の混合物を含む組成物である。

【0064】

本発明の他の態様は、式I ADC化合物を含む薬学的組成物、式I ADC化合物、又はその薬学的に許容可能な塩ないしは溶媒和化合物と薬学的に許容可能な希釈液、担体ないしは賦形剤の混合物である。

他の態様は、式I ADC化合物と、抗癌性質又は他の治療効果を有する第二化合物とを含む薬学的組合せを提供する。

他の態様は、腫瘍細胞又は癌細胞の増殖を殺傷又は阻害するための方法であって、腫瘍細胞又は癌細胞の増殖を殺傷するか又は阻害するために有効である、式Iの抗体-薬剤コンジュゲート、又はその薬学的に許容可能な塩ないしは溶媒和化合物の有効量にて該細胞を処理することを含む方法である。

【0065】

他の態様は、癌の治療方法であって、式I ADCを含む薬学的組成物の治療的有效量を患者に投与することを含む方法である。

他の態様には、抗体-薬剤コンジュゲート、容器、及び処置を示唆するパッケージ挿入物又はラベルを具備する製造品、すなわちキットが包含される。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】TAHO4 (PRO36248) cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号1) を示し、配列番号1は、本明細書において「DNA225785」(「CD79a」とも呼ぶ) と命名するクローンである。ヌクレオチド配列はCD79bをコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図2】図1に示される配列番号7のコード配列に由来するアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。

【図3】TAHO5 (PRO36249) cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号3) を示し、配列番号3は、本明細書において「DNA225786」(「CD79b」とも呼ぶ) と命名するクローンである。ヌクレオチド配列はCD79bをコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図4】図3に示される配列番号3のコード配列に由来するアミノ酸配列 (配列番号4) を示す。

【図5】TAHO39 (PRO283626) cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号5) を示し、配列番号5は、本明細書において「DNA548454」(「cynoCD79a」又は「カニクイザルCD79a」とも呼ぶ) と命名するクローンである。ヌクレオチド配列はCD79aをコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図6】図5に示される配列番号6のコード配列に由来するアミノ酸配列 (配列番号6) を示す。

【図7】TAHO40 (PRO283627) cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号7

10

20

30

40

50

）を示し、配列番号 7 は、本明細書において「DNA 548455」（「c y n o C D 7 9 b」又は「カニクイザル C D 7 9 b」とも呼ぶ）と命名するクローンである。ヌクレオチド配列は C D 7 9 a をコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図 8】図 7 に示される配列番号 7 のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号 8）を示す。

【図 9】キメラ S N 8 I g G 1 (抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h S N 8)) の軽鎖のヌクレオチド配列(配列番号：9)を示す。ヌクレオチド配列は、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h S N 8) の軽鎖をコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図 10】図 9 に示される配列番号：9 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：10)を示す(初めの 18 のアミノ酸シグナル配列を欠く)。可変領域は下線を付していない領域である。

【図 11】キメラ S N 8 I g G 1 (抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h S N 8)) の重鎖のヌクレオチド配列(配列番号：242)を示す。ヌクレオチド配列は、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h S N 8) の重鎖をコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図 12】図 11 に示される配列番号：11 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：12)を示す(初めの 18 のアミノ酸シグナル配列と停止コドン前の最後のリジン(K)を欠く)。可変領域は下線を付していない領域である。

【図 13】ヒト(配列番号：4)、カニクイザル(c y n o)(配列番号：8)及びマウス(配列番号：13)からの C D 7 9 b のアミノ酸配列のアラインメントを示す。ヒト及び c y n o - C D 7 9 b は 85% のアミノ酸同一性を有する。シグナル配列、試験ペプチド(実施例 9 に記載の 11 のアミノ酸ペプチド)、膜貫通(TM)ドメイン及びイムノレセプターチロシンベースの活性化モチーフ(I T A M)ドメインを示す。囲みで示す領域は、C D 7 9 b のスプライス変異体には存在しない C D 7 9 b の領域である(実施例 9 に記載)。

【図 14】正常な試料及び患部試料における T A H O 4 の発現、例えば、N H L 試料及び多発性骨髄腫(MM)、正常な小脳及び正常な血液における有意な発現を示しているマイクロアレイデータを示す。図中使用される省略形は、以下の通りである：非ホジキンリンパ腫(N H L)、濾胞性リンパ腫(F L)、正常なリンパ節(N L N)、正常な B 細胞(N B)、多発性骨髄腫細胞(MM)、小腸(s. i n t e s i n e)、胎児の肝臓(f. l i v e r)ナチュラルキラー細胞(N K)、好中球(N'phil)、樹状細胞(D C)、記憶 B 細胞(m e m B)、プラズマ細胞(P C)、骨髄プラズマ細胞(B M P C)。

【図 15】正常な試料及び患部試料における T A H O 5 の発現、例えば N H L 試料における有意な発現を示しているマイクロアレイデータを示す。図中使用される省略形は、以下の通りである：非ホジキンリンパ腫(N H L)、濾胞性リンパ腫(F L)、正常なリンパ節(N L N)、正常な B 細胞(N B)、多発性骨髄腫細胞(MM)、小腸(s. i n t e s i n e)、胎児の肝臓(f. l i v e r)ナチュラルキラー細胞(N K)、好中球(N'phil)、樹状細胞(D C)、記憶 B 細胞(m e m B)、プラズマ細胞(P C)、骨髄プラズマ細胞(B M P C)。

【図 16】抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h 2 F 2) の軽鎖のヌクレオチド配列(配列番号：32)を示す。抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h 2 F 2) をコードするヌクレオチド配列は、図 17 に示す。

【図 17】図 16 に示される配列番号：32 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：33)を示す。可変領域は下線を付していない領域である。

【図 18】抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h F 2) の重鎖のヌクレオチド配列(配列番号：34)を示す。抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (2 F 2) をコードするヌクレオチド配列は、図 19 に示す。

【図 19】図 18 に示される配列番号：34 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：35)を示す(停止コドン前の最後のリジン(K)を欠く)。可変領域は下線を付していない領域である。

10

20

30

40

50

【図 20】抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体 (c h 1 0 d 1 0) の軽鎖のヌクレオチド配列(配列番号: 4 0)を示す。ヌクレオチド配列は、抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体 (c h 1 0 d 1 0) の軽鎖をコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

【図 21】図 20 に示される配列番号: 4 0 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号: 4 1)を示す(初めの 1 8 のアミノ酸シグナル配列を欠く)。可変領域は下線を付していない領域である。

【図 22】抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体 (c h 1 0 d 1 0) の重鎖のヌクレオチド配列(配列番号: 2 4 2)を示す。ヌクレオチド配列は、抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体 (c h 1 0 d 1 0) の重鎖をコードし、その開始コドンと停止コドンを太字と下線で示す。

10

【図 23】図 22 に示される配列番号: 4 2 のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号: 4 3)を示す(初めの 1 8 のアミノ酸シグナル配列と停止コドン前の最後のリジン(K)を欠く)。可変領域は下線を付していない領域である。

【図 24】実施例 9 に記載のイムノグロブリン軽鎖を発現するためのプラスミド p D R 1 (配列番号: 4 8 ; 5 3 9 1 b p) の配列を示す。p D R 1 は、無関係抗体、ヒト化抗 C D 3 抗体 (Shalaby 等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)) の軽鎖をコードする配列を含み、開始及び停止コドンを太字及び下線で示す。

【図 25】実施例 9 に記載のイムノグロブリン軽鎖を発現するためのプラスミド p D R 2 (配列番号: 4 9 ; 6 1 3 5 b p) の配列を示す。p D R 2 は、無関係抗体、ヒト化抗 C D 3 抗体 (Shalaby 等, 上掲) の軽鎖をコードする配列を含み、開始及び停止コドンを太字及び下線で示す。

20

【図 26】実施例 9 (Shields 等, J Biol Chem, 276: 6591-6604 (2000)) に記載のイムノグロブリン軽鎖の発現のための p K L. L P G 3 ヒト K a p p a (配列番号: 5 0) を示す。

【図 27】実施例 9 (Shields 等, J Biol Chem, 276: 6591-6604 (2000)) に記載のイムノグロブリン重鎖の発現のための p K L. L P G 4 ヒト K a p p a (配列番号: 5 1) を示す。

【図 28】システイン改変抗 T A H O 抗体薬剤コンジュゲート (A D C) を描写する。ここでは、軽鎖 (L C - A D C) ; 重鎖 (H C - A D C) ; 及び F c 領域 (F c - A D C) 内の改変システイン基に薬剤成分が付着されている。

30

【図 29】(i) 還元剤 T C E P (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィンヒドロクロライド) による、システイン改変抗 C D 7 9 b 抗体 (T h i o M a b) の鎖内及び鎖間のジスルフィドとシステインジスルフィド付加物を還元する、(ii) d h A A (デヒドロアスコルビン酸) により部分的に酸化させる、すなわち、再酸化させて鎖内及び鎖間のジスルフィドを再形成させる、そして、(iii) 再酸化させた抗体を薬剤ーリンカー中間生成物とコンジュゲートさせ、システイン抗 C D 7 9 b 薬剤コンジュゲート (A D C) を形成させる、という工程を示す。

【図 30】ヒト化システイン改変抗 C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (チオー c h S N 8 - L C - V 2 0 5 C) の (A) 軽鎖配列 (配列番号: 5 8) 及び (B) 重鎖配列 (配列番号: 5 7) を示す。ここでは、軽鎖のカバット位置 2 0 5 のバリン (連続的な位置バリン 2 0 8) はシステインに変えられている。薬剤成分は、重鎖の改変されたシステイン基に付着されてもよい。各々の図において、変えられたアミノ酸は、二重下線と共に太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域は下線を付していない領域である。F c 領域は斜体で示す。「T h i o」はシステイン改変抗体を指す。

40

【図 31】ヒト化システイン改変抗 C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (チオー c h S N 8 - H C - A 1 1 8 C) の (A) 軽鎖配列 (配列番号: 6 0) 及び (B) 重鎖配列 (配列番号: 5 9) を示す。ここでは、重鎖の E u 位置 1 1 8 のアラニン (連続的な位置アラニン 1 1 8 ; カバット位置 1 1 4) はシステインに変えられている。薬剤成分は、重鎖の改変されたシステイン基に付着されてもよい。各々の図において、変えられたアミノ酸は、二重下線と共に太

50

字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域は下線を付していない領域である。Fc領域は斜体で示す。「Thio」はシステイン改変抗体を指す。

【図32】FACSプロットは、BJAB-ルシフェラーゼ細胞の表面に発現されるCD79b (TAHO5) に対する本発明の抗ヒトCD79b (TAHO5) チオMAb薬剤コンジュゲート(TDC)の結合が、コンジュゲートされたMMAFを有するchMA79bの(A) LC(V205C) チオMAb変異体及び(B) MMAFを用いたchSN8のHC(A118C) チオMAb変異体と同程度であることを示す。MS抗ヒトIgG-PEにより検出した。「Thio」はシステイン改変抗体を指す。

【図33】FACSプロットは、cynoCD79b (TAHO40) を発現するBJAB-細胞の表面に発現されるCD79bに対する本発明の抗cynoCD79b (TAHO40) チオMAb薬剤コンジュゲート(TDC)の結合が、(A)抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)のネイキッド(コンジュゲートされていない)HC (A118C) チオMAb変異体、及び示される異なる薬剤コンジュゲート((B) MMAE、(C) DM1及び(D) MMAF)を有する抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)のコンジュゲートされたHC (A118C) チオMAb変異体と同程度であることを示す。MS抗huIgG-PEにより検出した。「Thio」はシステイン改変抗体を指す。

【図34A】Granta-519(ヒトマントル細胞リンパ腫)異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍増殖の阻害のグラフであり、ヒトB細胞腫瘍を有するSCIDマウスに対する、改変したシステインの位置が異なる(LC(V205C)又はHC(A118C))及び/又は薬剤用量が異なる抗CD79b TDCの投与が、腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。チオ chSN8-HC(A118C)-MC-MMAF、薬剤負荷はおよそ1.9(表21)又はチオ chSN8-LC(V205C)-MC-MMAF、薬剤負荷はおよそ1.8(表21)にて処置した異種移植片モデルは、試験の間、腫瘍増殖の有意な阻害を示した。コントロールは、hu-抗HER2-MC-MMAF及びチオ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF及びchSN8-MC-MMAFを含んだ。

【図34B】Granta-519異種移植片試験(図33A及び表21)からのマウスの体重変化の割合のプロットである。これは、試験開始の14日間に体重の有意な変化がなかったことを示す。「Thio」はシステイン改変抗体を指し、「hu」はヒト化抗体を指す。

【図35】システイン改変抗cyno CD79b (TAHO40) 抗体(Thio-抗cyno CD79b (TAHO40)-HC-A118C)の(A)軽鎖配列(配列番号:62)及び(B)重鎖配列(配列番号:61)を示し、ここでは、重鎖のEu位置118のアラニン(連続的な位置アラニン118;カバット位置114)はシステインに変えられている。あるいは、重鎖のEU位置6のアミノ酸D(図の影を付した部分)はEであってもよい。薬剤成分は、重鎖の改変されたシステイン基に付着されてもよい。各々の図において、変えられたアミノ酸は、二重下線と共に太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域は下線を付していない領域である。Fc領域は斜体で示す。「チオ」はシステイン改変抗体を指す。

【図36】システイン改変抗cyno CD79b (TAHO40) 抗体(Thio-抗cyno CD79b (TAHO40)-LC-V205C)の(A)軽鎖配列(配列番号:960)及び(B)重鎖配列(配列番号:95)を示し、ここでは、軽鎖のカバット位置205のバリン(連続的な位置バリン208)はシステインに変えられている。あるいは、重鎖のEU位置6のアミノ酸D(図の影を付した部分)はEであってもよい。薬剤成分は、重鎖の改変されたシステイン基に付着されてもよい。各々の図において、変えられたアミノ酸は、二重下線と共に太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域は下線を付していない領域である。Fc領域は斜体で示す。「チオ」はシステイン改変抗体を指す。

【図37】BJAB-cynoCD79b(cynoCD79b (TAHO40) を発現するBJAB細胞)(パーキットリンパ腫)異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍増殖の阻害のグラフであり、これは、ヒトB細胞腫瘍を有するSCIDマウスに対する、異なる

リンカー薬剤成分(BMPEO-DM1、MC-MMAF又はMCvcPAB-MMAE)に
コンジュゲートさせた抗CD79b(TAHO40) TDCの投与が腫瘍増殖を有意に
阻害したことを示す。チオ 抗cyno CD79b(TAHO40)(ch10D10)-
HC(A118C)-BMPEO-DM1、薬剤負荷はおよそ1.8(表22)、チオ 抗c y
no CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF
、薬剤負荷はおよそ1.9(表22)又はチオ 抗cyno CD79b(TAHO40)(
ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE、薬剤負荷はおよそ1.8
6(表22)にて処置した異種移植片モデルは、試験の間、腫瘍増殖の有意な阻害を示した
。コントロールは、抗HER2コントロール(チオ hu-抗HER2-HC(A118C)
-BMPEO-DM1、チオ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MM
AE、チオ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)を含んだ。「チオ」
はシステイン改変抗体を指し、「hu」はヒト化抗体を指す。

【図38】BJAB-cynoCD79b(cynoCD79b(TAHO40)を発現
するBJAB細胞)(バーキットリンパ腫)異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍増殖の
阻害のグラフであり、これは、ヒトB細胞腫瘍を有するSCIDマウスに対する、示され
るように異なる用量で投与したBMPEO-DM1リンカー薬剤成分を有する抗CD79
b(TAHO40) TDCの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。チオ 抗c y
no CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1
、薬剤負荷はおよそ1.8(表23)にて処置された異種移植片モデルは、試験の間、腫瘍
増殖の有意な阻害を示した。コントロールは、抗HER2コントロール(チオ hu-抗H
ER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1)及びhuMA79b.v28コントロール
(チオ huMA79b.v28-HC(A118C)及び抗cynoCD79b(TAHO4
0)(ch10D10)コントロール(チオ 抗cynoCD79b(TAHO40)(ch
10D10)-HC(A118C))を含む。「チオ」はシステイン改変抗体を指し、「hu
」はヒト化抗体を指す。(好ましい実施態様の詳細な説明) I. 定義 ここで使用される
「TAHOポリペプチド」及び「TAHO」という用語は、直後に数値表示がある場合に
は種々のポリペプチドを指し、完全な表示(つまり、TAHO/数字)は、ここに記載す
る特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」という用語がここでは実際の数的表示と
して提供されている「TAHO/数字ポリペプチド」及び「TAHO/数字」という用語
には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペ
チド変異体の断片(ここでさらに定義される)を包含する。ここに記載されているTAH
Oポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく
、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「TAHOポリペプチド」という
用語は、ここに記載の各個々のTAHO/数字ポリペプチドを指す。「TAHOポリペ
チド」を指すこの明細書の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時に集合的に
指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、TAHO結合オリゴペプチドの形成、T
AHO結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各
ポリペプチドに関している。「TAHO4」はここで、「ヒトCD79a」とも呼ぶ。
「TAHO5」はここで、「ヒトCD79b」とも呼ぶ。「TAHO39」はここで、「
cynoCD79a」又は「カニクイザルCD79a」とも呼ぶ。「TAHO40」はこ
こで、「cynoCD79b」又は「カニクイザルCD79b」とも呼ぶ。「カニクイザ
ル」はここで、「cyno」とも呼ぶ。

【0067】

特に明記しない限り、本明細書において用いられる「CD79b」なる用語は、霊長類
(例えばヒト、カニクイザル(cyno))及び齧歯動物(例えばマウス及びラット)のような
哺乳動物を含む任意の脊椎動物供与源からの任意の天然のCD79bに関する。また、C
D79bは、本明細書中で「PRO36249」(配列番号:2)と称され、本明細書中で
「DNA225786」としても称されるヌクレオチド配列(配列番号:1)によってコード
される。また、カニクイザルCD79bは、本明細書中で「cynoCD79b」又は
「PRO283627」(配列番号:239)と称され、本明細書中で「DNA54845

10

20

30

40

50

5」としても称されるヌクレオチド配列(配列番号：238)によってコードされる。「CD79b」なる用語は、「完全長」、プロセシングされていないCD79b、並びに細胞内のプロセシングから生じるCD79bのいずれかの形態を包含する。また、この用語は、CD79bの天然に生じる変異体、例えばスプライス変異体、対立遺伝子変異体及びアイソフォームを包含する。本明細書において記述されるCD79bポリペプチドは、ヒト組織種ないしは他の供給源のような、様々な供与源から単離されてもよいし、又は組み換え法又は合成法によって調製されてもよい。「天然配列TAHOポリペプチド」には、天然由来のTAHO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。このような天然配列TAHOポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列TAHOポリペプチド」という用語には、特に、特定のTAHOポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列TAHOポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン(示されているならば)は、図において太字及び下線で示した。添付図に「N」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。しかし、添付図に開示したTAHOポリペプチドは、図面においてアミノ酸位置1としてここに表示されたメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をTAHOポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。

10

20

【0068】

ここで「B細胞表面上マーカー」又は「B細胞表面上抗原」とは、B細胞の表面上に発現する抗原であり、それを結合するアンタゴニスト、例えば限定するものではないが、天然に生じるB細胞抗原へのリガンドの結合をアンタゴナイズすることができるB細胞表面抗原ないしB細胞表面抗原の可溶型に対する抗体の標的となることができるものである。例示的B細胞表面上マーカーには、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及びCD86白血球表面上マーカーが含まれる。(詳しくは、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition, 1997, Barclay等編集, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New Yorkを参照)。他のB細胞表面上マーカーには、RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、Bti g、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、及び239287などがある。特に対象とするB細胞表面上マーカーは、哺乳動物の他の非B細胞組織と比較してB細胞上に主に発現しており、B細胞前駆細胞及び成熟B細胞の両方の細胞上に発現していてもよい。

30

【0069】

TAHOポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないTAHOポリペプチドの形態を意味する。通常、TAHOポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のTAHOポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインの何れかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。場合によっては、従って、TAHOポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界の何れかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される

40

50

。

【0070】

ここに開示する種々のT A H Oポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付図に示されうる。しかし、シグナルペプチドのC末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC末端境界の何れかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうることに留意される（例えば、Nielsen等, Prot. Eng.10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

「T A H Oポリペプチド変異体」とはT A H Oポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列T A H Oポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠くT A H Oポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しないT A H Oポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長T A H Oポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長T A H Oポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なT A H Oポリペプチドを意味する。このようなT A H Oポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN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T A H Oポリペプチドが含まれる。通常、T A H Oポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列T A H Oポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くT A H Oポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するT A H Oポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長T A H Oポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、T A H O変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、T A H O変異体ポリペプチドは、天然T A H O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T A H O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。

【0071】

ここで同定したT A H Oポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のT A H O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B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、又はM e g a l i g n (D N A S T A R) 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、A L I G N-2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較コンピュータプログラム A L I G N-2 を使用することによって得られる。A L I G N-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 で登録されている。A L I G N-2 プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N-2 プログラムは、U N I X (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタル U N I X (登録商標) V 4 . 0 D での使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、A L I G N-2 プログラムによって設定され変動しない。

10

アミノ酸配列比較に A L I G N-2 が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B への、それとの、又はそれに対する %アミノ酸配列同一性 (あるいは、与えられたアミノ酸配列 B への、それとの、又はそれに対する或る程度の %アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる) は次のように計算される：

分率 X/Y の 1 0 0 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム A L I G N-2 の A 及び B のプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する %アミノ酸配列同一性は、B の A に対する %アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 及び 3 は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「T A H O」と称されるアミノ酸配列に対する %アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「T A H O」は対象の仮想 T A H O ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「T A H O」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる假定アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての %アミノ酸配列同一性値は、A L I G N-2 コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

20

30

【0072】

「T A H O 変異体ポリヌクレオチド」又は「T A H O 変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、T A H O ポリペプチド、好ましくは活性 T A H O ポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列 T A H O ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列 T A H O ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示する T A H O ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長 T A H O ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列 (完全長 T A H O ポリペプチドの完全なコード化配列の一部分のみを表す核酸によってコードされた) と、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、T A H O 変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列 T A H O ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列 T A H O ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示する T A H O ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長 T A H O ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

40

通常、T A H O 変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約 5 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、

50

40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、
105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、
155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、
210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、
310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、
410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、
510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、
610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、
710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、
810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、
910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は10
00ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長に
その表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

10

【0073】

ここで同定されるTAHOコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のTAHO核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

20

30

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

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、「TAHO-DNA」が対象となる仮説的TAHOコード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「TAHO-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表していて、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「TAHO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

40

【0074】

他の実施態様では、TAHO変異体ポリヌクレオチドとは、TAHOポリペプチドをコ

50

ードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載の完全長T A H Oポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。T A H O変異体ポリペプチドは、T A H O変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

T A H Oポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、(添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される)本発明の完全長T A H Oポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を意味する。A T C C寄託核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、A T C Cに寄託されたベクター中に挿入されているc D N AのT A H Oポリペプチドコード部分を意味する(添付図において開始及び停止コドンの間にしばしば示される。(開始コドンと停止コドンを太字及び下線で示す))。 10

【0075】

ここに開示される種々のT A H Oポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でS D S - P A G Eにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、T A H Oポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。 20

「単離された」T A H Oポリペプチドをコードする核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペ 30

【0076】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なD N A配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのD N Aは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのD N Aに作用可能に結合している 40 ; プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している; 又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したD N A配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0077】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定 50

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

10

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1) 洗浄に低イオン強度及び高温を用いる、例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2) ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42℃で、50% (v/v) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム；又は(3) 42℃で、50%ホルムアミド、5×SSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50µg/ml)、0.1% SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液中で終夜ハイブリダイゼーション、42℃で、0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中にて10分間の洗浄、ついで55℃で、EDTAを含む0.1×SSCからなる10分間高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

20

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば、温度、イオン強度及び%SDS) の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37℃での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中にて約37-50℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

30

【0078】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したTAHOポリペプチド又は抗TAHO抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないよう

40

にかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8-50のアミノ酸残基 (好ましくは、約10-20の残基) を有する。ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるTAHOの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するTAHOポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生TAHOが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力以外の、天然又は天然発生TAHOによって引き起こされる生物機能 (阻害又は刺激) を意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生TAHOが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力を意味する。

【0079】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然T

50

A H O ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。同じように、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然 T A H O ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然 T A H O ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子等が含まれる。T A H O ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、T A H O ポリペプチドと候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子を接触させ、そして通常は T A H O ポリペプチドに関連している一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

【0080】

「精製」とは、分子が少なくとも 95 重量%又は含有される試料の少なくとも 98 重量%の濃度で試料中に存在することを意味する。

「単離された」核酸分子は、例えば天然の環境に通常付随している少なくとも一の他の核酸分子から分離された核酸分子である。さらに、単離された核酸分子は、核酸分子を通常発現するが、その核酸分子がその天然の染色体位置と異なる染色体位置にあるか又は染色体外に存在する、細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0081】

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 D N A セグメントが結合されうる円形の二本鎖 D N A 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 D N A セグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「組み換えベクター」と呼ぶ。一般に、組換え D N A 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。

【0082】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え(小さく)させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗 T A H O 抗体、T A H O 結合オリゴペプチド又は T A H O 結合有機分子の治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び／又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、T A H O ポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害(すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止)；腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止)；腫瘍成長のある程度の阻害；及び／又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗 T A H O 抗体又は T A H O 結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の成長を防ぐ及び／又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び／又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【0083】

疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、

有効性は、例えば、病気の進行までの時間（TTP）の算定及び／又は反応速度（RR）を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がり確かめるためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。CTスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸のX線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（TRUS）及び経直腸的針生検（TRNB）が含まれる。

より局所的な癌である膀胱癌に関しては、疾患の進行を確かめる方法には、膀胱鏡検査による尿細胞評価、尿中に存在する血液のモニタリング、超音波断層撮影又は静脈性腎盂像、コンピュータ断層撮影法（CT）及び磁気共鳴映像法（MRI）による尿路上皮性路の視覚化が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のCT、胸x線、又は骨格の放射性核種イメージングによって評価することができる。

【0084】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

「個体」は脊椎動物である。ある実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物（ウシなど）、スポーツ用動物、愛玩動物（ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類、マウス及びラットが含まれる。ある実施態様では、哺乳動物はヒトである。

癌の治療、症状の緩和又は診断のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0085】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）を含む。

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4275149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばTAHOポリペプチド、それらに対する抗体又はTAHO結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活

10

20

30

40

50

性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リボソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

【0086】

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

「薬学的製剤」なる用語は、活性成分の生物学的活性が有効となるような形態であり、製剤が投与される被検体に対して許容できない毒性がある付加的化合物を含まない調製物を指す。このような製剤は無菌でもよい。

「無菌の」製剤はすべての生きている微生物及びそれらの胞子を含まないで無菌である。

10

【0087】

ここに開示するポリペプチド、抗体、TAHO結合オリゴペプチド、TAHO結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【0088】

「治療的有效量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、TAHO結合オリゴペプチド、TAHO結合有機分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍成長をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の成長を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞障害性であり得る。

20

抗TAHO抗体、TAHOポリペプチド、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子の「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗TAHO抗体、TAHOポリペプチド、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子の「成長阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【0089】

30

抗TAHO抗体、TAHOポリペプチド、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子の「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のための抗TAHO抗体、TAHOポリペプチド、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子の「細胞障害性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗TAHOモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ(polyepitopic)特異性を持つ抗TAHO抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗TAHO抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗TAHO抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

40

【0090】

「SN8」なる用語は、Biomeda (Foster City, CA)、BDbioscience (San Diego, CA) 又はAncell (Bayport, MN)などから商業的な供与源から購入した抗ヒトCD79b (TAHO5)モノクローナル抗体、Roswell Park Cancer Institute (Okazaki 等, Blood, 81(1): 84-95 (1993))から入手したハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体又はRoswell Park Cancer Institute (Okazaki 等, Blood, 81(1): 84-95 (1993))から入手したハイブリドーマから得られる抗体を用いて生成したキメラ抗体（「chSN8」とも呼ぶ）を指すためにここで使用される。

「10D10」なる用語は、2006年7月11日にATCCにPTA-7715の抗

50

カニクイザルCD79b (TAHO40) 10D10 (10D10. 3)として寄託されたハイブリドーマから生成した抗カニクイザルCD79b (TAHO40)モノクローナル抗体又はATCCにPTA-7715の抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 10D10 (10D10. 3)として寄託されたハイブリドーマから生成したキメラ抗体(ここで、「ch10D10」とも呼ばれる)を指すために使用される。

抗体を指す際に使用される「ch」はキメラ抗体を特異的に指すために使用される。

「抗カニクイザルCD79b」又は「抗cynoCD79b」はカニクイザルCD79b (図8の配列番号: 8)に結合する抗体を示すためにここで使用される(2006年8月3日に出願された米国出願第11/462336号に以前に記載される)。「抗カニクイザルCD79b (ch10D10)」又は「抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)」又は「ch10D10」はカニクイザルCD79b (図43の配列番号: 239)に結合するキメラ抗カニクイザルCD79b抗体を示すためにここで使用される(2006年8月3日に出願された米国出願第11/462336号に以前に記載される)。抗カニクイザルCD79b (ch10D10)又はch10D10は、配列番号41 (図21)の軽鎖を含むキメラ抗カニクイザルCD79b抗体である。抗カニクイザルCD79b (ch10D10)又はch10D10は、配列番号43 (図23)の重鎖を更に含むキメラ抗カニクイザルCD79b抗体である。

【0091】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%以上の、最も好ましくは99重量%以上の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、 α 及び γ 鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(CH)が、 μ 及び ϵ アイソタイプに対しては4つのCHドメインが続く可変ドメイン(VH)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(CL)が続く可変ドメイン(VL)をN末端に有する。VLはVHと整列し、CLは重鎖の第一定常ドメイン(CH1)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。VLとVHは共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

【0092】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(CH)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なっ

たクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M という免疫グロブリンの 5 つの主要なクラスがあり、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる重鎖を有する。さらに γ 及び α のクラスは、C H 配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 及び I g A 2 が発現する。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。V ドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの 110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、V 領域は、それぞれ 9-12 アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された 15-30 アミノ酸のフレームワーク領域 (F R) と呼ばれる比較的不変の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな β -シート配置をとり、3 つの高頻度可変領域により接続された 4 つの F R 領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 β -シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域は F R により他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害 (A D C C) における抗体の寄与を示す。

【0093】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「C D R」からのアミノ酸残基(すなわち、V L においては、およそ残基 24-34 (L 1)、50-56 (L 2) 及び 89-97 (L 3)、及び V H においては、およそ 1-35 (H 1)、50-65 (H 2) 及び 95-102 (H 3); Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 及び／又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、V L においては、およそ残基 26-32 (L 1)、50-52 (L 2) 及び 91-96 (L 3)、及び V H においては、およそ 26-32 (H 1)、53-55 (H 2) 及び 96-101 (H 3); Chothia 及び Lesk J. Mol. Bio 1. 196:901-917 (1987)) を含んでなる。

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、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初に Kohler 等, Nature 256, 495 (1975) により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換え D N A 法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第 4816567 号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えば Clackson 等, Nature 352:624-628 (1991)、及び Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0094】

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 4

10

20

30

40

50

8 1 6 5 6 7 号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びにC L及び少なくとも重鎖定常ドメイン、C H 1、C H 2 及びC H 3を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0095】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、F a b、F a b'、F(a b')₂、及びF v断片;ダイアボディ(diabodies);直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2;Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「F c」断片を産生する。F a b断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(VH)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(CH1)からなる。各F a b断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きなF(a b')₂断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたF a b断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むCH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりF a b断片と相違する。F a b'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つF a b'を表す。F(a b')₂抗体断片は、通常はF a b'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0096】

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

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

【0097】

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

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、VHとVLドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つs F v断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」s F v断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗

体のVH及びVLドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開93/11161号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0098】

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

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトIgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原(すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} 以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(Kd)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上にて定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

【0099】

「TAHO結合オリゴペプチド」はここで記載される様なTAHOポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。TAHO結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。TAHO結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なTAHO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。TAHO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), Cwiria, 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)。

「T A H O結合有機分子」とは、ここに記載されるようなT A H Oポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。T A H O結合有機分子は既知の方法(例えばP C T公開第W O O O / 0 0 8 2 3号及びW O O O / 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。T A H O結合有機分子は通常、約2 0 0 0ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1 5 0 0、7 5 0、5 0 0、2 5 0又は2 0 0ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なT A H Oポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリ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P C T公開第W O O O / 0 0 8 2 3号及びW O O O / 3 9 5 8 5号参照)。

【0 1 0 0】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示細胞分取器(F A C S)分析又は放射免疫沈降(R I A)によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合の約1 0 %よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合によって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約1 0 - 4 M、あるいは少なくとも約1 0 - 5 M、あるいは少なくとも約1 0 - 6 M、あるいは少なくとも約1 0 - 7 M、あるいは少なくとも約1 0 - 8 M、あるいは少なくとも約1 0 - 9 M、あるいは少なくとも約1 0 - 1 0 M、あるいは少なくとも約1 0 - 1 1 M、あるいは少なくとも約1 0 - 1 2 M、あるいはそれ以上のK dを持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

「T A H Oポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なT A H Oポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。T A H Oポリペプチドは、癌細胞の表面上に発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞によって産生され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい成長阻害抗T A H O抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、2 0 %より多く、好ましくは約2 0 %か

ら約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でTAHO発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30 μ g/ml又は約0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約1 μ g/kgから約100mg/kg体重の抗TAHO抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

【0101】

「アポトーシスを誘発する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び／又は膜小胞の形成（アポトーシス体と呼ばれる）等により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、TAHOポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えばB細胞、T細胞、好塩基球、好酸球、好中球、単球、血小板、又は赤血球等の造血細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン（PS）転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核／クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、未処理細胞の約2～50倍、好ましくは約5～50倍、最も好ましくは約10～50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域（天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域）に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

【0102】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するFcレセプター（FcRs）と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFc γ RIIIのみを発現するのに対し、単球はFc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー細胞（NK細胞）が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、Fc γ RI、Fc γ RII及びFc γ RIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。Fc γ RIIIレセプターには、Fc γ RIIIA（「活性型レセプター」）及びFc γ RIIIB（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活

性型レセプターFcγRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcγRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRn (Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994))も含まれる。

10

【0103】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

20

【0104】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に制御されない細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態を関すか又は記述する。癌の例には、限定するものではないが、造血性癌又は血液関連の癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫又はリンパ系腫瘍、しかしまた、脾臓の癌やリンパ節の癌や、更にはカルチノーマ、芽細胞腫(ブラストーマ)及び肉腫が含まれる。癌のより具体的な例には、B細胞関連の癌、例えば高、中及び低悪性度リンパ腫(例えば粘膜関連のリンパ組織B細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫(NHL)などのB細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫及びホジキンリンパ腫、及びT細胞リンパ腫を含む)や、白血病(二次白血病、慢性リンパ球性白血病(CLL)、例えばB細胞白血病(CD5+ Bリンパ球)、脊髄性白血病、例えば急性脊髄性白血病、慢性脊髄性白血病、リンパ白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)及び脊髄形成異常を含む)や、他の血液学的な及び/又はB細胞ないしT細胞関連の癌が含まれる。また、好塩基球、好酸球、好中球及び単球のような多核白血球、樹状細胞、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞を含む更なる造血性細胞の癌も含まれる。また、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマントル細胞リンパ腫から選択される、癌性B細胞増殖性疾患も含まれる。B細胞癌の起源には、辺縁帯のメモリーB細胞の辺縁帯B細胞リンパ腫起源、胚中心のライトゾーンの中心細胞内の濾胞性リンパ腫及びびまん性大B細胞リンパ腫起源、B1細胞(CD5+)の慢性リンパ球性白血病及び小リンパ球性白血病起源、マントルゾーンのナイーブB細胞のマントル細胞リンパ腫起源、及び胚中心のダークゾーンの中心芽細胞のバーキットリンパ腫起源が含まれる。本明細書中で「造血性細胞組織」と称される造血性細胞を含む組織には、胸腺及び骨髄及び周辺リンパ組織、例えば脾臓、リンパ節、粘膜と関連したリンパ組織、例えば腸関連のリンパ組織、扁桃腺、パイエル板及び虫垂及び他の粘膜と関連するリンパ系組織、例えば気管支裏層が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺

30

40

50

癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌、膵癌、グリオーマ、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、白血病及び他のリンパ系増殖性疾患、及び様々なタイプの頭頸部癌が含まれる。

【0105】

本明細書中の「B細胞悪性腫瘍」には、非ホジキンリンパ腫(NHL)、例として軽度／濾胞性NHL、小リンパ球(SL)NHL、中程度／濾胞性NHL、中程度のびまん性NHL、高度免疫芽細胞NHL、高度リンパ芽球NHL、高度小型非切れ込み核細胞性NHL、バルキー(bulky)疾患NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連のリンパ腫、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症、非ホジキンリンパ腫(NHL)、リンパ球優性ホジキン病(LPHD)、小リンパ球性リンパ腫(SL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、再発性低悪性度NHL及びリツキシマブ抵抗性の低悪性度NHLを含む低悪性度NHL；白血病、例として急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病；マントル細胞リンパ腫；及び他の血液学的な悪性腫瘍が含まれる。このような悪性腫瘍は、CD79bなどのB細胞表面マーカーに対する抗体によって治療されてもよい。このような疾患は、CD79bなどのB細胞表面マーカーに対する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、本明細書中で開示したようなコンジュゲートしていない(「ネイキッド」)抗体又は細胞障害性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。また、このような疾患は、他の抗体ないし抗体薬剤コンジュゲート、他の細胞障害性剤、放射線又は他の同時ないしは連続して施される治療と組み合わせて、本発明の抗CD79b抗体ないし抗CD79b抗体薬剤コンジュゲートを含む併用療法によって治療されることが、本願明細書において意図される。本発明の例示的な治療方法では、本発明の抗CD79b抗体は、抗CD20抗体、イムノグロブリン又はこれらのCD20結合断片と組み合わせられて、ともにないしは連続して投与される。抗CD20抗体はネイキッド抗体又は抗体薬剤コンジュゲートであってもよい。併用療法の実施態様では、抗CD79b抗体は本発明の抗体であり、抗CD20抗体はリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)である。

【0106】

本明細書で使用する「非ホジキンリンパ腫」又は「NHL」という用語は、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を意味する。通常、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫には前記細胞が不在であることにより区別することができる。本明細書で使用する用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例は、従来技術に既知の分類方式、例えばColor Atlas of Clinical Hematology第3版；A. Victor Hoffbrand及びJohn E. Pettit(編)(Harcourt Publishers Limited 2000)(特に図11.57、11.58及び11.59参照)に記載の改訂版European-American Lymphoma (REAL)方式に従って当業者(腫瘍学者又は病理学者)によって認識されるあらゆるものを含む。より具体的な例としては、限定するものではないが、再発性又は抵抗性NHL、前線低悪性度NHL、第III/IV期NHL、化学療法に抵抗性のNHL、前駆体Bリンパ芽球性白血病及び／又はリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病及び／又は前リンパ球性白血病及び／又は小リンパ球リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、immunocytoma及び／又はリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ系質細胞性リンパ腫周辺帯B細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯-MALTリンパ腫、結節周辺帯リンパ腫、有毛細胞白血病、プラズマ細胞腫及び／又は形質細胞骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性NHL、マントル細胞リンパ腫、濾胞性中心リンパ腫(濾胞性)、中悪性度拡散性NHL、広汎性大B細胞リンパ腫、高悪性度NHL(高悪性度前線NHL及び高悪性度再発性NHLを含む)、自己幹細胞移植後の又は自己肝細胞移植に抵抗性のNHL再発、原発性縦隔大B細胞リンパ腫、原発性浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度非切断小細胞性NHL、巨大(bulky)病変NHL、パーキットリンパ腫、前駆体(周辺性)大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／又はセザリー症候群、皮膚(皮膚性)リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、

血管動原体リンパ腫が挙げられる。

【0107】

「疾患」は、本発明の物質／分子又は方法を用いた処置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、ここで処置される疾患の例には、悪性及び良性などの癌性状態；非白血病及びリンパ系腫瘍；ニューロン、グリア、アストロサイト(astrocytal)、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮性、間質性及びブラストコエリックの疾患；炎症性、免疫性、及び他の血管形成関連の障害が含まれる。さらに、疾患には、B細胞増殖性疾患及び／又はB細胞腫瘍などの癌性状態、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、進行性NHL、再発性進行性NHL、再発性低悪性度NHL、難治性NHL、難治性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、毛様細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)及びマンツル細胞リンパ腫が含まれる。

10

【0108】

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

【0109】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、TAHOポリペプチドを発現するものであり、TAHOポリペプチドを特異的に発現するか、又は過剰発現する種類の細胞である。細胞は特定の細胞種類の癌性細胞あるいは正常細胞でもよい。TAHOポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。その細胞は癌細胞、例えば、B細胞又はT細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害(ADCC)又は補体依存性障害(CDC)によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち、補体の無い)を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム(Pi)、トリパンブルー(Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995))又は7AADの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、BT474細胞でのPi取り込みアッセイで、Pi取り込みを誘導するものである。

20

30

「TAHO発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたTAHOポリペプチドを発現する。「TAHO発現癌」は、細胞表面上に存在するTAHOポリペプチドを有する、又はTAHOポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「TAHO発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのTAHOポリペプチドを生成し、抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的効果を有する。他の実施態様では、任意には「TAHO発現癌」は、抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのTAHOポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌TAHOポリペプチドの産生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。TAHOポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのTAHOポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。TAHOポリペプチド過剰発現は、検出又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるTAHOタンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる(例えば、TAHOポリペプチドをコード

40

50

する単離された核酸から、組み換えDNA技術を用いて調製することができる単離されたT A H Oポリペプチドに対して調製した抗T A H O抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；F A C S分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、T A H Oコード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（F I S H；1998年10月公開の国際公開98/45479を参照せよ）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術、例えばリアルタイム定量P C R（R T - P C R）を介して、細胞のT A H Oポリペプチドコード化核酸又はm R N Aのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、T A H Oポリペプチド過剰発現を研究してもよい（同じく、例えば、1990年6月12日に発行の米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開の国際公開91/05264；1995年3月28日に発行の米国特許第5401638号；Sias等、J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

【0110】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3、又はI g G - 4サブタイプ、I g A（I g A - 1及びI g A - 2を含む）、I g E、I g D又はI g Mなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識された」抗体、オリゴペプチド、又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド、又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

【0111】

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、R e ¹⁸⁶、R e ¹⁸⁸、S m ¹⁵³、B i ²¹²、P ³²及びL uの放射性同位体）、化学療法剤、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、又は他の挿入剤（i n t e r c a l a t i n g a g e n t）、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。他の細胞障害性剤が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

「毒素」は、細胞の成長又は増殖に対して有害効果を有することが可能な任意の物質である。

【0112】

作用機構に関係なく、「化学療法剤」は、癌の治療において有用な化学化合物である。化学療法剤の種類には、限定するものではないが、アルキル化剤（a l k y l a t i n g a g e n t）、ア

ンチメタボライ、紡錘体阻害剤植物アルカロイド、細胞障害性／抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害薬、抗体、光増感剤及びキナーゼ阻害薬が含まれる。化学療法剤は、「ターゲティング療法」と従来の化学療法とに用いられる化合物を含む。化学療法剤の例には、エルロチニブ(T A R C E V A (登録商標), Genentech/OSI Pharm.)、ドセタキセル(T A X O T E R E (登録商標), Sanofi-Aventis)、5-FU(フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、C A S 番号 5 1 - 2 1 - 8)、ゲムシタピン(G E M Z A R (登録商標), Lilly)、PD-0325901(C A S 番号 3 9 1 2 1 0 - 1 0 - 9, Pfizer)、シスプラチン(シス-ジアミン、ジクロロ白金(I I)、C A S 番号 1 5 6 6 3 - 2 7 - 1)、カルボプラチン(C A S 番号 4 1 5 7 5 - 9 4 - 4)、パクリタキセル(T A X O L (登録商標), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、トラスツズマブ(H E R C E P T I N (登録商標), Genentech)、テモゾロミド(4-メチル-5-オキソ-2,3,4,6,8-ペントアザ二環系[4.3.0]ノナ-2,7,9-トリエン-9-カルボキシアミド、C A S 番号 8 5 6 2 2 - 9 3 - 1, T E M O D A R (登録商標), T E M O D A L (登録商標), Schering Plough)、タモキシフェン((Z)-2-[4-(1,2-ジフェニルブト-1-エニル)フェノキシ]-N,N-ジメチル-エタンアミド、N O L V A D E X (登録商標), I S T U B A L (登録商標), V A L O D E X (登録商標))、及びドキシソルピシン(A D R I A M Y C I N (登録商標))、A k t i - 1 / 2、H P P D 及びラパマイシンが含まれる。

【0113】

化学療法剤の他の例には、オキサリプラチン(E L O X A T I N (登録商標), Sanofi)、ボルテゾミブ(V E L C A D E (登録商標), Millennium Pharm.)、スーテント(S U N I T I N I B (登録商標), S U 1 1 2 4 8, Pfizer)、レトロゾール(F E M A R A (登録商標), Novartis)、メシル酸イマチニブ(G L E E V E C (登録商標), Novartis)、X L - 5 1 8 (M e k インヒビター, Exelixis, 国際公開 2 0 0 7 / 0 4 4 5 1 5)、A R R Y - 8 8 6 (M e k インヒビター, A Z D 6 2 4 4, Array BioPharma, Astra Zeneca)、S F - 1 1 2 6 (P I 3 K インヒビター, Semafore Pharmaceuticals)、B E Z - 2 3 5 (P I 3 K インヒビター, Novartis)、X L - 1 4 7 (P I 3 K インヒビター, Exelixis)、P T K 7 8 7 / Z K 2 2 2 5 8 4 (Novartis)、フルベストラント(F A S L O D E X (登録商標), Astra Zeneca)、リユーコボリン(フォリン酸)、ラパマイシン(シロリムス, R A P A M U N E (登録商標), Wyeth)、ラパチニブ(T Y K E R B (登録商標), G S K 5 7 2 0 1 6, Glaxo Smith Kline)、ロナファニーブ(S A R A S A R T M, S C H 6 6 3 3 6, Schering Plough)、ソラフェニブ(N E X A V A R (登録商標), B A Y 4 3 - 9 0 0 6, Bayer Labs)、ゲフィチニブ(I R E S S A (登録商標), AstraZeneca)、イリノテカン(C A M P T O S A R (登録商標), C P T - 1 1, Pfizer)、ティピファニブ(Z A R N E S T R A T M, Johnson & Johnson)、A B R A X A N E T M (Cremophor-free)、パクリタキセルのアルブミン-変更ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Il)、バンデタニブ(r I N N, Z D 6 4 7 4, Z A C T I M A (登録商標), AstraZeneca)、クロラムブシル、A G 1 4 7 8、A G 1 5 7 1 (S U 5 2 7 1; Sugen)、テムシロリムス(T O R I S E L (登録商標), Wyeth)、パゾパニブ(GlaxoSmithKline)、カンフォスファミド(T E L C Y T A (登録商標), Telik)、チオテパ、及びシクロフォスファミド(C Y T O X A N (登録商標), N E O S A R (登録商標))；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(alt retamine)、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(triethylenethiophosphaoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolome lamine)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(acetogenins)(特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(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(dolastatin)；デュオカルマイシン(duoc

10

20

30

40

50

armycin)(合成類似体、KW-2189及びCBI-TM1を含む)；エレクトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne) 抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、カリケアマイシガンマ1I及びカリケアマイシンオメガ1I、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシン(dynemicin)、ダイネミシンA(dynemicinA)；クロドロネート(clodronate)などのビスホスホネート(bisphosphonates)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediyne) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、モルフォリノードキソルビシン、シアノモルフォリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む)、エビルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(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)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；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)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；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；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichoth

ecenes)(特に、T-2 トキシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「A r a - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビンブラスチン；エトポシド(V P - 1 6)；ミトキサントン；ビンクリスチン；ビノレルビン(N A V E L B I N E (登録商標))；ナベルビン(Navelbine)；ノバントロン(novantrone)；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；カペシタビン(X E L O D A (登録商標), Roche)；イバンドロナート(ibandronate)；C P T - 1 1；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0 10；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド類；、並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類及び誘導体が含まれる。

【0114】

また、「化学療法剤」の定義には、(i) 腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(S E R M)など、例えばタモキシフェン(N O L V A D E X (登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びF A R E S T O N (登録商標)(クエン酸トレミフェン)；(ii) アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害物質、それらは副腎でのエストロゲン産生を調節するものであり、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、M E G A S E (登録商標)(メゲストロールアセテート)、A R O M A S I N (登録商標)(エキセメスタン, Pfizer)、ホルメスタイン(formestane)、ファドロゾール、R I V I S O R (登録商標)(ゾロゾール(vorozole))、F E M A R A (登録商標)(レトロゾール, Novartis)及びA R I M I D E X (登録商標)(アナストロゾール, AstraZeneca)；(iii) 抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；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)；(iv) プロテインキナーゼインヒビター、例えばM E K インヒビター(国際公開2007/044515)；(v) 脂質キナーゼインヒビター；(vi) アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に不粘着性細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を抑制するもの、例えばP K C - α 、R a f 及びH - R a s、オブリメルセン(G E N A S E N S E (登録商標), Genta Inc.)；(vii) リボザイム、例えばV E G F 発現インヒビター(例えばA N G I O Z Y M E (登録商標))及びH E R 2 発現インヒビター；(viii) 遺伝子治療ワクチン、例えばA L L O V E C T I N (登録商標)、L E U V E C T I N (登録商標)及びV A X I D (登録商標)などのワクチン；P R O L E U K I N (登録商標) r I L - 2；L U R T O T E C A N (登録商標)などのトポイソメラーゼ1インヒビター；A B A R E L I X (登録商標) r m R H；(ix) ベバシズマブ(A V A S T I N (登録商標), Genentech)などの抗血管形成剤；並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。 30

また、「化学療法剤」の定義には、治療的抗体、例として、アレムツズマブ(C a m p a t h)、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標), Genentech)；セツキシマブ(E R B I T U X (登録商標), Imclone)；パニツムマブ(V E C T I B I X (登録商標), Amgen)、リツキシマブ(R I T U X A N (登録商標), Genentech/Biogen Idec)、ペルツズマブ(O M N I T A R G T M, 2 C 4, Genentech)、トラスツズマブ(H E R C E P T I N (登録商標), Genentech)、トシツモマブ(Bexxar, Corixia)、及び抗体薬剤コンジュゲート、ゲムツズマブオゾガマイシン(M Y L O T A R G (登録商標), Wyeth)が含まれる。 40

【0115】

本明細書中で用いられる「増殖阻害性剤」は、インビトロ又はインビボで、細胞、特にT A H O 発現癌細胞の増殖を阻害する化合物又は組成物を指す。したがって、増殖阻害性剤は、S期のT A H O 発現細胞の割合を有意に減少するものであってもよい。増殖阻害性 50

剤の例には、細胞サイクルの進行を(S期以外の時点で)遮断する薬剤、例えばG1停止及びM期停止を誘導する薬剤が含まれる。典型的なM期遮断剤には、ビンカ(ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン及びトポイソメラーゼII阻害薬、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が含まれる。G1を停止させる薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニソン、デカルバジン(decarbazine)、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ara-CのようなDNAアルキル化剤の場合でも、S期停止にずれ込むことがある。更なる情報は、Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13の、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"にある。タキサン(パクリタキセル及びドセタキセル)は、両方ともイチイの木から得られる抗癌薬である。ヨーロッパイチイから得られるドセタキセル(TAXOTERE(登録商標), Rhone-Poulenc Rorer)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標), Bristol-Myers Squibb)の半合成類似体である。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の微小管のアセンブリを促し、脱重合を予防することによって微小管を安定化し、その結果として細胞内の有糸分裂を阻害する。

【0116】

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

【0117】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)のような糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンプオエチン(TPO)；神経成長因子、例えばNGF- α ；血小板増殖因子；TGF- α 及びTGF- β のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、例えばインターフェロン- α 、- β 、- γ ；コロニー刺激因子(CSF)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；及び顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12のインターロイキン(IL)；TNF- α 又はTNF- β などの腫瘍壊死因子；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0118】

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び／又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指すために用いられる。

【0119】

「細胞内代謝物」なる用語は、抗体-抗原コンジュゲート(ADC)上の細胞内部で代謝プロセス又は反応から生じている化合物に関する。代謝プロセス又は反応はADCのペプ

チドリンカーのタンパク質切断や、ヒドラゾン、エステル又はアミドなどの官能基の加水分解といった酵素的な過程であってもよい。細胞内代謝物には、限定するものではないが、細胞内への移行、拡散、取り込み又は輸送後に細胞内切断が行われた遊離薬剤及び抗体が含まれる。

「細胞内に切断される」及び「細胞内切断」なる用語は、抗体－薬剤コンジュゲート(ADC)に対する細胞内の代謝プロセス又は反応であって、これによって薬剤成分(D)と抗体(Ab)間の共有結合、すなわちリンカーが壊れ、その結果、細胞内の抗体から遊離した薬剤が分離される。ゆえに、ADCの切断された成分は細胞内代謝物である。

【0120】

「生物学的利用能」なる用語は、患者に投与される薬剤の所定の量の全身有効性(すなわち、血液/血しょう濃度)を指す。生物学的利用能は、投与された用量形態から体循環に達する薬剤の時間(速度)と総量(程度)の測定値を示す絶対的な用語である。

「細胞障害活性」なる用語は、ADC又はADCの細胞内代謝物の細胞殺傷効果、細胞増殖抑制効果又は増殖阻害効果を指す。細胞障害活性は、細胞の半分が生存する単位容量当たりの濃度(モル又は質量)であるIC50値として表されてもよい。

【0121】

本明細書中で用いられる「アルキル」なる用語は、1～12の炭素原子($C_1 - C_{12}$)の飽和した線状又は分枝状の一価性炭化水素ラジカルを指し、このアルキル基が場合によって後述の一又は複数の置換基と独立して置換されていてもよい。他の実施態様では、アルキル基は、1～8の炭素原子($C_1 - C_8$)、又は1～6の炭素原子($C_1 - C_6$)である。アルキル基の例には、限定するものではないが、メチル(Me、 $-CH_3$)、エチル(Et、 $-CH_2CH_3$)、1-プロピル(n-Pr、n-プロピル、 $-CH_2CH_2CH_3$)、2-プロピル(i-Pr、i-プロピル、 $-CH(CH_3)_2$)、1-ブチル(n-Bu、n-ブチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-メチル-1-プロピル(i-Bu、i-ブチル、 $-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-ブチル(s-Bu、s-ブチル、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-メチル-2-プロピル(t-Bu、t-ブチル、 $-C(CH_3)_3$)、1-ペンチル(n-ペンチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ペンチル($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-ペンチル($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-2-ブチル($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ブチル($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-メチル-1-ブチル($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-メチル-1-ブチル($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-ヘキシル($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ヘキシル($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-ヘキシル($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-メチル-2-ペンチル($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ペンチル($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-メチル-2-ペンチル($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-メチル-3-ペンチル($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-3-ペンチル($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-ジメチル-2-ブチル($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-ジメチル-2-ブチル($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$)、1-ヘプチル、1-オクチルなどが含まれる。

【0122】

「アルケニル」なる用語は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素－炭素、sp²二重結合を有する2～8の炭素原子($C_2 - C_8$)の線状又は分岐状の一価性炭化水素ラジカルを指し、このアルケニル基は場合によって本明細書中に記載の一又は複数の置換基と独立して置換されていく、「シス」及び「トランス」定位、あるいは「E」及び「Z」定位を有するラジカルを含む。例には、エチレンイル又はビニル($-C=CH_2$)、アリル($-CH_2CH=CH_2$)などを含むが、これらに限定されるものではない。

「アルキニル」なる用語は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素－炭素、sp³三重結合を有する2～8の炭素原子($C_2 - C_8$)の線状又は分岐状の一価性炭化水素ラジカルを指し、このアルキニル基は場合によって本明細書中に記載の一又は複数の置換基と独立して置換されていく。例には、エチニル($-C\equiv CH$)、プロピニル(プロパルギル、-

10

20

30

40

50

C₂H₂C≡CH)などを含むが、これらに限定されるものではない。

【0123】

「カルボシクリル」、「炭素環の」、「炭素環」及び「カルボシクロ」は、単環として3～12の炭素原子(C₃～C₁₂)を、又は二重環として7～12の炭素原子を有する一価性非芳香族の飽和ないしは部分的不飽和の環を指す。7～12の原子を有する二環式の炭素環は、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]システムとして配置され、9又は10の環状原子を有する二環式の炭素環は、ビシクロ[5,6]又は[6,6]システムとして、又はビシクロ[2.2.1]ヘプタン、ビシクロ[2.2.2]オクタン及びビシクロ[3.2.2]ノナンなどの架橋したシステムとして配置されうる。単環の炭素環の例には、限定するものではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペント-1-エニル、1-シクロペント-2-エニル、1-シクロペント-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキス-1-エニル、1-シクロヘキス-2-エニル、1-シクロヘキス-3-エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、シクロドデシルなどが含まれる。

「アリール」は、親芳香族環システムの単一の炭素原子から1の水素原子の除去によって得られる6～20の炭素原子(C₆～C₂₀)の一価性芳香族炭化水素基を意味する。いくつかのアリール基は、「Ar」として例示的な構造で表される。アリールには、飽和、部分的な不飽和環、又は芳香族炭素環に融合した芳香族環を含む二環式ラジカルが含まれる。代表的なアリール基には、ベンゼン(フェニル)、置換されたベンゼン類、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、1,2-ジヒドロナフタレン、1,2,3,4-テトラヒドロナフチルなどから得られるラジカルが含まれるが、これらに限定されるものではない。アリール基は場合によって、本明細書において記述される一又は複数の置換基に独立して置換される。

【0124】

「ヘテロサイクル」、「ヘテロシクリル」及び「複素環」は本明細書中で交換可能に用いられ、少なくとも一の環原子が窒素、酸素、リン及び硫黄から選択されるヘテロ原子である3～20の環原子の、飽和ないしは部分的に不飽和の(すなわち、環内に一又は複数の二重及び／又は三重の結合を有する)炭素環式基を指し、この一又は複数の環原子が場合によって後述の一又は複数の置換基と独立して置換されている。ヘテロサイクルは、3～7員環を有するモノシクロ(2～6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～4のヘテロ原子)又は7～10員環を有するビシクロ(4～9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～6のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley and; Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載される。また、「ヘテロシクリル」には、複素環式基がヘテロシクリル基が飽和、部分的に不飽和の環、又は芳香族の炭素環又は複素環に融合されているラジカルが含まれる。複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、インドリニル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニルイミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサニル、3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプタニル、アザビシクロ[2.2.2]ヘキサニル、3H-インドールイルキノリジニル及びN-ピリジルウレアが含まれる。また、スピロ部分もこの定義の範囲内に含まれる。2環炭素原子がオキソ(=O)

部分に置換されている複素環基の例は、ピリミジノニル及び1,1-ジオキソーチオモルホリニルである。本明細書において複素環基は場合によって、本明細書中に記載される一又は複数の置換基によって、独立して置換されている。

【0125】

「ヘテロアリール」なる用語は、5員、6員又は7員環の一価性の芳香族基を指し、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される一又は複数のヘテロ原子を含む、5～20の原子の融合した環システム(少なくともその一つが芳香族である)を含む。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル(例えば、2-ヒドロキシピリジニルを含む)、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル(例えば、4-ヒドロキシピリミジニルを含む)、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、フリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル及びフロピリジニルである。ヘテロアリール基は場合によって、本明細書中に記載される一又は複数の置換基によって、独立して置換されている。

【0126】

複素環基又はヘテロアリール基は、可能な場合には、炭素(炭素結合)、又は窒素(窒素結合)結合されてもよい。限定ではなく例を挙げると、炭素結合した複素環又はヘテロアリールは、ピリジンの位置2、3、4、5又は6、ピリダジンの位置3、4、5又は6、ピリミジンの位置2、4、5又は6、ピラジンの位置2、3、5又は6、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール又はテトラヒドロピロールの位置2、3、4又は5、オキサゾール、イミダゾール又はイソチアゾールの位置3、4又は5、アジリジンの位置2又は3、アゼチジンの位置2、3又は4、キノリンの位置2、3、4、5、6、7又は8、又はイソキノリンの位置1、3、4、5、6、7又は8で結合される。

限定するものではないが、窒素が結合した複素環又はヘテロアリールは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾールの位置1、イソインドール又はイソインドリンの位置2、モルホリンの位置4、及びカルバゾール又はβ-カルボリンの位置9で結合される。

【0127】

「アルキレン」は、1～18の炭素原子であって、親のアルカンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する飽和した、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基には、限定するものではないが、メチレン($-\text{CH}_2-$)、1,2-エチル($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,3-プロピル($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,4-ブチル($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)などが含まれる。

「 $\text{C}_{10}-\text{C}_{100}$ アルキレン」は、式 $-(\text{CH}_2)_{10-100}-$ の直鎖の飽和した炭化水素基である。 $\text{C}_{10}-\text{C}_{100}$ アルキレンの例には、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、及びデカレンが含まれる。

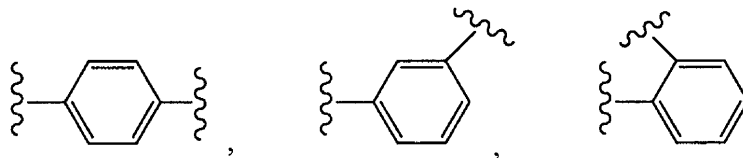
【0128】

「アルケニレン」は、2～18の炭素原子であって、親のアルケンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基には、限定するものではないが、1,2-エチレン($-\text{CH}=\text{CH}-$)が含まれる。

「アルキニレン」は、2～18の炭素原子であって、親のアルキンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキニレン基には、限定するものではないが、アセチレン($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、プロパルギル($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)、及び4-ペンチニル($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)が含まれる。

【0129】

「アリーレン」は2つの共有結合を有するアリール基であり、以下の構造で示すようなオルト、メタ又はパラの立体配置でありうる。



10

ここで、フェニル基は置換されていなくても、限定するものではないが、 $-\text{C}1-\text{C}8$ アルキル、 $-\text{O}-(\text{C}1-\text{C}8\text{アルキル})$ 、 $-\text{アリール}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、及び $-\text{CN}$ を含む最大4つの基にて置換されてもよく、それぞれの R' は、 H 、 $-\text{C}1-\text{C}8$ アルキル及びアリールから個々に選択される。

20

【0130】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの1つがアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。代表的なアリールアルキル基には、限定するものではないが、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどが含まれる。アリールアルキル基は6～20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、アリールアルキル基のアルキル部分は1～6の炭素原子であり、アリール部分は5～14の炭素原子である。

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの1つがヘテロアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。典型的なヘテロアリールアルキル基には、限定するものではないが、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチルなどが含まれる。ヘテロアリールアルキル基は6～20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、ヘテロアリールアルキル基のアルキル部分は1～6の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は5～14の炭素原子であり、1～3のヘテロ原子は N 、 O 、 P 及び S から選択される。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は3～7員環を有するモノシクロ(2～6の炭素原子)又は7～10員環を有するビシクロ(4～9の炭素原子と N 、 O 、 P 及び S から選択される1～3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。

30

40

【0131】

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親化合物ないし薬剤に比較して細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される本発明の化合物の前駆体又は誘導体形態を指す。例としてWilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)及びStella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)参照。本発明のプロドラッグは、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタ

50

ム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定はしないが、本発明で使用するプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性剤の例には、本発明の化合物及び前記の化学療法剤が含まれる。

【0132】

「代謝産物」は、特定の化合物又は塩の体内の代謝によって生産される生成物である。化合物の代謝産物は当分野で公知の慣例技術を使用して同定されてもよく、それらの活性は本明細書中に記載のものなどの試験を用いて決定されてもよい。このような生成物は、例えば、投与される化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、アミド分解、エステル化、エステル分解、酵素の切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が得られるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって産生される化合物を含む、本発明の化合物の代謝産物を含む。

「リボソーム」は、哺乳動物への薬剤の運搬に有用である様々な種類の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤から成る小さいベシクル(小胞)である。リボソームの構成成分は一般に二重層で配置され、これは生物学的膜の脂質配置と類似している。

【0133】

「リンカー」は、共有結合を含む化学的な部分又は薬剤部分に抗体を共有結合させる原子の鎖を指す。様々な実施態様では、リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、aryldiyl、heteroaryldiyl、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、JeffamineTM)の繰り返しユニットである $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ などの部分、及び、スクシナート、スクシニアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

【0134】

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

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

「ジアステレオマー」はキラリティの2以上の中心を有し、その分子が互いの鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的性質、例えば融点、沸点、分光特性及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィなどの高分解能解析手順により分離されうる。

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

【0135】

本明細書中で用いる立体化学的定義及び慣例は、一般にS. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及び Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在する。すなわち直線偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物を記載する場合、接頭語DとL又はRとSを用いて、キラル中心(一又は複数)の周りの分子の絶対配置を示す。接頭後dとl又は(+)と(-)は、化合物による直線偏光の回転のサインを示すために用いるものであって、(-)又はlは化合物が左旋性であることを意味する。(+)又はdを接頭に付した化合物は右旋性である。所定の化学構造では、互いの鏡像であることを除いて、これらの立体異性体は同一である。また、特定の立体異性体は鏡像異性体とも称され、この異性体の混合物は鏡像異性体混合物と称されることが多い。鏡像異性体の50:50混合物は、化学的反応又は過程において立体選別でも立体特異性でもなくなった場合に生じうるラセミ混合物又はラセミ化合物を指す。「ラセミ混合物」及び「ラセミ化合物

」なる用語は、光学活性を欠く、2つの鏡像異性種を指す。

【0136】

「互変異性体」又は「互変異性型」なる用語は、低エネルギー障壁を経た相互転換性である異なるエネルギーの構造異性体を指す。例えば、陽子互変異性体(別名プロト親和性互変異性体)には、陽子の移動による相互変換、例えばケト-エノール及びイミン-エナミン異性化が含まれる。原子価互変異性体には、いくつかの結合電子の再編成による相互転換が含まれる。

【0137】

本明細書中で用いる「薬学的に許容可能な塩」なる表現は、本発明の化合物の薬学的に許容可能な有機塩又は無機塩を指す。例示的な塩には、限定するものではないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ素、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、琥珀酸塩、マレイン酸塩、gentisinate、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシレート」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、及びパモ酸塩(すなわち、1,1'-メチレンビス(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート))が含まれる。薬学的に許容可能な塩は、他の分子、例えば酢酸イオン、琥珀酸イオン又は他の対イオンの包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物上の荷電を安定化する任意の有機又は無機の部分でもよい。さらに、薬学的に許容可能な塩は、その構造内に複数の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容可能な塩の一部である場合は複数の対イオンを有する。したがって、薬学的に許容可能な塩は、一又は複数の荷電原子及び／又は一又は複数の対イオンを有してもよい。

【0138】

本発明の化合物が塩基性である場合、当分野で有用な任意の好適な方法、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸などといった無機酸による遊離塩基の処理、又は酢酸、トリフルオロ酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ピルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシジル酸、例としてグルクロン酸又はガラクトン酸、 α -ヒドロキシ酸、例えばクエン酸又は酒石酸、アミノ酸、例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸、芳香族酸、例えば安息香酸又はニッケイ酸、スルホン酸、例えばp-トルエンスルホン酸又はエタンスルホン酸などといった有機酸による遊離塩基の処理によって調製されてもよい。

本発明の化合物が酸である場合、所望の薬学的に許容可能な塩は、任意の好適な方法、例えば、アミン(一次、二次又は三次)、アルカリ金属水酸化物又はアルカリ土類金属水酸化物などといった無機塩基又は有機塩基による遊離酸の処理によって調製されてもよい。好適な塩の例示的な例には、限定するものではないが、アミノ酸、例えばグリシン及びアルギニン、アンモニア、一次、二次、三次のアミン、及び環状アミン、例えばピペリジン、モルホリン及びピペラジンから得られる有機塩、並びにナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウム及びリチウムから得られる無機塩が含まれる。

【0139】

「薬学的に許容可能な」という表現は、物質又は組成物が製剤を含む他の成分と、及び／又は処置される哺乳動物と化学的及び／又は毒物学的に適合性がなければならないことを表す。

「溶媒和化合物」は、一又は複数の溶媒分子と本発明の化合物との結合又は複合体を指す。溶媒和化合物を形成する溶媒の例には、限定するものではないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸及びエタノールアミンが含まれる。「水和物」なる用語は溶媒分子が水である場合の複合体を指す。

【0140】

「保護基」なる用語は、化合物上の他の官能基と反応する間に特定の官能性をブロック

又は保護するために一般的に用いられる置換を指す。例えば、「アミノ-保護基」は、化合物内のアミノ官能性をブロックし又は保護するアミノ基が付着している置換基である。望ましいアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、*t*-ブトキシカルボニル(BOC)、ベンジルオキシカルボニル(CBZ)及び9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル(Fmoc)が含まれる。同様に、「ヒドロキシ-保護基」は、ヒドロキシ官能性をブロック又は保護するヒドロキシ基の置換基を指す。適切な保護基には、アセチル及びシリルが含まれる。「カルボキシ-保護基」は、カルボキシ官能性をブロック又は保護するカルボキシ基の置換基を指す。一般的なカルボキシ保護基には、フェニルスルホニルエチル、シアノエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、2-(*p*-トルエンスルホニル)エチル、2-(*p*-ニトロフェニルスルフェニル)エチル、2-(ジフェニルホスフィノ)-エチル、ニトロエチルなどが含まれる。保護基の一般的な解説及びその使用については、T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照のこと。

10

「脱離基」は、他の官能基によって置換されうる官能基を指す。特定の脱離基は当分野で公知であり、例として、限定するものではないが、ハロゲン化物(例えば、クロライド、ブロマイド、イオジド)、メタンスルホニル(メシル)、*p*-トルエンスルホニル(トシル)、トリフルオロメチルスルホニル(トリフレート)、及びトリフルオロメチルスルホネートなどがある。

【0141】

省略記号

20

リンカー成分：

MC = 6-マレイミドカプロイル

Val-Cit又は「vc」=バリニン-シトルリン(プロテアーゼにより切断可能なリンカーの例示的なジペプチド)

シトルリン = 2-アミノ-5ウレイドペンタン酸

PAB = *p*-アミノベンジルオキシカルボニル(「自己犠牲(self immolative)」リンカー成分の例)

Me-Val-Cit = N-メチル-バリニン-シトルリン(リンカーペプチド結合が、カテプシンBによる切断を阻害するように修飾されているもの)

MC(PEG)6-OH = マレイミドカプロイル-ポリエチレングリコール(抗体システムに結合しうる)

30

細胞障害性剤：

MMAE = モノメチルアウリスタチンE(MW 718)

MMAF = 薬剤のC末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンE(MMAE)の変異体(MW 731.5)

MMAF-DMAEA = C末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にDMAEA(ジメチルアミノエチルアミン)を有するMMAF(MW 801.5)

MMAF-TEG = フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを有するMMAF

MMAF-NtBu = MMAFのC末端にアミドとして結合した、N-*t*-ブチル

40

DM1 = N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン

DM3 = N(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン

DM4 = N(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン

【0142】

さらに、略語は以下の通りである：AEはアウリスタチンEであり、BocはN(*t*-ブトキシカルボニル)であり、citはシトルリンであり、dapはドラプロイン(dolaproine)であり、DCCは1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、DCMはジクロロメタンであり、DEAはジエチルアミンであり、DEADはジエチルアゾジカルボキシレ

50

ートであり、DEPCはジエチルホスホリルシアニダートであり、DIADはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、DIEAはN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、dilはドライソロイシンであり、DMAはジメチルアセトアミドであり、DMAPは4-ジメチルアミノピリジンであり、DMEはエチレングリコールジメチルエーテル(又は1,2-ジメトキシエタン)であり、DMFはN,N-ジメチルホルムアミドであり、DMISOはジメチルスルホキシドであり、doeはドラフェニン(dolaphenine)であり、dovはN,N-ジメチルバリンであり、DTNBは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、DTPAはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、DTTはジチオトレイトールであり、EDCIは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、EEDQは、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンであり、ES-MSはエレクトロスプレー質量分析であり、EtOAcは酢酸エチルであり、FmocはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、glyはグリシンであり、HATUは、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、HOBtは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、HPLCは高速液体クロマトグラフィであり、ileはイソロイシンであり、lysはリジンであり、MeCN(CH₃CN)はアセトニトリルであり、MeOHはメタノールであり、Mtrは4-アニシルジフェニルメチル(又は4-メトキシトリチル)であり、(1S, 2R)-(+)-ノルエフェドリンではなく、PBSはリン酸塩緩衝生理食塩水(pH 7.4)であり、PEGはポリエチレングリコールであり、Phはフェニルであり、Pnpはp-ニトロフェニルであり、MCは6-マレイミドカプロイルであり、pheはL-フェニルアラニンであり、PyBroPは、プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、SECはサイズ排除クロマトグラフィであり、Suはスクシンイミドであり、TFAはトリフルオロ酢酸であり、TLCは薄層クロマトグラフィであり、UVは紫外線であり、valはバリンである。

【0143】

「遊離したシステインアミノ酸」は、親抗体内に改変されているシステインアミノ酸残基を指し、チオール官能基(-SH)を有し、分子内ないし分子間ジスルフィド架橋として対形成しない。

「チオール反応値」なる用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴づけである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、1の最大値に変換される。例えば、ビオチン-マレイミド試薬などのチオール反応試薬と100%の収率で反応してビオチン標識抗体を形成するシステイン改変抗体の遊離システインアミノ酸はチオール反応値が1.0となる。チオール反応試薬と80%の収率で反応する同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0.8となる。チオール反応試薬と完全に反応しない同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0となる。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、又は他の定量的な分析試験によって行ってもよい。

【0144】

「親抗体」は、一又は複数のアミノ酸残基が一又は複数のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然の又は野生型の配列を含んでもよい。親抗体は、他の天然、野生型又は修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾(例えば付加、欠失及び/又は置換)を有してもよい。親抗体は、対象の標的抗原、例えば生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。また、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第5091178号を参照)に対する抗体も考慮される。

表1

```

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps(); /* get the actual jumps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

10

20

main

30

40

表1(続き)

```

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

nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int        *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;              /* score for each type */
    int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register   id;               /* diagonal index */
    register   ij;              /* jmp index */
    register   *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

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

```

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}

(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);

(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

print()
{
    int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {        /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {   /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

10

20

print

30

40

表1(続き)

```

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

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

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

```

...pr_align

10

20

30

40

dumpblock

表1(続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
{
    int      ix;

```

10

20

30

40

表1(続き)

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

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

```

10

```

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{

```

stars

20

```

    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

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

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

```

30

40

表1(続き)

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

```
static
```

```
stripname(pn)
```

```
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
```

```
{
```

```
    register char    *px, *py;
```

```
    py = 0;
```

```
    for (px = pn; *px; px++)
```

```
        if (*px == '/')
```

```
            py = px + 1;
```

```
    if (py)
```

```
        (void) strcpy(pn, py);
```

```
    return(strlen(pn));
```

```
}
```

stripname

10

表1 (続き)

```

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

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

```

表1(続き)

<pre> py = pseq + 4; *len = tlen; rewind(fp); while (fgets(line, 1024, fp)) { if (*line == ';' *line == '<' *line == '>') continue; for (px = line; *px != '\n'; px++) { if (isupper(*px)) *py++ = *px; else if (islower(*px)) *py++ = toupper(*px); if (index("ATGCU", *(py-1))) natgc++; } } *py++ = '\0'; *py = '\0'; (void) fclose(fp); dna = natgc > (tlen/3); return(pseq+4); } char * g_calloc(msg, nx, sz) char *msg; /* program, calling routine */ int nx, sz; /* number and size of elements */ { char *px, *calloc(); if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) { if (*msg) { fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz); exit(1); } } return(px); } </pre>	...getseq	10
<pre> /* * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main() */ readjmps() { int fd = -1; int siz, i0, i1; register i, j, xx; if (fj) { (void) fclose(fj); if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) { fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname); cleanup(1); } } for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) { while (1) { for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--) ; </pre>	g_calloc	20
<pre> /* * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main() */ readjmps() { int fd = -1; int siz, i0, i1; register i, j, xx; if (fj) { (void) fclose(fj); if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) { fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname); cleanup(1); } } for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) { while (1) { for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--) ; </pre>	readjmps	30
		40

表1(続き)

...readjumps

```

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

```

表1(続き)

```

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

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

```

writejumps

10

20

表2

TAHO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Length = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	(Length = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
 ÷ (TAHOポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

30

5 divided by 15 = 33.3%

表3

TAHO	XXXXXXXXXXXX	(Length = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYZZYZ	(Length = 15 アミノ酸)

40

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)
 ÷ (TAHOポリペプチドの全アミノ酸残基の数) =

5 divided by 10 = 50%

表4

TAHO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 14 スクレオチド)
比較DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(Length = 16 スクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するスクレオチドの数)
÷(TAHO-DNA核酸配列の全スクレオチドの数)=

10

6 divided by 14 = 42.9%

表5

TAHO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 スクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLVV	(Length = 9 スクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するスクレオチドの数)
÷(TAHO-DNA核酸配列の全スクレオチドの数)=

20

4 divided by 12 = 33.3%

【 0 1 4 5 】

I I . 本発明の組成物及び方法

30

A . 抗 T A H O 抗体

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

【 0 1 4 6 】

1 . ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、S O C 1 2、又はR及びR 1が異なるアルキル基であるR 1 N = C = N Rを用いて結合させることができる。

40

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 μ g又は5 μ g（それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1 / 5ないし1 / 10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加

50

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。

【0147】

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))。 10

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞(融合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する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、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(HAT培地)。 20

【0148】

好ましい融合のパートナーである骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーク・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。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。 30

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。 40

【0149】

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)のスキッチャード分析によって測定することができる。 40

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖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。 50

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クロマトグ 50

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、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerer等, Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。 10

【0150】

更なる実施態様では、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。 20

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(CH及びCL)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換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。 30

【0151】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-TAHO抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr 40 50

. 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 C D R 又は C D R 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, 8 1 6, 5 6 7 号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及び場合によっては幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

10

【0152】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及び H A M A 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 (F R) 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))。

20

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、F R 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。

30

【0153】

ヒト化抗 T A H O 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 F a b であってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷 I g G 1 抗体であってもよい。

40

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J H)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Ruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993) ; 米国特許第 5 5 4 5 8 0 6 号、同 5 5 6 9 8 2 5 号、同 5 5 9 1 6 6 9 号 (全てジェンファーム(GenPharm)) ; 同 5 5 4 5 8 0 7 号

50

；及び国際公開第 97/17852 号を参照されたい。

【0154】

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)。

【0155】

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。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Fv断片(scfv)である。国際公開93/16185号；米国特許第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。

【0156】

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、T A H Oタンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とT A H O結合部位とが結合しうる。あるいは、抗T A H Oアームは、T A H O-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、F c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I (C D 3 2)及びF c γ R I I I (C D 1 6)等のI g G (F c γ R)に対するF c レセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばC D 3)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T A H Oを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はT A H O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- α 、ビンカアルカロイド、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 (a b')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-E r b B 2/抗-F c γ R I I I 抗体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗-E r b B 2/抗-F c γ R I 抗体が開示されている。二重特異性抗-E r b B 2/F c α 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-E r b B 2/抗-C D 3 抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein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Trauneker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0157】

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 H 2 及びC H 3 領域を含むI g 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 H 1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているD N A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。

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

【0158】

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 H 3 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。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第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。

【0159】

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(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F(ab')₂-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF(ab')₂-チオールに再変換し、他のF(ab')₂-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

最近の進歩により、大腸菌からのF(ab')₂-SH断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby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(ab')₂分子の製造を記述している。各F(ab')₂断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びErB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0160】

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)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF(ab')₂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VLにVHを結合してなる。従って、一つの断片のVH及びVLドメインは他の断片の相補的VL及びVHドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)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)。

【0161】

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、

10

20

30

40

50

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HIV感染の治療のために〔国際公開第91/00360；国際公開第92/200373；欧州特許第03089号〕提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミ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。

【0162】

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。

【0163】

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うる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、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)ヘ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。

【0164】

9. イムノコンジュゲート(免疫抱合体)

また、本発明は、化学療法剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される)に関する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗体と化学療法剤又は他の毒素を含む。こういったイムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を上記に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス(*Saponaire officinalis*)インヒビター、ゲロニン(gelolin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。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-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル(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)ヘキサレンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2、6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。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)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合(コンジュゲート)のためのキレート剤の例である。国際公開公報第1994/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、アウリスチンペプチド、例えばモノメチルアウリスチン(MMAE)(ドラスタチンの合成アナログ)、メイタンシノイド、例えばDM1、トリコテセン、及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体もまた、ここで考察される。

【0165】

例示的なイムノコンジュゲート-抗体-薬剤コンジュゲート

本発明のイムノコンジュゲート(又は「抗体-薬剤コンジュゲート」(「ADC」))は、以下の式Iのものであり、任意のリンカー(L)を介して、一又は複数の薬剤部分(D)に抗体がコンジュゲート(すなわち共有結合)しているものである。ADCはチオMAb薬剤コンジュゲート(「TDC」)を含んでもよい。



したがって、抗体は直接又はリンカーを介して薬剤にコンジュゲートしうる。式Iでは、pは抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、例えば1抗体あたりおよそ1~およそ20の薬剤部分、ある実施態様では、抗体あたり1~およそ8の薬剤部分の範囲でありうる。本発明には、式Iの抗体-薬剤化合物の混合物を含有する組成物であって、抗体当たりの平均薬剤負荷がおよそ2からおよそ5、又はおよそ3からおよそ4であるものが含まれる。

【0166】

a. 例示的なリンカー

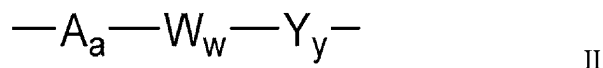
リンカーは、一又は複数のリンカー成分を含みうる。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、及びリンカー試薬とのコンジュゲートから生じるもの：N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIB」)が含まれる。様々なリンカー成分が当分野で公知であり、そのいくつかを以下に記載する。

リンカーは、細胞内での薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」でもよい。例えば、酸に弱いリンカー(例えばヒドラゾン)、プロテアーゼ感受性(例えばペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari等, Cancer Research 52:127-131[1992]; 米国特許第5208020号)を使用してもよい。

10

【0167】

ある実施態様では、リンカーは以下の式IIに示される通りである。

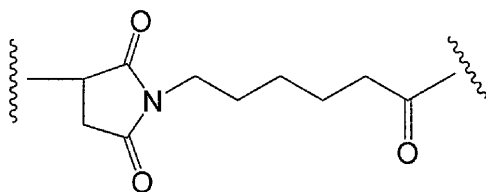


このとき、Aはストレッチャーユニットであり、0から1の整数であり、Wはアミノ酸ユニットであり、wは0から12の整数であり、Yはスペーサーユニットであり、yは0、1又は2であり、Ab、D及びpは式Iについて先に定義した通りである。このようなリンカーの例示的な実施態様は、米国公開2005-0238649A1に記述される。その内容は出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

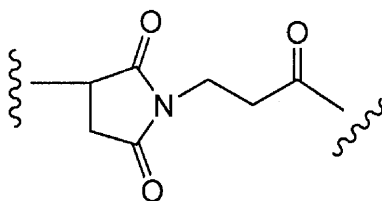
20

【0168】

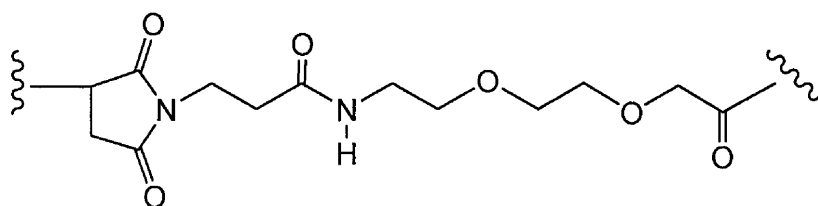
いくつかの実施態様では、リンカー成分は、抗体を他のリンカー成分又は薬剤部分に連結する「ストレッチャーユニット」を含んでもよい。例示的なストレッチャーユニットを以下に示す(波線は抗体への共有結合の部位を示す)。



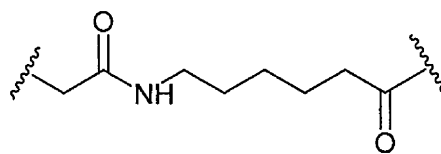
MC



MP



MPEG



【0169】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸ユニットを含みうる。そのような実施態様では、アミノ酸ユニットにより、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能となり、それによってリソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露によってイムノコンジュゲートからの薬剤放出が促される。例としてDoronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784を参照。例示的なアミノ酸ユニットには、限定するものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c又はval-c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f又はala-phe)；フェニルアラニン-リジン(f k又はphe-l y s)；又はN-メチル-バリン-シトルリン(Me-val-c i t)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y-val-c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y-g l y-g l y)が含まれる。アミノ酸ユニットは、天然に生じるアミノ酸残基、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含みうる。アミノ酸ユニットは設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【0170】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸ユニットを含みうる。そのような実施態様では、アミノ酸ユニットにより、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能となり、それによってリソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露によってイムノコンジュゲートからの薬剤放出が促される。例としてDoronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784を参照。例示的なアミノ酸ユニットには、限定するものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c又はval-c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f又はala-phe)；フェニルアラニン-リジン(f k又はphe-l y s)；又はN-メチル-バリン

-シトルリン(Me-v a l -c i t)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y -v a l -c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y -g l y -g l y)が含まれる。アミノ酸ユニットは、天然に生じるアミノ酸残基、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含みうる。アミノ酸ユニットは設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【0171】

いくつかの実施態様では、リンカー成分は、直接又は、ストレッチャーユニット及び／又はアミノ酸ユニットにより、抗体を薬剤部分に連結する「スペーサー」ユニットを含みうる。スペーサーユニットは、「自己犠牲」又は「非自己犠牲」であってもよい。「非自己犠牲」のスペーサーユニットは、ADCの酵素的な(例えばタンパク質分解性の)切断によりスペーサーユニットの一部又はすべてが薬剤部分に結合したままとなるものである。非自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン-グリシンスペーサーユニットが含まれる。また、配列特異的な酵素的切断の影響を受けるペプチド性スペーサーの他の組合せも考慮される。例えば、グリシン-グリシンスペーサーユニットを含有するADCの腫瘍細胞関連のプロテアーゼによる酵素切断によって、残りのADCからグリシン-グリシン-薬剤部分が放出されるであろう。そのような実施態様では、グリシン-グリシン-薬剤部分は腫瘍細胞の異なる加水分解処理を受け、それによってグリシン-グリシンスペーサーユニットを薬剤部分から分離する。

10

20

【0172】

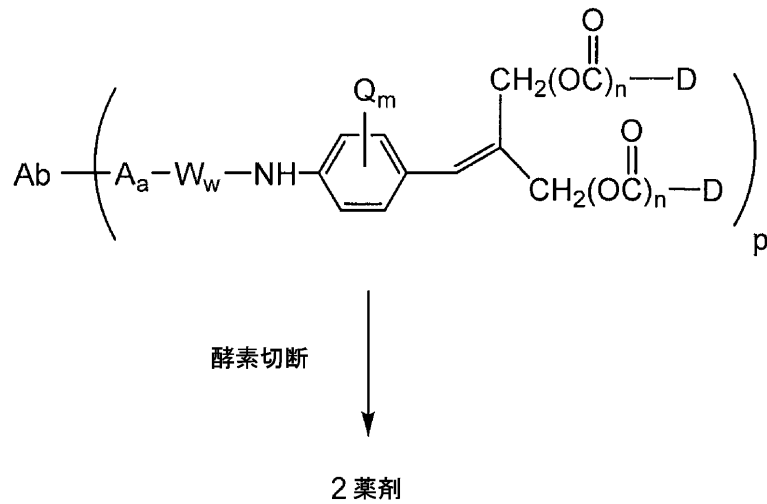
「自己犠牲」のスペーサーユニットは、異なる加水分解処置を経ずに薬剤部分を放出させる。ある実施態様では、リンカーのスペーサーユニットはp-アミノベンジルユニットが含まれる。このような実施態様では、p-アミノベンジルアルコールはアミド結合によりアミノ酸ユニットに結合し、カルバメート、メチルカルバメート又はカルボネートがベンジルアルコールと細胞障害性剤との間に作られる。例としてHamann等(2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103を参照。一実施態様では、スペーサーユニットはp-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)である。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニットのフェニレン部分はQ_mに置き換えられ、このQは-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そしてmは0~4の範囲の整数である。さらに、自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、p-アミノベンジルアルコールに電子工学的に類似している芳香族化合物(例として米国特許公開第2005/0256030号A1を参照)、例えば2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及びオルソ-ないしはパラ-アミノベンジルアセタール類が含まれる。アミド結合加水分解により環化されるスペーサー、例として、置換されたいしは置換されていない4-アミノ酪酸アミド類(Rodrigues等, Chemistry Biology, 1995, 2, 223); 適切に置換されたビスクロ[2.2.1]及びビスクロ[2.2.2]環システム(Storm,等, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); 及び、2-アミノフェニルプロピオン酸アミド類(Amsberry,等, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)が用いられうる。グリシンのα-位置で置換されているアミン含有薬剤の除去(Kingsbury,等, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)もまたADCに有用な自己犠牲のスペーサーの例である。

30

40

【0173】

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



10

ここで、Qは-C1-C8アルキル、-O-(C1-C8アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、mは0～4の範囲の整数であり、nは0又は1であり、そして、pは1～およそ20の範囲である。

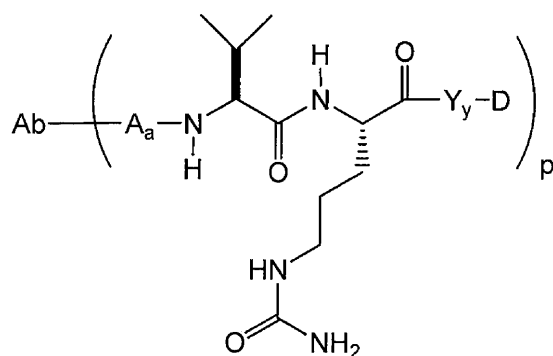
【0174】

他の実施態様では、リンカーLは、分岐状の、多機能リンカー成分により一又は複数の薬剤成分が抗体に共有結合するための樹枝型のリンカーであってもよい(Sun等(2002) Bioorganic and; Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun等(2003) Bioorganic and; Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増す、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。

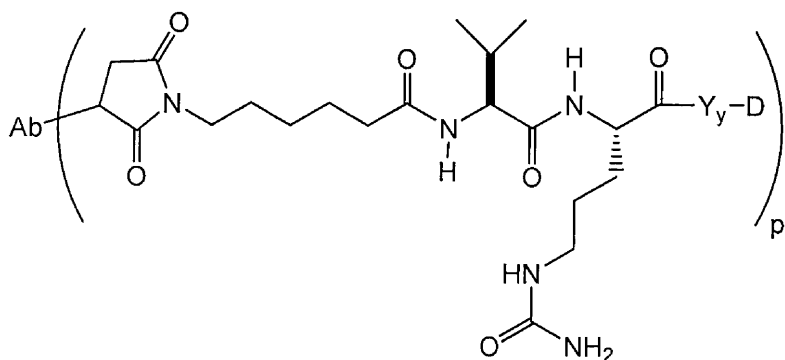
20

例示的なリンカーは、上記いずれかの一又は複数のリンカー成分を含んでもよい。ある実施態様では、リンカーは、以下のADC 式IIにおいて括弧で示す。

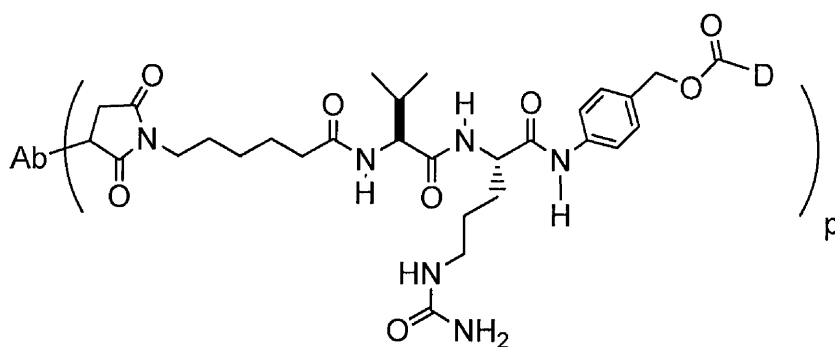
式II:



Val-Cit又はVC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

ストレッチャー、スペーサー及びアミノ酸ユニットを含むリンカー成分は、例えば米国特許公開第2005-0238649号A1に記載のものなど、当分野で公知の方法によって合成される。

【0175】

b. 例示的な薬剤部分

(1) メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号；同4,248,870号；同4,256,746号；同4,260,608号；同4,265,814号；同4,294,757号；同4,307,016号；同4,308,268号；同4,308,269号；同4,309,428号；同4,313,946号；同4,315,929号；

10

20

30

40

50

同4,317,821号；同4,322,348号；同4,331,598号；同4,361,650号；同4,364,866号；同4,424,219号；同4,450,254号；同4,362,663号；及び同4,371,533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対するジスルフィド及び非ジスルフィドリンカーによる共役上好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0176】

メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術及び発酵を用いて産生してもよい(米国特許第6790952号；米国公開特許2005/0170475；Yu等(2002) PNAS 99:7968-7973を参照)。また、メイタンシノール及びメイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾した芳香族環を有するもの、例えば、C-19-デクロロ(米国特許第4256746号)(アンサマイトシンP2のリチウムアルミニウム水素化物の還元によって調製される)；C-20-ヒドロキシ(又はC-20-デメチル) + / - C-19-デクロロ(米国特許第4361650号及び同第4307016号)(ストレプトミセス属ないしはアクチノミセス属を用いた脱メチル化又はLAHを用いた脱塩素により調製される)；及びC-20-デメトキシ、C-20-アシロキシ(-OCOOR)、+ / - デクロロ(米国特許第4294757号)(アシル塩化物を用いたアシル化により調製される)、及び他の位置に修飾を有するものが含まれる。

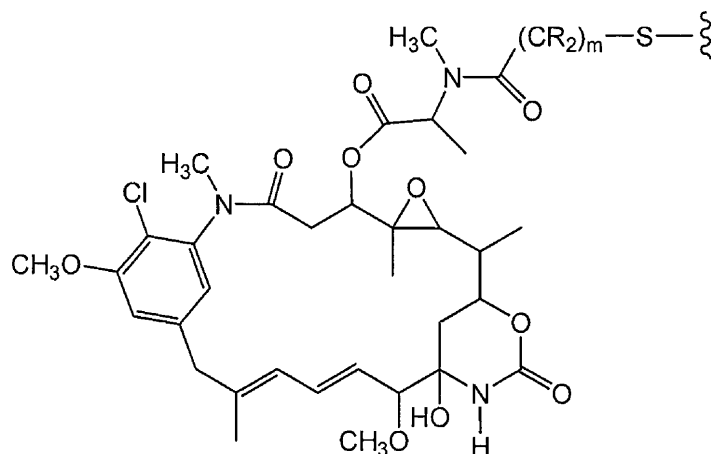
【0177】

また、例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾を有するもの、例えば、C-9-SH(米国特許第4424219号)(H₂S又はP₂S₅を有するメイタンシノールの反応により調製される)；C-14-アルコキシメチル(デメトキシ/CH₂OR)(米国特許第4331598号)；C-14-ヒドロキシメチル又はアシロキシメチル(CH₂OH又はCH₂OAc)(米国特許第4450254号)；C-15-ヒドロキシ/アシロキシ(米国特許第4364866号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの変換によって調製される)；C-15-メトキシ(米国特許第4313946号及び同第4315929号)(トレウィアヌドロフローラ(Trewia nudiflora)より単離)；C-18-N-デメチル(米国特許第4362663号及び第4322348号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの脱メチル化により調製される)；及び、4,5-デオキシ(米国特許第4371533号)(メイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元により調製される)が含まれる。

【0178】

結合の種類に応じて、メイタンシン化合物上の多くの位置は結合位置として有用であることが知られている。例えば、エステル結合を形成するために、水酸基を有するC-3位置、ヒドロキシメチルによって修飾されたC-14位置、水酸基によって修飾されたC-15位置、及び水酸基を有するC-20位置はすべて適する(米国特許第5208020号；USRE39151；米国特許第6913748号；米国特許第7368565号；米国公開特許2006/0167245；米国公開特許2007/0037972)。

メイタンシノイド薬剤成分は、以下の構造を有するものを含む。



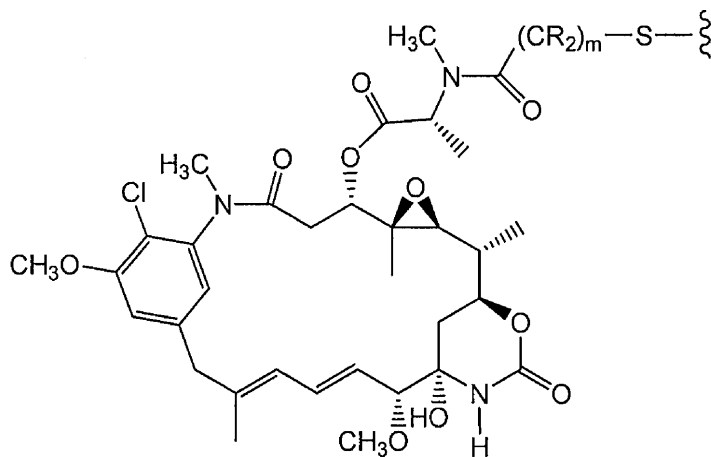
10

ここで、波線は、ADCのリンカーへのメイタンシノイド薬剤成分の硫黄原子の共有結合を示す。Rは、独立してH又はC1-C6アルキルであってもよい。硫黄原子にアミド基を付着しているアルキレン鎖は、メタニル、エタニル又はプロピルであってもよく、すなわち、mは1、2又は3である(米国特許第633410号；米国特許第5208020号；米国特許第7276497第；Chari et al (1992) Cancer Res. 52: 127-131；Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623)。

【0179】

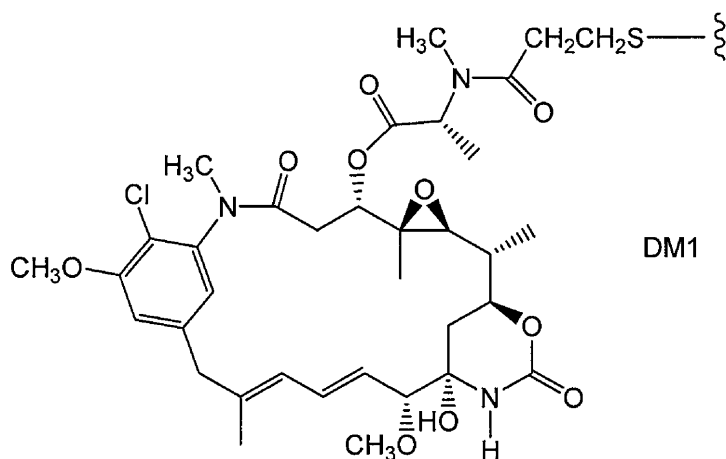
20

メイタンシノイド薬剤成分のすべての立体異性体は、本発明の化合物炭素、すなわちDのキラルの炭素でのRとS配位の任意の組合が考慮される。一実施態様では、メイタンシノイド薬剤成分は、以下の立体化学を有するであろう。

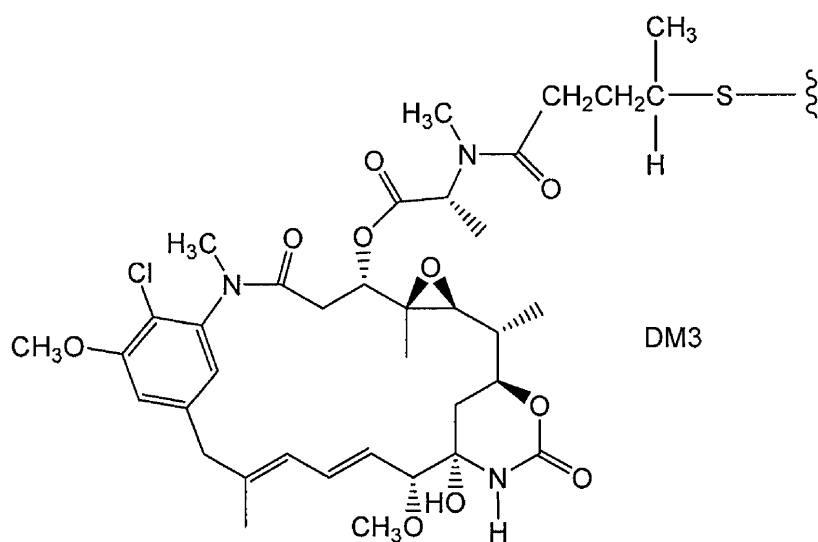


30

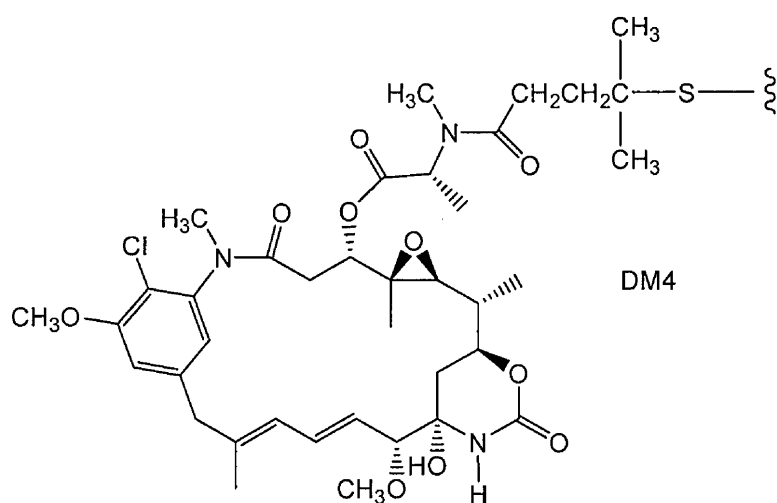
メイタンシノイド薬剤成分の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3；及びDM4が含まれる。



10



20



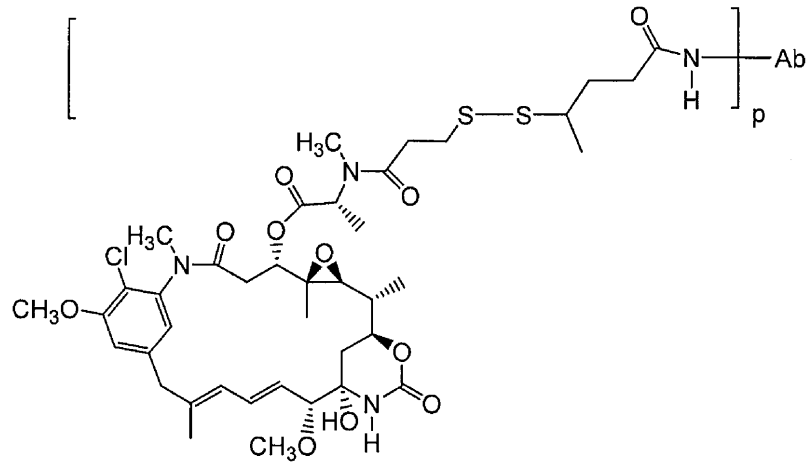
30

40

ここで、波線は、抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。(国際公開第2005/037992号；米国特許公開2005/0276812号A1)。

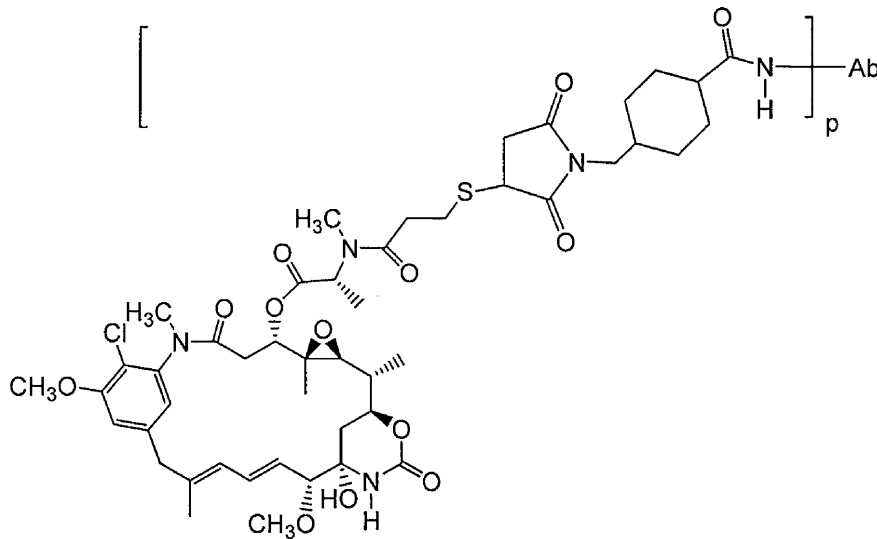
【0180】

他の例示的メイタンシノイド抗体－薬剤コンジュゲートは以下のような構造と略記号を有している。(ここでAbは抗体であり、pは1～およそ8である。)



10

Ab-SPP-DM1



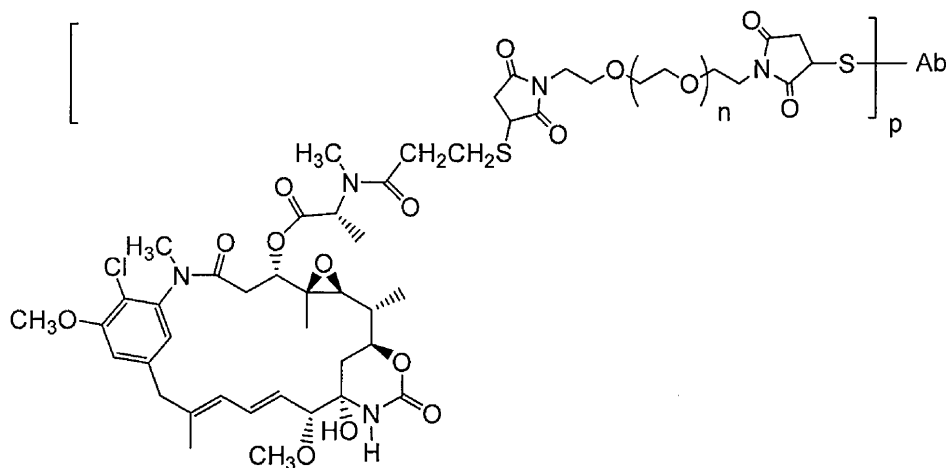
20

Ab-SMCC-DM1

【0181】

30

DM1が抗体のチオール基にBMPEOリンカーにより連結されている例示的な抗体-薬剤コンジュゲートは、以下のような構造及び略記号を有する。



40

ここで、Abは抗体であり、nは0、1又は2であり、そして、pは1、2、3又は4である。

【0182】

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(

50

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。

10

【0183】

治療的インデックス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を、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせた。メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えばErickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433；米国特許第5208020号、同5416064号、米国特許公開第2005/0276812号A1、及び欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示内容は出典を明示してここに援用する。

【0184】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えばErickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433；米国特許第5208020号、同5416064号、米国特許公開第2005/0276812号A1、及び欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示内容は出典を明示してここに援用する。

20

抗TAHO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TAHO抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5,208,020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。メイタンシノイドは公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5,208,020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されており、例えば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。

30

例えば、米国特許第5,208,020号又は欧州特許第0425235 B1号、Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び米国特許公開第2005/016993号A1(これらの開示内容は出典明記により特別に援用される)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、米国特許公開第2005/0276812号A1, "Antibody-drug conjugates and Methods."に開示されるように調製される。リンカーには、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なるリンカーを本願明細書中に記載し、例示する。

40

【0185】

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デートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、

50

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)又はN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])を含む。

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

10

【0186】

(2) アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体ないしは誘導体、例えばアウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号; 同第5780588号)にコンジュゲートした抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke 等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(US 5663149)及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

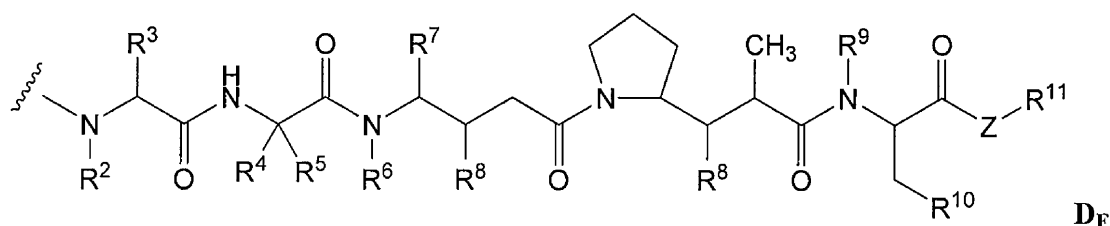
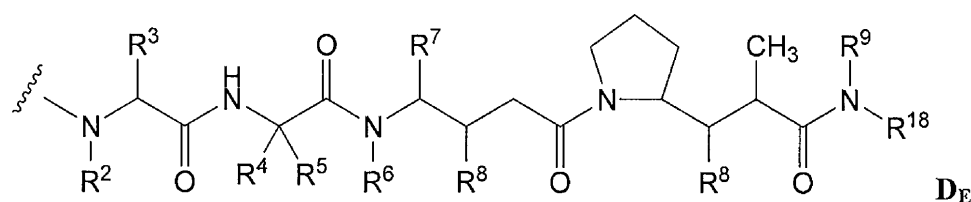
20

例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDFが含まれる(米国公開特許2005/0238649、2004年3月28日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される)。

【0187】

ペプチド性薬剤部分は以下の式DE及びDFから選択されうる。

30



40

ここで、DE及びDFの波線は、独立して各々の位置で、抗体又は抗体-リンカー成分への共有結合部位を示す。

R₂は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R₃は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環式化合物、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環式化合物)、C₃-C₈ヘテロ環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈ヘテロ環)から選択され、

50

R_4 は、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環式化合物、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環式化合物)、 $C_3 - C_8$ ヘテロ環及び $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ ヘテロ環) から選択され、

R_5 は、H 及びメチルから選択され、

又は R_4 及び R_5 は共同で環状炭素を形成し、 R_a 及び R_b が H、 $C_1 - C_8$ アルキル及び $C_3 - C_8$ 炭素環式化合物からそれぞれ選択される式 $-(CR_a R_b)_n-$ を有し、 n は 2、3、4、5 及び 6 から選択され、

R_6 は、H 及び $C_1 - C_8$ アルキルから選択され、

R_7 は、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環式化合物、アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル-アリール、 $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ 炭素環式化合物)、 $C_3 - C_8$ ヘテロ環及び $C_1 - C_8$ アルキル- ($C_3 - C_8$ ヘテロ環) から選択され、

10

各々の R_8 は、H、OH、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_3 - C_8$ 炭素環及び $O-(C_1 - C_8$ アルキル) からそれぞれ選択され、

R_9 は、H 及び $C_1 - C_8$ アルキルから選択され、

R_{10} は、アリール又は $C_3 - C_8$ ヘテロ環から選択され、

Z は O、S、NH、又は R_{12} が $C_1 - C_8$ アルキルである NR_{12} であり、

R_{11} は、H、 $C_1 - C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 - C_8$ ヘテロ環、 $-(R_{13}O)m - R_{14}$ 、又は $-(R_{13}O)m - CH(R_{15})_2$ から選択され、

m は、1 ~ 1000 の範囲の整数であり、

R_{13} は $C_2 - C_8$ アルキルであり、

20

R_{14} は、H 又は $C_1 - C_8$ アルキルであり、

各々の R_{15} の発生は、独立して H、COOH、 $-(CH_2)_n - N(R_{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n - SO_3H$ 、又は $-(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$ アルキルであり、

各々の R_{16} の発生は、独立して H、 $C_1 - C_8$ アルキル、又は $-(CH_2)_n - COOH$ であり、

R_{18} は、 $-C(R_8)_2 - C(R_8)_2$ -アリール、 $-C(R_8)_2 - C(R_8)_2$ ($C_3 - C_8$ ヘテロ環)、及び $-C(R_8)_2 - C(R_8)_2$ ($C_3 - C_8$ 炭素環式化合物) から選択され、そして、 n は 0 から 6 の範囲の整数である。

【0188】

一実施態様では、 R^3 、 R^4 及び R^7 は、それぞれイソプロピル又は sec-ブチルであり、 R^5 は -H 又はメチルである。ある例示的な実施態様では、 R^3 及び R^4 は各々イソプロピルであり、 R^5 は -H であり、そして R^7 は sec-ブチルである。

30

さらに他の実施態様では、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^9 は -H である。

さらに他の実施態様では、各々の R^8 の発生は $-OCH_3$ である。

例示的な実施態様では、 R^3 及び R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^5 は -H であり、 R^7 は sec-ブチルであり、各々の R^8 の発生は $-OCH_3$ であり、そして R^9 は -H である。一実施態様では、Z は -O- 又は -NH- である。

一実施態様では、 R^{10} はアリールである。

ある例示的な実施態様では、 R^{10} はフェニールである。

40

ある例示的な実施態様では、Z が -O- の場合、 R^{11} は -H、メチル又は t-ブチルである。

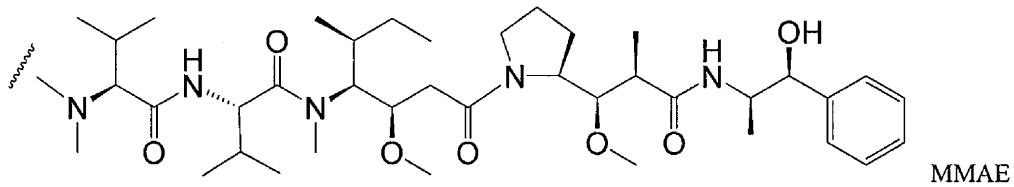
一実施態様では、Z が -NH- である場合に、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ である。この R^{15} は $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} は $-C_1 - C_8$ アルキル又は $-(CH_2)_n - COOH$ である。

他の実施態様では、Z が -NH- である場合に、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ である。この R^{15} は $-(CH_2)_n - SO_3H$ である。

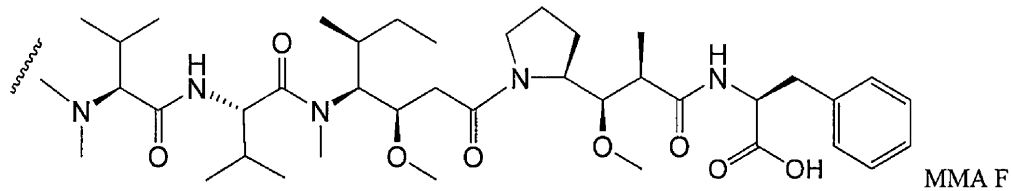
【0189】

式 DE の例示的なアウリスタチンの実施態様は MMAE である。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー (L) への共有結合を示す。

50



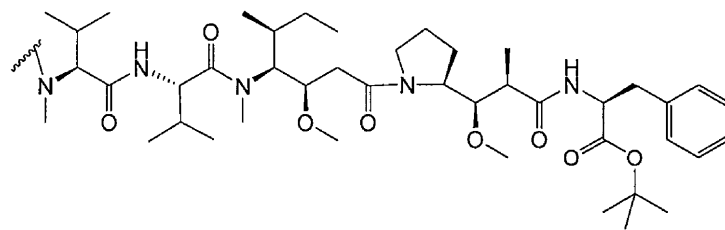
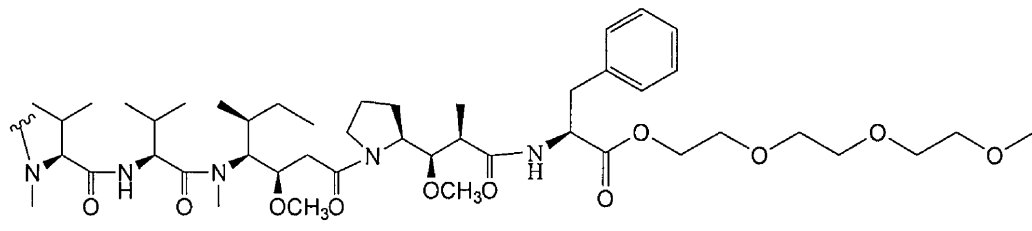
式 D F の例示的なアウリスタチンの実施態様は MMA F である。ここで、波線は抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー (L) への共有結合を示す (米国特許公開第 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9 号及び Doronina 等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124) を参照)。



【 0 1 9 0 】

他の例示的な実施態様には、ペントペプチドアウリスタチン薬剤成分の C 末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物 (国際公開 2 0 0 7 / 0 0 8 8 4 8) 及びペントペプチドアウリスタチン薬剤成分の C 末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルバリン化合物 (国際公開 2 0 0 7 / 0 0 8 6 0 3) が含まれる。

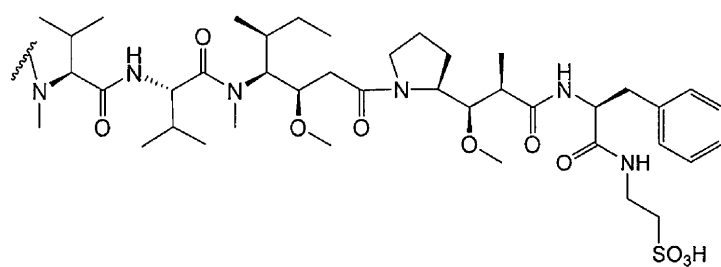
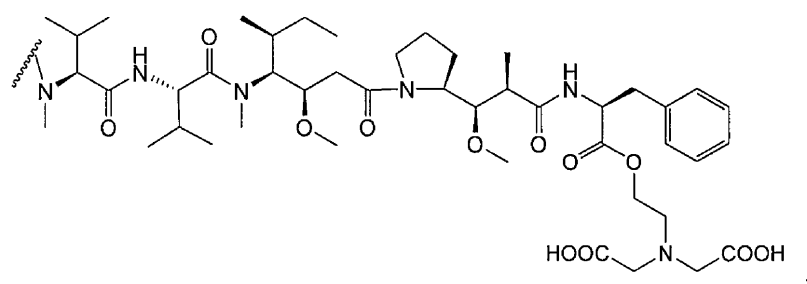
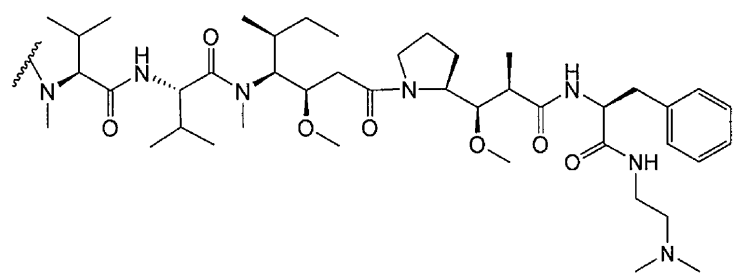
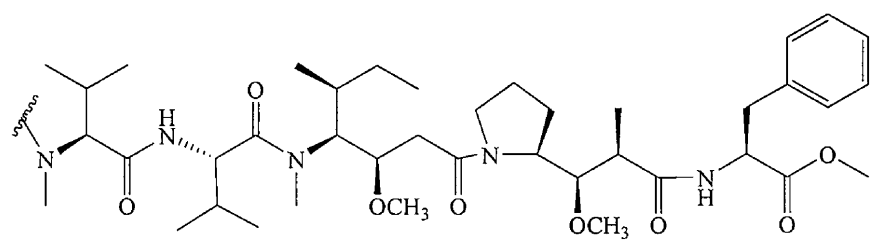
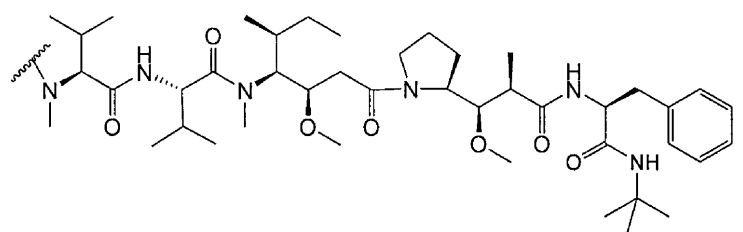
他の薬剤部分には以下の MMA F 誘導体が含まれる。ここで、波線は抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー (L) への共有結合を示す。



10

20

30

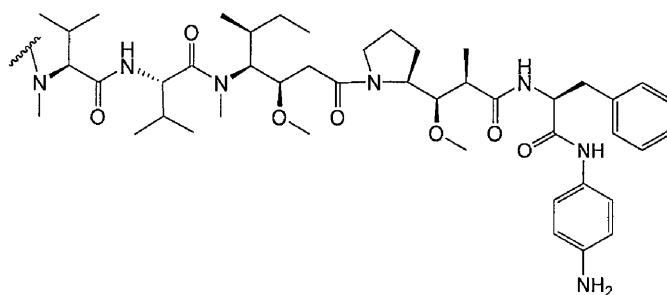
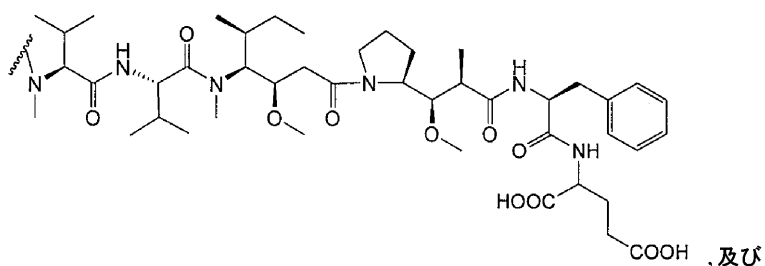


10

20

30

40



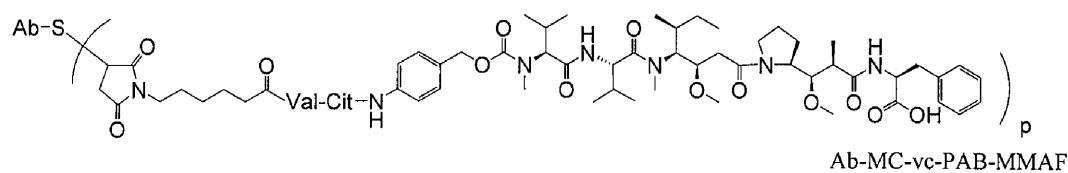
10

【0191】

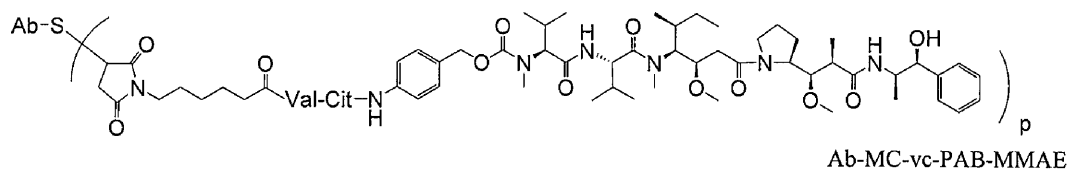
一態様では、限定するものではないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル (TEG) を含む親水基は R11 で薬剤部分に結合することができる。ある特定の理論に縛られるものではないが、親水基は薬剤部分の内在化及び非凝集に存在する。

20

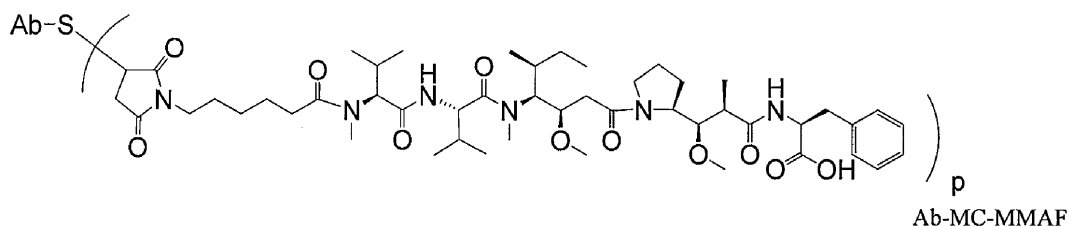
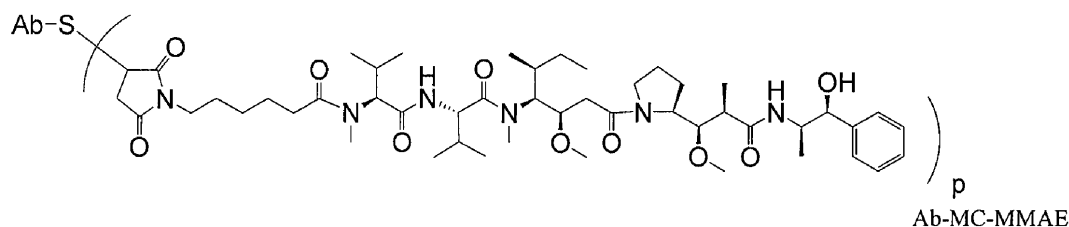
アウリスタチン／ドラスタチン又はその誘導体を含む式IのADCの例示的な実施態様は、米国特許公開第2005-0238649号A1及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されており、これは出典明記によってここに明確に援用される。MMAE又はMMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様は、以下の構造及び略記号を有する(ここで、「Ab」は抗体であり、pは1～およそ8であり、「Val-Cit」はバリン-シトルリンジペプチドであり、そして「S」は硫黄原子である。



30



40



10

【0192】

さらに、MMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様には、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFが含まれる。興味深いことに、タンパク質分解性の切断を受けないリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートは、タンパク質分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートに比べて活性を有することが示されている。Doronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124を参照。このような場合、薬剤放出は細胞内の抗体分解に影響を受けると思われる。同上。

20

一般的に、ペプチドベースの薬剤部分は、2以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分は、米国特許公開第2005-0238649号A1；米国特許公開第5635483号；米国特許第5780588号；Pettit等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465；Pettit等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725；及びPettit等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及びDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。

30

特に、式DFのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAF及びその誘導体は、米国特許公開第2005-0238649号A1及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載の方法を用いて調製されうる。式DEのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAE及びその誘導体は、Doronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載の方法を用いて調製されうる。薬剤－リンカー部分であるMC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAEは、例えばDoronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784、及び米国特許公開第2005/0238649号A1に記載のような常套的な方法によって都合よく合成され、その後対象の抗体にコンジュゲートされてもよい。

40

【0193】

(3) カリケマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケマイシン分子にコンジュゲートした抗体を含んでなる。抗生物質のカリケ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。カリケマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、γ1I

50

、 $\alpha 2$ I、 $\alpha 3$ I、N-アセチル- γ 1 I、P S A G及び θ I 1 (Hinman等, Cancer Research, 53: 3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58: 2925-2928(1998)及び上述した American Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体がコンジュゲート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。

【0194】

c. 他の細胞障害性剤

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、同第5770710号に記載されており、集合的にL L-E 33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(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ンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

【0195】

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

腫瘍の選択的な破壊のため、イムノコンジュゲート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。イムノコンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば $t c^{99m}$ 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

【0196】

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 Immunoscinigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0197】

ある実施態様では、コンジュゲートは、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/01145を参照)を抗癌剤などの活性な薬剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へコンジュゲートした抗体を含みうる。このようなコンジュゲートは抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法(「ADEPT」)に有用である。抗体にコンジュゲートされる酵素には、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に

変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；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 β -ガラクトシダーゼ； β -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 β -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。酵素が、当分野で周知の組み換えDNA技術によって抗体に共有結合されてもよい。例として、Neuberger等、Nature 312:604-608 (1984)を参照。

【0198】

d. 薬剤ローディング(負荷、Drug Loading)

薬剤ローディングは、式Iの分子において、抗体当たりの薬剤部分の平均数であるpによって表される。薬剤ローディングは抗体当たり1～20の薬剤部分(D)の範囲であってもよい。式IのADCには、1から20の薬剤部分の範囲でコンジュゲートされる抗体の集まりが含まれる。コンジュゲート反応からのADCの調製において抗体当たりの薬剤部分の平均数は、質量分析、ELISAアッセイ及びHPLCなどの従来の方法によって特徴付けられうる。pに関するADCの定量的分布も決定されうる。いくつかの場合では、pが他の薬剤ローディングを有するADCの一定の値である場合の均質なADCの分離、精製及び特徴づけは、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって達成されうる。ゆえに、式I抗体-薬剤コンジュゲートの薬学的製剤は、1、2、3、4又はそれ以上の薬剤成分に結合した抗体とのコンジュゲートの異種性混合物であってもよい。

ある抗体-薬剤コンジュゲートでは、pは抗体上の結合部位の数によって限定されうる。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施態様のように、抗体はたった1つ又は複数のシステインチオール基を有してもよいし、結合しうるリンカーによってたった1つ又は複数の十分に活性なチオール基を有してもよい。ある実施態様では、薬剤ローディングが高いと、例えば $p > 5$ であると、特定の抗体-薬剤コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性又は細胞透過性の喪失が起こりうる。ある実施態様では、本発明のADCの薬剤ローディングは、1～およそ8の範囲、およそ2～およそ6、又は、およそ3～およそ5の範囲である。実際、あるADCでは、抗体当たりの薬剤部分の適切な比は、8未満であってもよいし、およそ2～およそ5であってもよい。米国特許公開第2005-0238649号A1を参照。

【0199】

ある実施態様では、理論的な最大よりも少ない薬剤部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、以下に検討するように、薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含みうる。一般に、抗体は薬剤部分に結合しうる多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まず、実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある実施態様では、抗体は、反応性のシステインチオール基を生成するために、部分的ないしは完全に還元な条件下で、ジチオトレイトール(DTT)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)などの還元剤により還元されうる。ある実施態様では、抗体は変性条件下に曝されるとリジンやシステインなどの反応性の求核基を現す。

ADCのローディング(薬剤/抗体比率)は、例えば、(i) 抗体に対して薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬のモル過剰量を限定する、(ii) コンジュゲートの反応時間又は温度を限定する、及び(iii) システインチオール修飾のための還元条件を限定することによるなど、異なる方法で制御しうる。

【0200】

1 以上の求核基が薬剤部分試薬が続くリンカー試薬又は薬剤－リンカー中間体と反応する場合、その結果生じる生成物は、抗体に結合した一又は複数の薬剤部分を有するADC化合物の混合物であると考えられる。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体特異的かつ薬剤特異的である二重ELISAアッセイによって混合物から算出されうる。個々のADC分子は、質量分析によって混合物中で識別され、HPLC、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィによって分離されうる(例としてMcDonagh等(2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J.,等 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C.,等 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照)。ある実施態様では、単一のローディング値をもつ均質なADCは、電気泳動又はクロマトグラフィによってコンジュゲート混合物から単離してもよい。

10

【0201】

e. イムノコンジュゲートの調製方法

式IのADCは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) 共有結合によってAb-Lを形成するための二価のリンカーと抗体の求核基との反応とその後の薬剤部分Dとの反応、及び(2) 共有結合によってD-Lを形成するための二価のリンカーと薬剤部分の求核基との反応とその後の抗体の求核基との反応などによって調製されてもよい。後者の手段による式IのADCを調製するための例示的な方法は米国特許公開第2005-0238649号A1に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

20

抗体の求核基には、限定するものではないが、(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリジン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基が含まれる。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性基により共有結合を形成することができる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばNHSエステル類、HOBtエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、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、抗体が完全ないしは部分的に還元されるように、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)による処置によって、リンカー試薬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つの反応性のチオール求核基を形成する。リジン残基の修飾によって、例えば、チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリジンを反応させることによって、抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体に導入されてもよい。

30

40

【0202】

また、本発明の抗体－薬剤コンジュゲートは、アルデヒドないしはケトンカルボニル基などの抗体上の求電子性基とリンカー試薬や薬剤上の求核基との間の反応によって生成してもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、限定するものではないが、hydrazide, oxime, amino, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine carboxylate, 及びarylhydrazideが含まれる。一実施態様では、抗体を修飾して、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる求電子性の部分を導入する。他の実施態様では、グリコシル

50

化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応しうるアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができる抗体のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体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。

10

薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基が含まれる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばNHSEステル類、HOBtエステル類、ハロゲン酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

【0203】

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

20

また、抗体と細胞障害性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(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミン)、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。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(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、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)ヘキサレンジアミン)、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

30

40

50

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)。

【0204】

別法として、抗体と細胞障害性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の鎖長は、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含みうる。

さらに他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、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て循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤(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)を投与してもよい。

【0205】

例示的なイムノコンジュゲート-Thio-抗体薬剤コンジュゲート

a. システイン改変抗CD79b抗体の調製

本発明のシステイン改変抗CD79b抗体及び親抗CD79b抗体のアミノ酸配列変異体をコードするDNAは、限定するものではないが、(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合には)天然源からの単離、予め調製したポリペプチドをコードするDNAの、部位特異的(又はオリゴヌクレオチド媒介性)突然変異誘発(Carter (1985)等 Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443; Ho等 (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu等 (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR突然変異誘発(Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito等 (1991) Gene 102:67-70; Bernhard等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; 及びVallette等 (1989) Nuc. Acids Res. 17: 723-733)、及びカセット突然変異誘発(Wells等 (1985) Gene 34:315-323)を含む、様々な方法によって調製される。Quick Change(登録商標) 多部位-特異的突然変異誘発キット(Stratagene, La Jolla, CA)などの、突然変異誘発プロトコル、キット及び試薬は市販されている。また、PCRベースの突然変異誘発によって鋳型として二本鎖プラスミドDNAを用いたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって、単一突然変異が生成される(Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller等 (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500)。組み換え抗体の変異体も、制限酵素断片操作又は合成オリゴヌクレオチドによるオーバーラップ伸展PCRによって構築してもよい。突然変異誘発プライマーはシステインコドン置換(一又は複数)をコードする。標準的な突然変異誘発技術を用いて、このような変異体システイン改変抗体をコードするDNAを生成することができる(Sambrook等 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及びAusubel等 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

【0206】

ファージディスプレイ技術(McCafferty等 (1990) Nature 348:552-553)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、インビトロで抗CD79b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、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの主要又は微量コートタンパク質遺伝子のどちらかをフレーム内にクローン化し、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

含有するので、抗体の機能的特性に基づく選別を行ってもそれらの性質を表す抗体をコードする遺伝子が選別される。ゆえに、ファージはB細胞の性質のいくつかを模倣する(Johnson等 (1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571; Clackson等 (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks等 (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Griffith等 (1993) *EMBO J.* 12:725-734; 米国特許第 5 5 6 5 3 3 2 号; 米国特許第 5 5 7 3 9 0 5 号; 米国特許第 5 5 6 7 6 1 0 号; 米国特許第 5 2 2 9 2 7 5 号)。

抗CD79b抗体は、公知のオリゴペプチド合成法を使用して化学的に合成されてもよいし、組み換え技術を用いて調製して精製されてもよい。適切なアミノ酸配列、又はその一部を、固相法技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成してもよい(Stewart等, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154)。インビトロタンパク質合成は、手動の技術又は自動化によって実行されてもよい。例えば、t-BOC又はFmoc保護アミノ酸を使用して、そして製造業者の指示を用いたアプライドバイオシステムペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、自動固相合成法を行ってもよい。抗CD79b抗体又はCD79bポリペプチドの様々な部分は、別々に化学的に合成されて、化学的又は酵素的な方法を用いて組み合わせ、所望の抗CD79b抗体又はCD79bポリペプチドを生産させてもよい。

【0207】

抗体断片の産生のために様々な技術が開発されている。以前から、これらの断片はインタクトな抗体の蛋白分解によって生じるか(Morimoto等 (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; 及びBrennan等 (1985) *Science*, 229:81)、又は組換え宿主細胞によって直接生産された。Fab、Fv及びScFv抗CD79b抗体断片はすべて、大腸菌において発現され、大腸菌から分泌されるため、大量の断片を容易に生成することができる。抗体断片は、本明細書において述べられる抗体ファージライブラリから単離してもよい。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収して、化学的にカップリングしてF(ab')₂断片を形成させてるか(Carter等 (1992) *Bio/Technology* 10:163-167)、又は組換え宿主細胞培養物から直接単離されうる。抗CD79b抗体は(scFv)単鎖Fv断片であってもよい(国際公開第 9 3 / 1 6 1 8 5 号; 米国特許第 5 5 7 1 8 9 4 号; 米国特許第 5 5 8 7 4 5 8 号)。また、抗CD79b抗体断片は「直鎖状抗体」であってもよい(米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号)。このような線形抗体断片は、単一特異性でも二重特異性でもよい。

以下の記載は主に、抗CD79b抗体をコードする核酸を含むベクターにて形質転換した又は該ベクターを形質移入した細胞を培養することによる、抗CD79b抗体の産生に関する。抗CD79b抗体をコードするDNAは、抗CD79b抗体のmRNAを有し、検出可能なレベルに発現すると思われる組織から調製したcDNAライブラリから得てもよい。したがって、ヒト抗CD79b抗体ないしCD79bポリペプチドDNAは、ヒト組織から調製したcDNAライブラリから従来通りに得ることができる。また、抗CD79b抗体コード遺伝子は、ゲノムライブラリから得るか、又は公知の合成手順(例えば自動核酸合成)によって得てもよい。

【0208】

本発明の設定、選別及び調製方法により、求電子性の官能性と反応するシステイン改変抗ヒトCD79b (TAHO5)又はヒトカニクイザルCD79b (TAHO40)のような、抗TAHO抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設定した選択した部位に薬剤分子を有する抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)化合物などの抗体複合体化合物が可能である。抗体表面上の反応性のシステイン残基により、マレイミド又はハロアセチルなどのチオール反応基を介した薬剤成分の特異的なコンジュゲートが可能である。マレイミド基に対するCys残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はN-末端アミノ基などのタンパク質内の任意の他のアミノ酸官能性の、およそ1000倍である。ヨードアセチル及びマレイミド試薬のチオール特異的官能性はアミン基と反応するが、より高いpH(>9.0)とより長い反応時間が必要である(Garman, 1997, N

on-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質内の遊離チオール量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンMはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンGは、サブユニットと一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このタンパク質では、ジチオトレイトール(DTT)又はselenol(Singh等(2002) Anal. Biochem. 304:147-156)などの試薬によるジスルフィド結合の還元は、反応性の遊離チオールを生成するために必要である。この手法により、抗体立体構造及び抗原結合特異性が失われうる。

【0209】

Pheselector(反応性チオールの選別のためのファージELISA)アッセイにより、ELISAファージ様式での抗体の反応性システイン基の検出が可能であり、これによってシステイン改変抗体の設定の助けとなる(国際公開2006/034488; 国際公開2007/0092940)。システイン改変抗体をウェルの表面にコートし、ファージ粒子とインキュベートして、HRP標識した二次抗体を添加して、吸光度を検出する。ファージにディスプレイされる変異タンパク質は、迅速で、強力な、ハイ-スループット方法でスクリーニングされうる。システイン改変抗体のライブラリを生成して同じ手法を用いて結合選別を行い、抗体又は他のタンパク質のランダムなタンパク質-ファージライブラリから遊離Cys取込みの反応性の部位を適切に同定することができる。この技術は、ファージにディスプレイされるシステイン変異タンパク質を、チオール反応性でもあるレポーターグループ又は親和性試薬と反応させることを含む。

PHSELECTORアッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能である。この方法によるA121C変異の同定は一例である。完全なFab分子は、反応性チオール基を有するThioFab変異体をより多く同定するために、効果的に検索されうる。パラメーターである断片的な表面のアクセス容易性を用いて、ポリペプチド内のアミノ酸残基に対する溶媒のアクセスしやすさを同定して、定量化した。表面のアクセス容易性は、溶媒分子、例えば水が接触することができる表面積($\text{\AA}^2$)として表されうる。水が占める面積は $1.4 \text{ \AA}$ 半径球として概算される。アルゴリズムを用いて公知のX線結晶学由来の座標によりタンパク質の各アミノ酸の表面アクセス容易性を算出する結晶学プログラムのCCP4 Suiteとして("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763)、ソフトウェアは入手自由であるか許可されている(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, or by internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)。B.Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400のアルゴリズムに基づいて、表面アクセス容易性の算出を実行する2つの例示的なソフトウェアモジュールは、「AREAIMOL」及び「SURFACE」である。AREAIMOLは、タンパク質のファンデルワールス表面を転がるので、プローブ球(溶媒分子を表す)の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。AREAIMOLは、各原子の周りの広がった球上(原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離)に表面ポイントを生成して、周囲の原子と関連する同等の球内にあるものを除くことによって溶媒にアクセス容易な表面を算出する。AREAIMOLは、PDB座標ファイルに原子の溶媒にアクセス容易な領域を見つけ、残基、鎖、及び全分子がアクセス容易な領域をまとめる。個々の原子がアクセス容易な領域(又は、領域の相違)は、偽PDB出力ファイルに書き込まれる。AREAIMOLは各エレメントについて単一の半径を仮定し、限られた数の異なるエレメントを認識するのみである。

【0210】

AREAIMOL及びSURFACEは、絶対的なアクセス容易性、すなわち正方形のオングストローム($\text{\AA}$)の数を示す。部分的な表面アクセス容易性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関する標準の状態を参照することで算出される。基準状態はトリペプチドGly-X-Glyであり、ここで、Xは対象のアミノ酸であり、基準状態は「伸展した」高次構造、すなわち β 鎖内の高次構造様でなければならない。伸展した高次構造はXのアクセ

ス容易性を最大にする。算出したアクセス容易な領域をG l y－X－G l yトリペプチド基準状態のアクセス容易な領域で割って、比率を比率を示す。これが部分的なアクセス容易性となる。アクセス容易性の割合は、100を乗じた部分的アクセス容易性である。表面アクセス容易性を算出するための他の例示的なアルゴリズムは、ポリペプチドのX線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基の部分的アクセス容易性を算出するプログラムx s a e (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)のS O L Vモジュールに基づく。抗体のすべてのアミノ酸の部分的表面アクセス容易性は、利用できる結晶構造情報を使用して算出されてもよい(Eigenbrot等 (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

システイン改変抗体をコードするDNAを容易に単離し、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)配列決定される。ハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの供与源として役立つ。単離した後、DNAを発現ベクターに入れ、ついでそれを、大腸菌、サルのC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、又は他の哺乳動物の宿主細胞、例えば抗体タンパク質を産生しない骨髓腫細胞(米国特許第5807715号；米国公開特許第2005/0048572号；米国公開特許第2004/0229310)などの宿主細胞に形質移入して、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

【0211】

設定及び選別の後、改変された、非常に反応性のある対になっていないC y s 残基「遊離システインアミノ酸」を有するシステイン改変抗体、例えばT h i o F a bが、(i) 細菌、例えば大腸菌システム(Skerra等 (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188)又は哺乳類の細胞培養システム(国際公開第01/00245号)、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)における発現、及び(ii) 一般的なタンパク質精製技術を用いた精製(Lowman等 (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988)によって産生されてもよい。

改変されたC y s チオール基は、求電子性リンカー試薬及び薬剤－リンカー中間生成物と反応して、システイン改変抗体薬剤コンジュゲート及び他の標識したシステイン改変抗体を形成する。親抗体に存在し、鎖内及び鎖間のジスルフィド結合を形成するシステイン改変抗体C y s 残基は、反応性チオール基を全く持っておらず(還元剤で処理されない限り)、求電子性のリンカー試薬又は薬剤－リンカー中間生成物と反応しない。新規に改変されたC y s 残基は対形成せずに、反応することができる。すなわち求電子性のリンカー試薬又は薬剤－マレイミドなどの薬剤－リンカー中間生成物にコンジュゲートすることができる。例示的な薬剤－リンカー中間生成物には、M C－M M A E、M C－M M A F、M C－v c－P A B－M M A E及びM C－v c－P A B－M M A Fが含まれる。重鎖及び軽鎖の改変したC y s 残基の構造位置は連続する番号付けシステムに従って番号付けする。この連続する番号付けシステムは、N末端から始まるカバット番号付けシステム(Kabat等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)に関連しており、a、b、cで示す挿入がカバット番号付けスキーム(下列)とは異なる。カバット番号付けシステムを用いると、実際の直鎖のアミノ酸配列は、可変ドメインのF RないしC D Rが短くなっているアミノ酸か、又はF RないしC D Rに挿入を含むアミノ酸を含む。システイン改変重鎖変異体部位は連続する番号付け及びカバット番号付けスキームによって同定される。

【0212】

一実施態様では、システイン改変抗C D 7 9 b抗体は、
(a) システインによって親抗C D 7 9 b抗体の一又は複数のアミノ酸残基を置換する、そして、
(b) チオール反応性の試薬とシステイン改変抗体を反応させることによって、システイン改変抗C D 7 9 b抗体のチオール反応性を決定することを含む方法によって調製される。

システイン改変抗体は親抗体よりチオール反応性の試薬との反応性が高くてもよい。

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖ないし軽鎖、又は定常ドメインないし可変ドメインに位置してもよい。また、抗体断片、例えばF a bは、抗体断片のアミノ酸を置換する一又は複数のシステインアミノ酸によって改変して、システイン改変抗体断片を形成してもよい。

本発明の他の実施態様は、

(a) 一又は複数のシステインアミノ酸を親抗T A H O抗体に導入して、システイン改変抗T A H O抗体を生成する、そして、

(b) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを含み、

このとき、システイン改変抗体は親抗体よりもチオール反応性の試薬と反応性が高いものである、システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又はヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体を調製する(作製する)方法を提供する。

【0213】

システイン改変抗体を調製する方法の工程(a)は、

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、

(ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、

(iii) システイン改変抗体を単離して、精製する

ことを含む。

【0214】

システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、

(i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定することを含んでもよい。

本発明の他の実施態様は、

(a) 親抗体に一又は複数のシステインアミノ酸を導入して、システイン改変抗体を生成する、

(b) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(c) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する、そして、

(d) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定する

ことを含む、チオール反応のために高い反応性を有し、対形成をしないシステインアミノ酸を有するシステイン改変抗体をスクリーニングする方法である。

【0215】

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(a)は、

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、

(ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、

(iii) システイン改変抗体を単離して、精製する

ことを含んでもよい。

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、

(i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定することを含んでもよい。

【0216】

b. 抗TAHO IgG変異体のシステイン改変

システインは、本明細書中に記載のシステイン改変方法によって、完全長、キメラ親モノクローナル抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はヒトカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、抗TAHO抗体内の重鎖118 (EU番号付け)(重鎖位置118に等しい、連続番号付け)、又は完全長、キメラ親モノクローナル抗ヒトCD79b (TAHO5) 又はヒトカニクイザルCD79b (TAHO40) のような、抗TAHO抗体内の軽鎖205 (カバット番号付け)(軽鎖位置209に等しい、連続番号付け)に導入された。

生成された重鎖118 (EU番号付け)にシステインを有するシステイン改変抗体は、(a) 重鎖配列(配列番号：54)及び軽鎖配列(配列番号：55)を有する、チオーchSN8-HC(A118C)、図31；(b) 重鎖配列(配列番号：56)及び軽鎖配列(配列番号：57)を有する、チオー抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)、図35であった。

10

【0217】

生成された軽鎖205 (カバット番号付け)にシステインを有するシステイン改変抗体は、(a) 重鎖配列(配列番号：52)及び軽鎖配列(配列番号：53)を有するチオーchSN8-LC(V205C)、図30及び(b) 重鎖配列(配列番号：95)及び軽鎖配列(配列番号：96)を有するチオー抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-LC(V205C)、図36であった。

これらのシステイン改変モノクローナル抗体は、1mMのシステインを含有する培地での一過性の発酵によってCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞で発現された。

20

【0218】

一実施態様では、キメラSN8システイン改変抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体は、遊離システインアミノ酸を有する以下の重鎖配列(配列番号：63-71、表6)の一又は複数を含む。

表6：chSN8システイン改変抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体変異体の連続、カバット及びEU番号付けの比較

配列	配列番号	KABAT 番号付け	EU 番号付け	配列番号
EVQL <u>C</u> QSGAE	Q5C	Q5C		63
VKISCC <u>A</u> TGYT	K23C	K23C		64
LSSLT <u>C</u> EDSAV	S88C	S84C		65
TSVTV <u>C</u> SASTK	S116C	S112C		66
VTVSS <u>C</u> STKGP	A118C	A114C	A118C	67
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T120C	T116C	T120C	68
KFNWY <u>C</u> DGVEV	V279C	V275C	V279C	69
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S375C	S371C	S375C	70
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	71

10

20

30

【 0 2 1 9 】

一実施態様では、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10) キメラMA79bシステイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体は、遊離システインアミノ酸を有する以下の重鎖配列(配列番号：72－80、表7)の一又は複数を含む。

表7：抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10) システイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体変異体の連続、カバット及びEU番号付けの比較

配列	配列番号	KABAT 番号付け	EU 番号付け	配列番号
EVQL <u>C</u> ESGPG	Q5C	Q5C		72
LSLT <u>C</u> VTGYS	T23C	T23C		73
LNSVT <u>C</u> EDTAT	S88C	S84C		74
TTLTV <u>C</u> SASTK	S111C	S112C		75
LTVSS <u>C</u> STKGP	A113C	A114C	A118C	76
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T115C	T116C	T120C	77
KFNWY <u>C</u> DGVEV	V274C	V275C	V279C	78
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S370C	S371C	S375C	79
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S395C	S396C	S400C	80

10

20

30

【 0 2 2 0 】

一実施態様では、キメラSN8システイン改変抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体は、遊離システインアミノ酸を有する以下の重鎖配列(配列番号：81－87、表8)の一又は複数を含む。

表8：キメラSN8システイン改変抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体変異体の連続、カバット及びEU番号付けの比較

配列	配列番号	KABAT 番号付け	EU 番号付け
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	81
ELKRTC ₁ AAPSV	V114C	V110C	82
TVAAPC ₁ VFIFP	S118C	S114C	83
FIFPPC ₁ DEQLK	S125C	S121C	84
DEQLKC ₁ GTASV	S131C	S127C	85
VTEQDC ₁ KDSTY	S172C	S168C	86
GLSSPC ₁ TKSFN	V209C	V205C	87

10

20

【 0 2 2 1 】

一実施態様では、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10) システイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体は、遊離システインアミノ酸を有する以下の軽鎖配列(配列番号：88－94、表9)の一又は複数を含む。

表9：抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10) システイン改変抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体変異体の連続、カバット及びEU番号付けの比較

30

配列	配列番号	KABAT 番号付け	EU 番号付け
SLAVSC <u>G</u> QRAT	L15C	L15C	88
EIKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	89
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	90
FIFPP <u>C</u> DEQLK	S125C	S121C	91
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	92
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	93
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	94

10

20

【0222】

c. 標識したシステイン改変抗T A H O抗体

システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体は部位特異的であり、チオール反応性の試薬と効率よくカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能性リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えばビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば蛍光体試薬)、固相固定化試薬(例えばS E P H A R O S E T M、ポリスチレン又はガラス)、又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。チオール反応性試薬の一例はN-エチルマレイミド(N E M)である。ある例示的な実施態様では、ビオチン-リンカー試薬とのT h i o F a bの反応によりビオチン化されたT h i o F a bが生じ、これによって改変されたシステイン残基の存在及び反応性が検出され、測定されうる。多機能リンカー試薬とのT h i o F a bの反応により、薬剤成分試薬又は他の標識とさらに反応しうる官能化されたリンカーを有するT h i o F a bが生じる。薬剤-リンカー中間生成物とのT h i o F a bの反応により、T h i o F a b薬剤コンジュゲートが生じる。

30

本明細書中で記述される例示的な方法は一般に、抗体の同定及び産生、さらに一般的には、本明細書中に記載の設定及びスクリーニングの工程によって他のタンパク質に応用されてもよい。

40

【0223】

このような手法は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性の結合パートナーである他のチオール反応性試薬のコンジュゲーションに応用されてもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。チオール反応性の試薬は、薬剤成分、フルオロホア、例としてフルオレセイン又は

50

ローダミンのような蛍光染料、イメージング又は放射性治療用金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識ないしは検出用タグ、又はポリエチレングリコールの各種アイソフォームなどのクリアランス-改変剤、第三成分に結合するペプチド、又は他の炭水化物又は親油性剤であってもよい。

【0224】

d. システイン改変抗T A H O抗体の使用

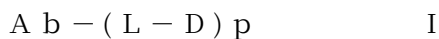
システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体とそのコンジュゲートは治療用及び／又は診断用の薬剤としての使用が明らかにされうる。本発明はさらに、B細胞関連疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するか又は、寛解する方法を提供する。特に、本発明は、癌、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(N H L)、中悪性度N H L、再発性中悪性度N H L、再発性低悪性度N H L、抵抗性N H L、抵抗性低悪性度N H L、慢性リンパ球性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(H C L)、急性リンパ球性白血病(A L L)及びマントル細胞リンパ腫などの細胞増殖性疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するか又は、寛解する方法を提供する。本発明はまた更に、C D 7 9 b関連の疾患又はこのような疾患を発達させる素因を診断するための方法、並びに好ましくはB細胞関連のC D 7 9 bポリペプチドを結合する抗体、及び抗体の抗原結合断片を同定するための方法を提供する。

本発明の他の実施態様は、B細胞関連の疾患に応答する状態の治療において有用な医薬の調製のためのシステイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体の使用に関する。

【0225】

e. システイン改変抗体薬剤コンジュゲート(T h i o-抗体薬剤コンジュゲート(T D C))

本発明の他の態様は、システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体と、アウリスタチン薬剤成分(D)を含む抗体-薬剤コンジュゲート化合物であって、このときシステイン改変抗体はリンカー成分(L)によって一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を介してDに付着され、この化合物は式Iを有するものであり、



このときpは1、2、3又は4であり、システイン改変抗体は、親抗C D 7 9 b抗体の一又は複数のアミノ酸残基を一又は複数の遊離したシステインアミノ酸に置換することを含む方法によって調製される。

【0226】

本発明の他の態様は、抗体当たりの平均薬剤負荷がおよそ2からおよそ5、又はおよそ3からおよそ4である、式Iの抗体-薬剤化合物の混合物を含有する組成物である。

図30-31及び35-36は、アウリスタチン薬剤成分が軽鎖(L C-A D C)又は重鎖(H C-A D C)内の改変したシステイン基に付着している、システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体薬剤コンジュゲート(A D C)の実施態様を示す。

システイン改変抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 又は抗ヒトカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0) のような、抗T A H O抗体薬剤コンジュゲートの考えられる利点には、P Kパラメーターの改善である安全性の改善(より大きな治療係数)が挙げられ、コンジュゲートを安定化し、かつその活性な結合高次構造を保持しうる抗体鎖間ジスルフィド結合が保たれており、薬剤コンジュゲートの部位が決定され、そして、システイン改変抗体の薬剤-リンカー試薬へのコンジュゲートからシステイン改変抗体薬剤コンジュゲートを調製することでより均一な産物が得られる。

【0227】

リンカー

「リンカー」、「リンカーユニット」又は「連結」は、共有結合を含む化学的成分又は

共有結合にて抗体を薬剤成分に付着させる原子の鎖を意味する。様々な実施態様では、リンカーはLと表される。「リンカー」(L)は、一又は複数の薬剤成分(D)と抗体ユニット(Ab)を連結させて、式Iの抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を形成させるために用いられうる、二官能性成分又は多機能性成分である。抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、薬剤及び抗体への結合について反応性機能を有するリンカーを用いて都合良く調製されうる。システイン改変抗体(Ab)のシステインチオールは、リンカー試薬、薬剤成分又は薬剤-リンカー中間生成物の求電子性の官能基と結合することができる。

一態様では、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに反応することができる求電子性基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子性基と反応することができ、リンカーに共有結合する。有用な求電子性の基には、マレイミド及びハロアセトアミド基を含むが、これらに限定されるものではない。

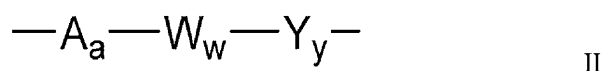
リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、アリーレン、ヘテロアリーレン、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、JeffamineTM)の繰り返しユニットである-(CR₂)_nO(CR₂)_n-などの成分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

システイン改変抗体は、Klussman, 等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773の766ページのコンジュゲート法及び、実施例6のプロトコールに従って、マレイミド又はα-ハロカルボニルなどの求電子性の官能基を有するリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応する。

【0228】

リンカーは一又は複数のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、N-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)、一又は複数の繰り返しユニットとしてのエチレンオキシ-CH₂CH₂O-(「EO」又は「PEO」)が含まれる。更なるリンカー成分は当分野において周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

一実施態様では、ADCのリンカーLは以下の式を有する。



このとき、

-A-は、抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合にて付着したストレッチャーユニットであり、

aは0又は1であり、

各々の-W-は、独立したアミノ酸ユニットであり、

wはそれぞれ、0から12まで変動する整数であり、

-Y-は、薬剤成分に共有結合にて付着したスペーサーユニットであり、そして、yは0、1又は2である。

【0229】

ストレッチャーユニット

ストレッチャーユニット(-A-)は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(-W-)に連結することができる。この点に関しては、抗体(Ab)は、ストレッチャーの官能基と結合することができる官能基を有する。天然ないし化学的操作のいずれにかによって抗体に存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル(-SH)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマー水酸基及びカルボキシルが含まれるがこれらに限定されるものではない。一態様では、抗体官能基はスルフヒドリル又はアミノ

10

20

30

40

50

である。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成される。あるいは、2-イミノチオラン(トラウトの試薬)又は他のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリジン成分のアミノ基を反応させることによって、スルフヒドリル基を生成することができる。一実施態様では、抗体(Ab)は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離したシステインチオール基を有する。式Iのコンジュゲートの例示的なストレッチャーユニットは、式I I及び式I I Iで示すものであり、このときAb、-W-、-Y-、-D、w及びyは前記に定義した通りであり、 R^{1-7} は、 $(CH_2)_r$ 、 C_3-C_8 カルボシクリル、 $O-(CH_2)_r$ 、アリーレン、 $(CH_2)_r$ -アリーレン、-アリーレン- $(CH_2)_r$ -、 $(CH_2)_r$ -(C_3-C_8 カルボシクリル)、(C_3-C_8 カルボシクリル)- $(CH_2)_r$ 、 C_3-C_8 ヘテロシクリル、 $(CH_2)_r$ -(C_3-C_8 ヘテロシクリル)、-(C_3-C_8 ヘテロシクリル)- $(CH_2)_r$ -、- $(CH_2)_r$ C(O)NR^b(CH_2)_r-、-(CH_2 CH₂O)_r-、-(CH_2 CH₂O)_r-CH₂-、-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2 CH₂O)_r-、-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2 CH₂O)_r-CH₂-、-(CH_2 CH₂O)_rC(O)NR^b(CH_2 CH₂O)_r-、-(CH_2 CH₂O)_rC(O)NR^b(CH_2 CH₂O)_r-CH₂-、及び-(CH_2 CH₂O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-から選択される二価の基であり、R^bはH、 C_1-C_6 アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、rはそれぞれ、1から10の範囲の整数である。

10

【0230】

アリーレンには、芳香族環システムから2つの水素原子を除去して得られる6～20の炭素原子の二価の芳香族炭化水素基が含まれる。代表的なアリーレン基には、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから得られる基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

ヘテロシクリル基には、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムが含まれる。複素環基は、1～20の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子を含む。複素環は、3～7員環を有するモノシクロ(2～6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)又は7～10員環を有するビシクロ(4～9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載される。

30

【0231】

複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアアジアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、β-カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリ

40

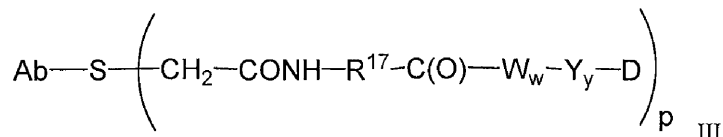
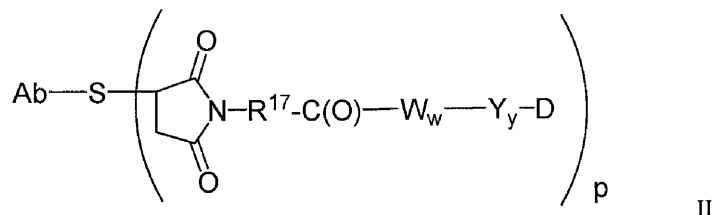
50

ジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

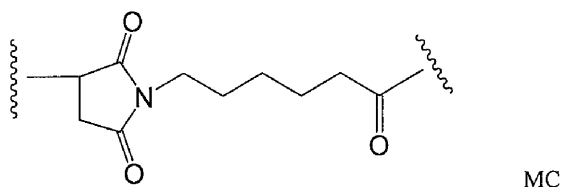
「カルボシクリル基(Carbocyclyl)」には、単環として3～7の炭素原子又は二環として7～12の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環が含まれる。単環の炭素環は3～6の環状原子、より一般的には5又は6の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビスクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]システムとして配置した7～12の環状原子、又はビスクロ[5,6]又は[6,6]システムとして配置した9又は10の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペント-1-エニル、1-シクロペント-2-エニル、1-シクロペント-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキス-1-エニル、1-シクロヘキス-2-エニル、1-シクロヘキス-3-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

【0232】

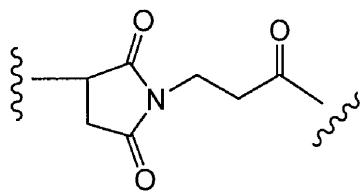
IIからVIなどの式IのADCのすべての例示的な実施態様から、明確に示していない場合であっても、改変したシステイン残基の数に応じて、1から4の薬剤成分が抗体に連結している($p = 1 \sim 4$)ことが理解される。



図示する式IIのストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である、マレイミド-カプロイル(MC)から得られる。



図示する式IIのストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_2-$ である、マレイミド-プロパノイル(MP)から得られる。



【0233】

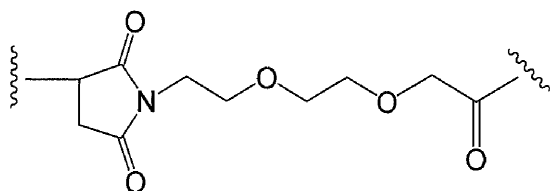
他の図示する式IIのストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2CH_2O)_r-C$
 H_2- であり、 r が2である。

10

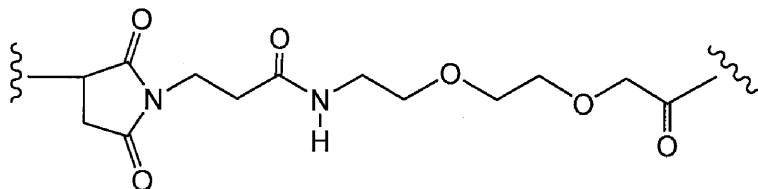
20

30

40



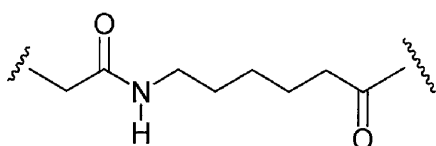
他の図示する式 I I のストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_r C(O)NR^b$ (CH_2CH_2O) $_r-CH_2-$ であり、 R^b が H であり、各々の r が 2 である。



10

MPEG

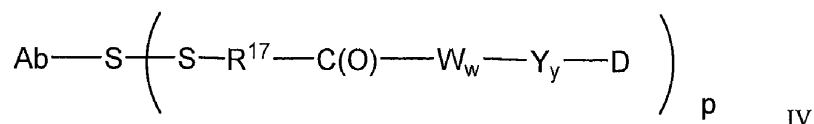
図示する式 I I I のストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である。



20

【0234】

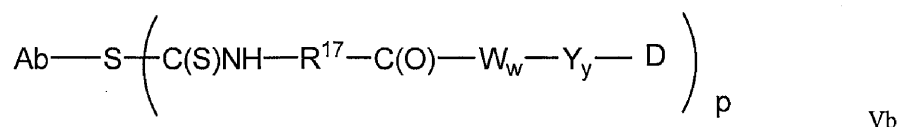
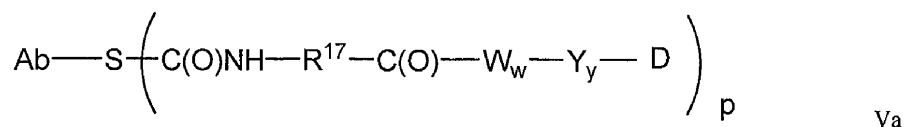
他の実施態様では、ストレッチャーユニットは、抗体の改変されたシステイン硫黄原子とストレッチャーユニットの硫黄原子との間のジスルフィド結合により、システイン改変抗 CD79b 抗体に連結する。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式 I V で表され、 R^{17} 、 $Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 及び y は前記に定義する通りである。



30

さらに他の実施態様では、ストレッチャーの反応基は、抗体の遊離したシステインチオールと結合することができるチオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例には、限定するものではないが、マレイミド、 α -ハロアセチル、活性エステル、例として、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアネート及びイソチオシアネートが含まれる。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式 V_a 及び V_b に表され、このとき、 $-R^{17}-$ 、 $Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 及び y は前記に定義した通りである。

40



他の実施態様では、リンカーは、分岐した多機能性リンカー成分を介して一より多い薬剤成分を抗体へ共有結合的に付着させるために樹枝状型である (Sun 等 (2002) Bioorganic

50

& Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215 ; Sun等 (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-176 ; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増やす、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着される。

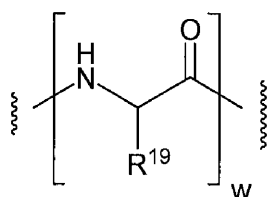
【0235】

アミノ酸ユニット

リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット(−Ww−)は、存在する場合には、抗体(Ab)を本発明のシステイン改変抗体−薬剤コンジュゲート(ADC)の薬剤成分(D)に連結する。

10

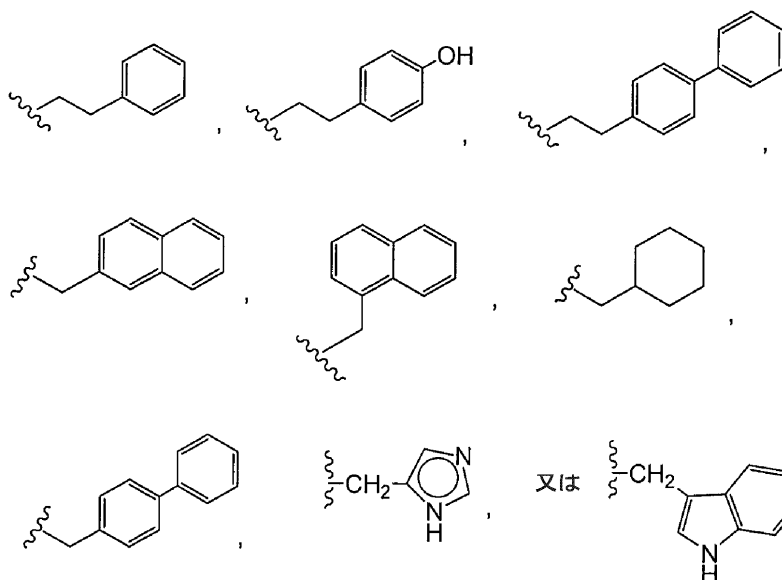
−Ww−は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド又はドデカペプチドのユニットである。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。各々の−W−ユニットはそれぞれ、以下の角括弧で示す式を有し、wは、0から12の範囲の整数である。



20

このとき、 R^{19} は、ヒドロゲン、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-ピリジルメチルー、3-ピリジルメチルー、4-ピリジルメチルー、フェニル、シクロヘキシル、

30



40

であり、

50

R^{19} が水素以外である場合に、 R^{19} が付着される炭素原子はキラルである。 R^{19} が付着される各々の炭素原子は、独立して(S)又は(R)配位又はラセミ混合物にある。したがって、アミノ酸ユニットは、鏡像異性的に純粋であるか、ラセミ性であるか、又はジアステレオ異性であってもよい。

【0236】

例示的な-Ww-アミノ酸ユニットには、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドが含まれる。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c 又は v a l - c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f 又は a l a - p h e)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y - v a l - c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y - g l y - g l y)が含まれる。アミノ酸リンカーを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。

アミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含む一又は複数の酵素によって切断され、薬剤成分(-D)を遊離する。この薬剤成分は、一実施態様では、薬剤(D)を提供するために、放出時にインビボでプロトン化される。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD、又はプラスミンプロテアーゼによって酵素的に切断されるために設定し、その選択性が最適化されうる。

【0237】

スパーサーユニット

スパーサユニット(-Yy-)は、存在する場合($y = 1$ 又は 2)には、アミノ酸ユニットが存在する($w = 1 \sim 12$)場合に、アミノ酸ユニット(-Ww-)を薬剤部分(D)に連結する。あるいは、アミノ酸ユニットがない場合には、スパーサーユニットはストレッチャーユニットを薬剤成分に連結する。アミノ酸ユニット及びストレッチャーユニットがともにない($w, y = 0$)場合には、スパーサーユニットも薬剤成分を抗体ユニットに連結する。スパーサーユニットは、自己犠牲型及び非自己犠牲型の2つの一般的なタイプである。非自己犠牲的なスパーサーユニットは、抗体-薬剤コンジュゲート又は薬剤成分-リンカーからアミノ酸ユニットが切断、特に酵素的に切断された後に、スパーサーユニットの一部ないしはすべてが薬剤成分に結合したままとなるものである。グリシン-グリシンスパーサーユニット又はグリシンスパーサーユニットを含むADCが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ又はリンパ球関連プロテアーゼによって酵素切断される場合、グリシン-グリシン-薬剤成分又はグリシン-薬剤成分がAb-Aa-Ww-から切断される。一実施態様では、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン-薬剤成分の結合が切断され、薬剤が遊離される。

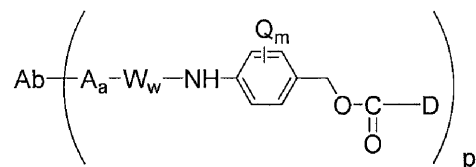
他の実施態様では、-Yy-は、フェニレン部分がQmに置換しているp-アミノベンジルカルバモイル(PAB)ユニットであり、このときQは-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そして、mは0~4の範囲の整数である。

【0238】

非自己犠牲型スパーサーユニット(-Y-)の例示的な実施態様は、-Gly-Gly-、-Gly-、-Ala-Phe-、-Val-Cit-である。

一実施態様では、スパーサーユニットがない($y = 0$)、又は薬学的に許容可能な塩ないしはその溶媒和化合物である、薬剤成分-リンカー又はADCが提供される。

あるいは、自己犠牲的なスパーサーユニットを含むADCは-Dを放出しうる。一実施態様では、-Y-はPABグループのアミノ窒素原子を介して-Ww-に連結されるPABグループであり、カルボナート、カルバメート又はエーテル基を介して-Dに直接連結しており、このときADCは以下のような例示的な構造を有する。

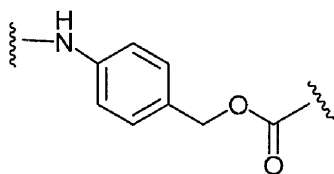


このとき、Qは、 $-\text{C}1-\text{C}8$ アルキル、 $-\text{O}-(\text{C}1-\text{C}8$ アルキル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ 、又は $-\text{シアノ}$ であり、mは0～4の範囲の整数であり、そして、pは1から4の範囲である。

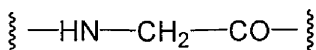
【0239】

自己犠牲的なスペーサーの他の例には、PABグループに電子的に類似している芳香族化合物、例として、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、複素環式のPAB類似体(米国公開特許2005/0256030)、 β -グルクロニド(国際公開2007/011968)、及びオルトないしはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化されるスペーサー、例として、置換した、及び、置換していない4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues等 (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]、及び、ビシクロ[2.2.2]環システム(Storm等 (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815)、及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, 等 (1990) J. Org. Chem. 55:5867)などが使われてもよい。また、グリシンで置換されるアミン含有薬剤の除去(Kingsbury等 (1984) J. Med. Chem. 27:1447)は、ADCに有用な自己犠牲的なスペーサーの例である。

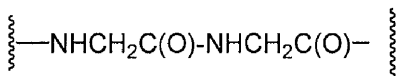
例示的なスペーサーユニット($-\text{Y}_y-$)を式X～XIIIに示す。



X



XI



XII

【0240】

樹枝状リンカー

他の実施態様では、リンカーLは、分岐状の、多機能リンカー成分により一又は複数の薬剤成分が抗体に共有結合するために樹枝型のリンカーであってもよい(Sun等 (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun等 (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増す、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。分岐状の、樹枝状リンカーの例示的な実施態様には、2,6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール及び2,4,6-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノールデンドリマーユニット(国際公開2004/01993; Szalai等 (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689; Shamis等 (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126: 1726-1731; Amir等 (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4494-4499)が含まれる。

一実施態様では、スペーサーユニットは分岐状ビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)であり、これを用いて複数の薬剤を取り込み、放出することができ、以下の構造を有し、

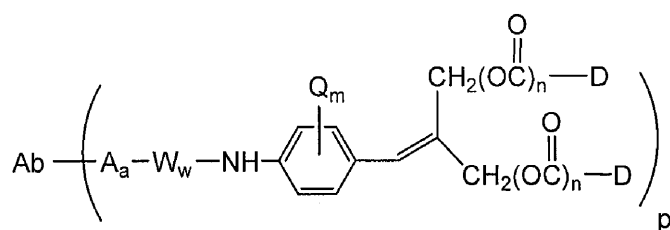
10

20

30

40

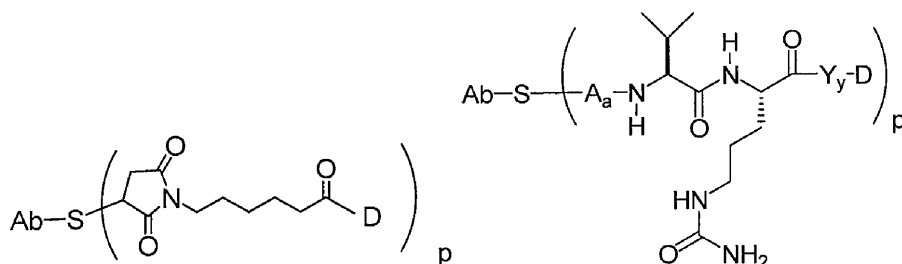
50



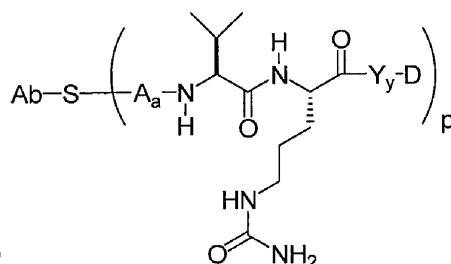
2-(4-アミノベンジリデン)プロパン1,3-ジオールデンドリマーユニットを含み(国際公開2004/043493; de Groot等(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4490-4494)、Qは、 $-\text{C}1-\text{C}8$ アルキル、 $-\text{O}-(\text{C}1-\text{C}8$ アルキル)、 $-\text{H}$ ロゲン、 $-\text{N}$ トロ、又は $-\text{S}$ シアノであり、mは0~4の範囲の整数であり、nは0又は1であり、そして、pは1から4の範囲である。

【0241】

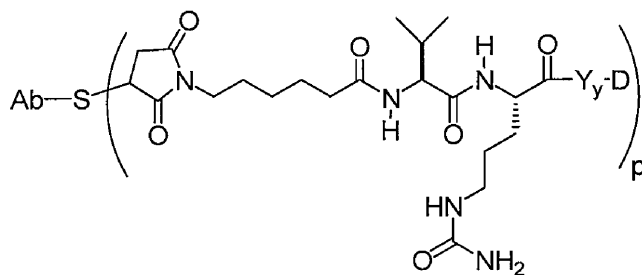
式Iの抗体-薬剤コンジュゲート化合物の例示的な実施態様には、XIIIa(MC)、XIIIb(val-cit)、XIIIc(MC-val-cit)、及びXIIIc(MC-val-cit-PAB)が含まれる。



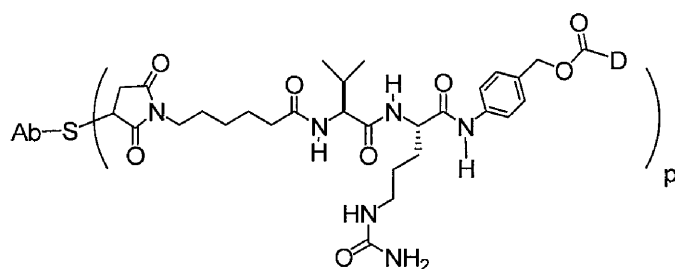
XIIIa



XIIIb



XIIIc



XIIIc

【0242】

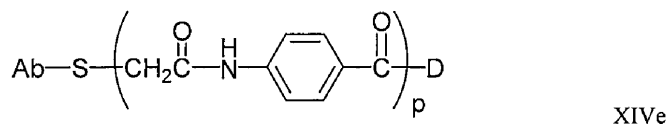
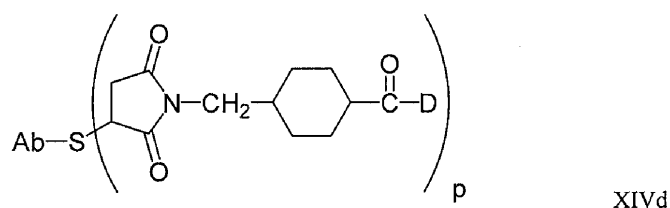
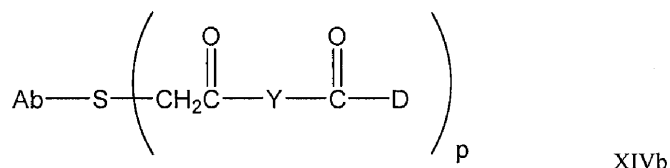
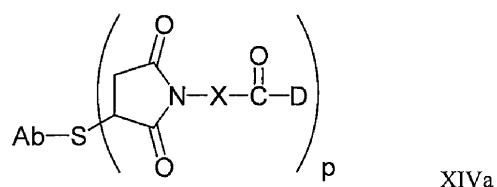
式Iaの抗体-薬剤コンジュゲート化合物の他の例示的な実施態様には、XIVa-eが含まれる。

10

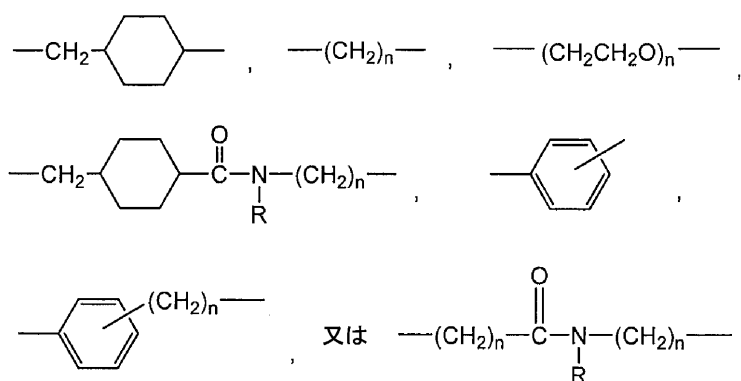
20

30

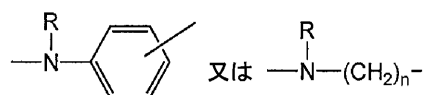
40



このとき、Xは以下のものであり、



Yは以下の通りであり、



そして、RはそれぞれH又はC₁ - C₆ アルキルであり、そして、nは1 ~ 12である。

【0243】

他の実施態様では、リンカーは、抗体に存在する求電子性の基に反応することができる求核基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性の基は、アルデヒド及びケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。リンカーの求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性の基と反応して、抗体ユニットに共有結合することができる。リンカーの有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チ

10

20

30

40

50

オセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定するものではない。抗体の求電子性の基は、リンカーへの付着に都合の良い部位を提供する。

一般的に、ペプチドタイプのリンカーは、2以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成方法(E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)に従って調製されうる。リンカー中間生成物は、スパーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットを含む反応のいずれかの組合せ又は連続によってアセンブリされてもよい。スパーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットは、天然で求電子性、求核性、又は遊離の基である反応性官能基を用いる。反応性官能基には、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ-ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネート、及びO-メシル、O-トシル、-Cl、-Br、-Iなどの脱離基、又はマレイミドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

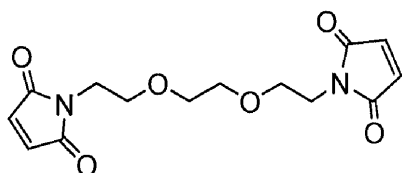
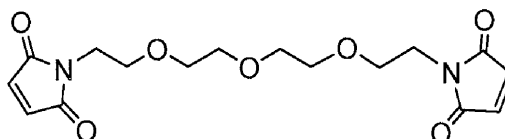
例えば、ADCを調製するために用いる合成手段に応じて、スルホン酸(-SO₃-)又はアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、抗体又は薬剤成分とリンカー試薬とのカップリング反応を容易にしうるか、又はDとAb-L(抗体-リンカー中間生成物)とのカップリング反応、又はAbとD-L(薬剤-リンカー中間生成物)とのカップリング反応を容易にしうる。

【0244】

リンカー試薬

抗体とアウリスタチンとのコンジュゲートは、種々の二官能性リンカー試薬、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。

また、抗体薬剤コンジュゲートは、以下のリンカー試薬、BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾアート)、及びビスマレイミド試薬、例えばDTME、BMB、BMD B、BMH、BMOE、1,8-ビス-マレイミドジエチレングリコール(BM(PEO)₂)、及び1,11-ビス-マレイミドトリエチレングリコール(BM(PEO)₃)にて調製されうる。これらはPierce Biotechnology, Inc.、Thermo Scientific、Rockford, IL、及び他の試薬提供者から市販されている。ビスマレイミド試薬により、連続した様式又は同時の様式で、チオール含有薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物にシステイン改変抗体のチオール基が付着することができる。システイン改変抗体、薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物のチオール基と反応することができるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート及びイソチオシアネートが含まれる。

BM(PEO)₂BM(PEO)₃

【 0 2 4 5 】

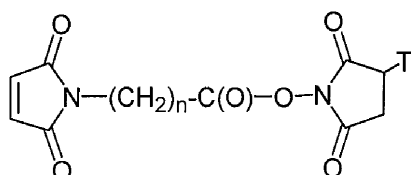
また、有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)などの他の商業的供給源により得ることができるし、Toki等 (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch等 (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; 米国特許第 6 2 1 4 3 4 5 号; 国際公開 0 2 / 0 8 8 1 7 2; 米国特許公開 2 0 0 3 1 3 0 1 8 9; 米国特許公開 2 0 0 3 0 9 6 7 4 3; 国際公開 0 3 / 0 2 6 5 7 7; 国際公開 0 3 / 0 4 3 5 8 3; 及び国際公開 0 4 / 0 3 2 8 2 8 に記載の手段に従って合成してもよい。

10

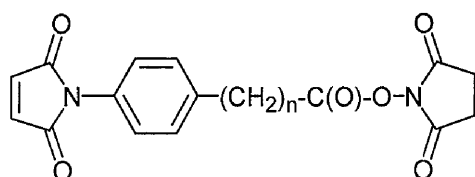
【 0 2 4 6 】

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

20

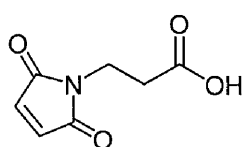
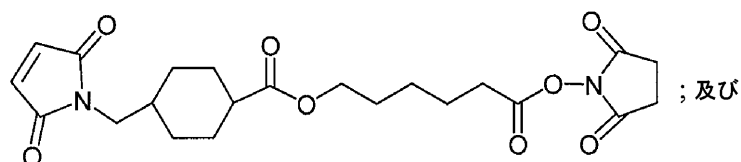
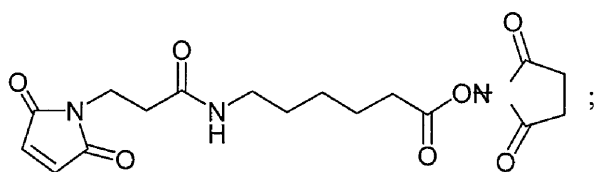
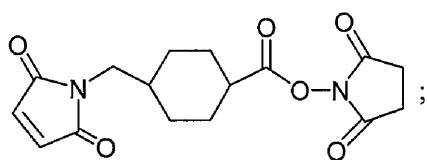


このとき n は 1 ~ 10 の範囲の整数であり、 T は $-H$ 又は $-SO_3Na$ であり、



30

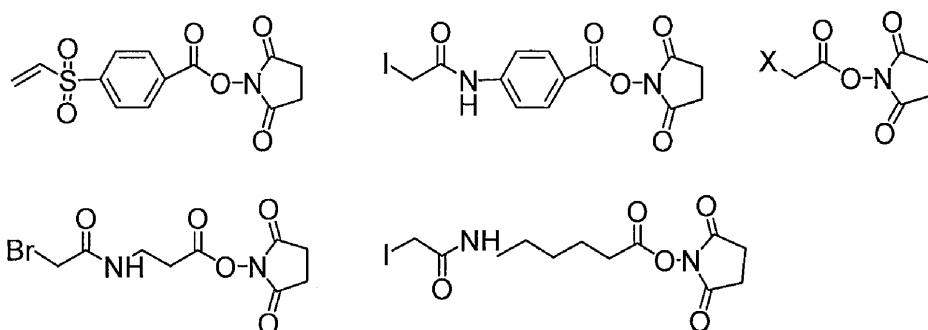
このとき n は 0 ~ 3 の範囲の整数である。



10

ストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットのN末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。

20

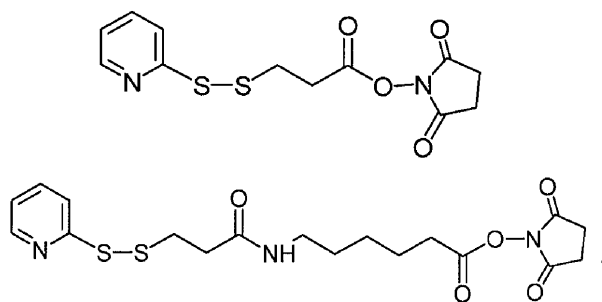


30

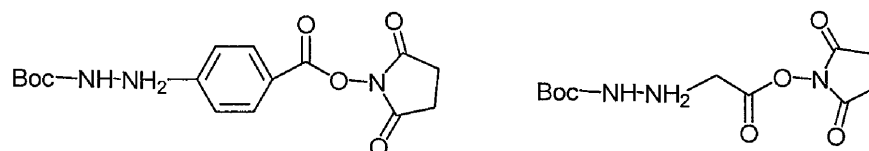
このときXはBr又はIである。

【0247】

また、式のストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットのN末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。



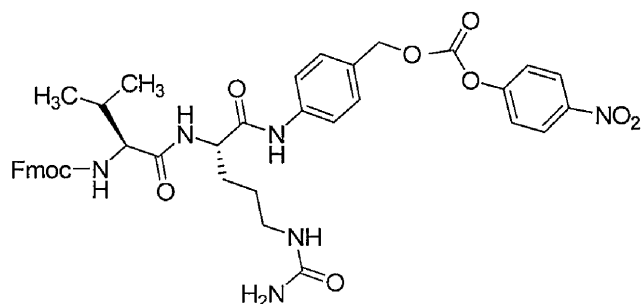
40



50

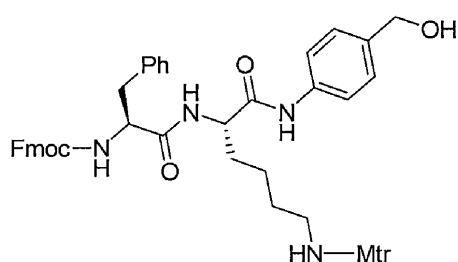
【0248】

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



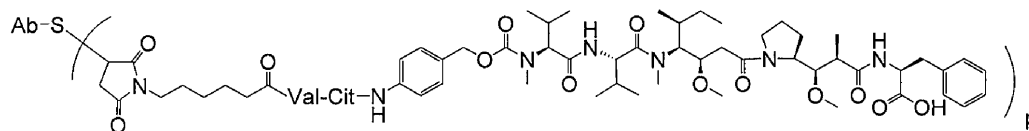
10

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

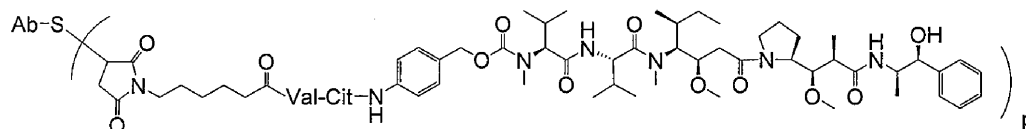


20

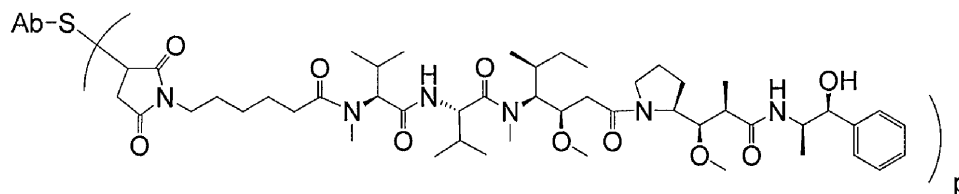
例示的な本発明の抗体-薬剤コンジュゲート化合物は、



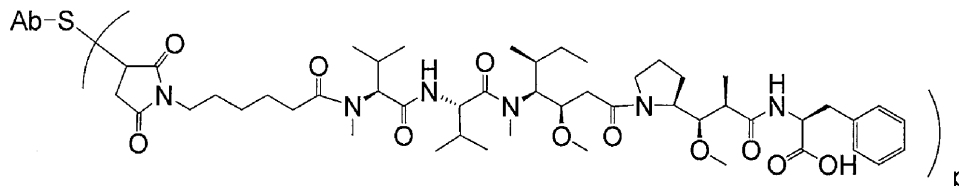
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

10

20

30

を含み、ここで、Valはバリンであり；Citはシトルリンであり；pは1、2、3、又は4であり；Abは抗ヒトCD79b（TAHO5）又はヒトカニクイザルCD79b（TAHO40）のような、システイン改変TAHO抗体である。

【0249】

システイン改変抗CD79b抗体－薬剤コンジュゲートの調製

式IのADCは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) システイン改変抗体のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって抗体－リンカー中間生成物A-Lを形成させ、その後に薬剤成分Dと反応させる、及び(2) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって薬剤－リンカー中間生成物D-Lを形成させ、その後にシステイン改変抗体のシステイン基と反応させる、などによって調製されてもよい。コンジュゲート方法(1)及び(2)は、様々なシステイン改変抗体、薬剤成分及びリンカーを用いて行い、式Iの抗体－薬剤コンジュゲートを調製してもよい。

40

抗体システインチオール基は求核基であり、反応して、リンカー試薬及び薬剤－リンカー中間生成物の求電子基と共有結合することができる。このリンカー試薬及び薬剤－リンカー中間生成物には、(i) 活性エステル類、例えばNHSエステル類、HOBtエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物、(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類、(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、

50

及び(iv) スルフィド交換による、ペリジルジスルフィドを含むジスルフィドが含まれる。薬剤成分の求核基には、リンカー成分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合するために反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0250】

システイン改変抗体は、D T T (クリーランド試薬、ジチオトレイトール)又はT C E P (トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド; Getz等 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤にて処理した後に、鎖間及び鎖内のジスルフィド結合を再形成させるために再酸化させることによって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応性にしてもよい(実施例5)。例えば、CHO細胞に発現される完全長のシステイン改変モノクローナル抗体(Thio Mab)を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成しうるシステイン付加物のジスルフィド結合を還元するために、およそ50倍モルの過剰なT C E Pにて37℃で3時間かけて還元する。還元されたThio Mabを希釈して、10mM 酢酸ナトリウム、pH 5にてHiTrap Sカラムに流し、0.3M 塩化ナトリウムを含むPBSにて溶出する。希釈(200nM)硫酸銅水(CuSO₄)、室温に終夜置くことにより親Mabに存在するシステイン残基間にジスルフィド結合が再構築された。あるいは、デヒドロアスコルビン酸(DHAA)は、システイン付加物の還元分解反応の後にシステイン改変抗体の鎖内ジスルフィド基を再構築させるための有効な酸化体である。当分野で公知の他の酸化体、すなわち酸化剤及び酸化条件が用いられてもよい。外気酸化も有効である。この低刺激性の部分的な再酸化工程により、高品位の鎖内ジスルフィドが効率よく形成され、新たに導入されたシステイン残基のチオール基が維持される。およそ10倍過剰な薬剤-リンカー中間生成物、例えばMC-vc-PAB-MMAEを添加し、混合して、室温におよそ1時間置いて、コンジュゲートに作用させ、抗ヒトCD79b (TAHO5)又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40)のような、抗CD79b抗体-薬剤コンジュゲートを形成させた。コンジュゲート混合物をゲル濾過し、HiTrap Sカラムに流して溶出させ、過剰な薬剤-リンカー中間生成物と他の不純物を除去した。

【0251】

図29は、コンジュゲートのために細胞培養物から発現されるシステイン改変抗体を調製するための一般的な方法を示す。細胞培養培地にシステインを含む場合、新たに導入されたシステインアミノ酸と培地のシステインとの間にジスルフィド付加物が形成しうる。これらのシステイン付加物(図29の例示的なThio Mab(左)に○で示す)は、コンジュゲートのために反応するシステイン改変抗体を生成するために還元されなければならない。システイン付加物は、おそらく様々な鎖間ジスルフィド結合とともに、T C E Pなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、DHAA又は周囲酸素への曝露による不完全酸化条件下で再形成される。新たに導入され、改変され、対形成しないシステイン残基は、リンカー試薬や薬剤-リンカー中間生成物と反応して本発明の抗体コンジュゲートを形成するために利用されうる状態にある。哺乳類の細胞株において発現されるThio Mabは、-S-S-結合形成によって外部からコンジュゲートされた改変CysへのCys付加物となる。したがって、精製されたThio Mabを、実施例5に記載の還元及び再酸化の手順にて処理して、反応性のThio Mabsを生産する。これらのThio Mabを用いて、細胞障害性剤、蛍光体及び他の標識を含むマレイミドとコンジュゲートさせる。

【0252】

10. 免疫リボソーム

ここで開示されている抗TAHO抗体は、免疫リボソームとして処方することもできる。「リボソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リボソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向

に類似した２層構造に配列される。抗体を含有するリボソームは、例えばEpstein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ボソームは米国特許第5013556号に開示されている。

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

【0253】

B. T A H O 結合オリゴペプチド

本発明のT A H O 結合オリゴペプチドはここで記載される様なT A H O ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。T A H O 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。T A H O 結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なT A H O ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。T A H O 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), Cwirala, 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)。

【0254】

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（Cwirlla, 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 5 2 2 3 4 0 9 号、同第 5 4 0 3 4 8 4 号、同第 5 5 7 1 6 8 9 号、及び同第 5 6 6 3 1 4 3 号。

10

【0255】

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、λファージディスプレイシステム（WO 9 5 / 3 4 6 8 3 ; 米国特許第 5 6 2 7 0 2 4 号）、T4ファージディスプレイシステム（Ren 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 5 7 6 6 9 0 5 号）も知られている。

20

【0256】

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 9 8 / 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 9 8 / 2 0 1 6 9 ; WO 9 8 / 2 0 1 5 9）及び拘束性ヘリックスペプチドの特性（WO 9 8 / 2 0 0 3 6）を分析及び制御するために使用されている。WO 9 7 / 3 5 1 9 6 は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリ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 9 7 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリ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 9 7 / 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 WO 9 7 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5 4 9 8 5 3 8 号、同第 5 4 3 2 0 1 8 号、及び WO 9 8 / 1 5 8 3 3 に記載されている。

30

40

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。

【0257】

C. T A H O 結合有機分子

T A H O 結合有機分子とは、ここに記載されるような T A H O ポリペプチドに、好まし

50

くは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。T A H O 結合有機分子は既知の方法（例えばP C T 公開第W O 0 0 / 0 0 8 2 3 及びW O 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。T A H O 結合有機分子は通常、約2000ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なT A H O ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリ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P C T 公開第W O 0 0 / 0 0 8 2 3 及びW O 0 0 / 3 9 5 8 5 号参照）。T A H O 結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【0258】

D. 所望する特性を有する抗T A H O 抗体、T A H O 結合オリゴペプチド及びT A H O 結合有機分子のスクリーニング

T A H O ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び有機分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は有機分子をさらに選択することができる。

本発明の抗T A H O 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はT A H O 遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでT A H O ポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びT A H O 形質移入細胞は、数日間（例えば、2-7）、種々の濃度の本発明の抗T A H O モノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はM T T 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T A H O 抗体、T A H O 結合オリゴペプチド又はT A H O 結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の3 H -チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、D N A へ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。腫瘍細胞は、T A H O ポリペプチドを過剰発現するものである。抗T A H O 抗体、T A H O 結合オリゴペプチド又はT A H O 結合有機分子は、ある実施態様では約0.5から30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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T A H O 発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約100 mg/kg 体重での抗T A H O 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。

【0259】

細胞死を誘発する抗T A H O 抗体、T A H O 結合オリゴペプチド又はT A H O 結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム(P I)、トリパンプルー又は7 A A

D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。P I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。T A H Oポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗T A H O抗体（例えば約10 μ g / ml）、T A H O結合オリゴペプチド又はT A H O結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35 mmのストレーナキャップ付き12 $\times$ 75チューブ(チューブ当たり1 ml、処理グループ当たり3チューブ)に等分する。次いで、チューブへP I (10 μ g / ml)を与える。サンプルをF A C S C A N(登録商標)フローサイトメータとF A C S C O N V E R T(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。P I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T A H O抗体、T A H O結合オリゴペプチド又はT A H O結合有機分子は、細胞死誘発抗T A H O抗体、T A H O結合オリゴペプチド又はT A H O結合有機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T A H Oポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗T A H O抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、T A H Oポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【0260】

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81 / 01145を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、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88 / 07378及び米国特許第4975278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、より活性な細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリ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 β ガラクトシダーゼ； β 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 β 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T A H O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])。

【0261】

F. 完全長T A H Oポリペプチド

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

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

【0262】

G. 抗T A H O抗体及びT A H Oポリペプチド変異体

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

ここに記載した抗T A H O抗体及びT A H Oポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第5364934号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【0263】

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

抗T A H O抗体及びT A H O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TAHO抗体及びTAHOポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗TAHO抗体又はTAHO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。

【0264】

10

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より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。

表10

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

20

30

【0265】

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。

40

抗TAHO抗体又はTAHO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

50

を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの安定性（特に、抗体がF v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。

【0266】

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、アラニンスクランニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトT A H O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T A H O抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、そして抗-T A H O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。

【0267】

H. 抗T A H O抗体及びT A H Oポリペプチドの修飾

抗T A H O抗体及びT A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドを、抗T A H O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、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0268】

本発明の範囲内に含まれる抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコ

シル化部位を取り除くことによって、又は化学及び／又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか)、及び／又は天然配列抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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。

【0269】

抗T A H O抗体又はT A H Oポリペプチド上に糖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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

また、本発明の抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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。

【0270】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H O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、ポリーヒスチジン（ポリ-His）又はポリーヒスチジン-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。

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗T A H O抗体又はT A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3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。

【0271】

I. 抗T A H O抗体及びT A H Oポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗T A H O抗体及びT A H Oポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより抗T A H O抗体及びT A H O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T A H O抗体及びT A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて所望する抗T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドを生成させてもよい。

【0272】

1. 抗T A H O抗体又はT A H OポリペプチドをコードするDNAの単離

抗T A H O抗体又はT A H OポリペプチドをコードするDNAは、抗T A H O抗体又はT A H O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 c D N A ライブラリーから得ることができる。従って、ヒト抗 T A H O 抗体又は T A H O ポリペプチド D N A は、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリーから簡便に得ることができる。また抗 T A H O 抗体又は T A H O 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。

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 c D N A 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 T A H O 抗体又は T A H O ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は、P C R 法を使用するものである [Sambrook 等, 上掲; Dieffenbach 等, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【0273】

c D N A 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 D N A とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、32 P 標識 A T P のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrook 等, に示されている。

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 等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、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook 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 c D N A 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られる。

【0274】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

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

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、リポ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・トウ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, Viro

logy, 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。

【0275】

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 (ATCC 31446)；大腸菌X1776 (ATCC 31537)；大腸菌株W3110 (ATCC 27325)及びK5772 (ATCC 53635)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・スブチルス (*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行の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 ptr 3を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型tonA ptr 3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanrを有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA ptr 3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr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。

【0276】

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必要ない場合に、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。

10

20

30

40

50

【0277】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗T A H O抗体又はT A H O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); クリュイペロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号; Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイペロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983])、クリュイペロミセス・フラギリス(*K. fragilis*) (A T C C 1 2 4 2 4)、クリュイペロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (A T C C 1 6 0 4 5)、クリュイペロミセス・ウィケラミイ(*K. wickerhamii*) (A T C C 2 4 1 7 8)、クリュイペロミセス・ワルチイ(*K. waltii*) (A T C C 5 6 5 0 0)、クリュイペロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (A T C C 3 6 9 0 6; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、クリュイペロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクリュイペロミセス・マルキシアナス(*K. marxianus*); ヤロウィア(*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、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (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、ハンセヌラ(*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。

【0278】

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

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40(COS-7, A T C C C R L 1 6 5 1)で形質転換させたサル腎CV1細胞株; ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された293細胞, Graham等, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞(BHK, A T C C C C L 1 0); チャイ

10

20

30

40

50

ニーズハムスター卵巣細胞／-D H F R (C H O, Urlaub等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 4216 (1980));マウスセルトリ細胞(T M 4, Mather,Biol.Reprod.,23:243-251 (1980)) ;サル腎細胞(C V 1 A T C C C C L 7 0);アフリカミドリザル腎細胞(V E R O - 7 6, A T C C C R L - 1 5 8 7);ヒト頸管腫瘍細胞(H E L A, A T C C C C L 2);イヌ腎細胞(M D C K, A T C C C C L 3 4);バッファローラット肝細胞(B R L 3 A, A T C C C R L 1 4 4 2);ヒト肺細胞(W 1 3 8, A T C C C C L 7 5);ヒト肝細胞(H e p G 2, H B 8 0 6 5);マウス乳房腫瘍細胞(M M T 0 6 0 5 6 2, A T C C C C L 5 1);T R I細胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 (1982));M R C 5細胞;F S 4細胞;及びヒト肝臓癌細胞(H e p G 2)である。

宿主細胞は、抗T A H O抗体又はT A H O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。

【0279】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗T A H O抗体又はT A H Oポリペプチドをコードする核酸(例えば、c D N A又はゲノムD N A)は、クローニング(D N A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、D N A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。

T A H O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T A H O抗体又はT A H Oポリペプチド-コード化D N Aの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスターゼ、ペニシリナーゼ、l p p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) α因子リーダーを含み、後者は米国特許第5, 010, 182号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ・アルビカンズ(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。

【0280】

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p B R 3 2 2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(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V又はB P V)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、例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

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TAHO抗体又はTAHO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trp1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingsman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

10

【0281】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗TAHO抗体又はTAHO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β-ラクタマ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TAHO抗体又はTAHO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。

20

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ[Hitzeman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。

30

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。

【0282】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗TAHO抗体又はTAHOポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

40

より高等の真核生物による抗TAHO抗体又はTAHO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のシス作動要素である。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

50

ン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗TAHO抗体又はTAHO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。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗TAHO抗体又はTAHO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TAHO抗体又はTAHO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。

【0283】

4. 宿主細胞の培養

本発明の抗TAHO抗体又はTAHO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、当業者には明らかであろう。

【0284】

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。

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 T A H O ポリペプチドに対して、又はここで提供される D N A 配列をベースとした合成ペプチドに対して、又は T A H O D N A 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。

【0285】

6. 抗 T A H O 抗体及び T A H O ポリペプチドの精製

抗 T A H O 抗体及び T A H O ポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X 1 0 0)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗 T A H O 抗体及び T A H O ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

抗 T A H O 抗体及び T A H O ポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相 H P L C；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば D E A E によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲル濾過；I g G のような汚染物を除くプロテイン A セファロースカラム；及び抗 T A H O 抗体及び T A H O ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗 T A H O 抗体又は T A H O ポリペプチドの性質に依存する。

【0286】

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)、E D T A、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(P M S F)の存在下で、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。P M S F などのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテイン A の適合性は抗体に存在する免疫グロブリン F c 領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 [1983])。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨されている(Guss 等, EMBO J. 5: 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 H 3 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 H P L C、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリン SEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

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 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。

【0287】

J. 製薬製剤

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート (ADC) は、治療される症状に適切な任意の手段によって投与されてもよい。典型的に ADC は、非経口的に、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内及び硬膜外投与される。

これらの癌を治療するために、一実施態様では、抗体-薬剤コンジュゲートは静脈内注入により投与される。注入により投与される用量は、1 用量当たりおよそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $10000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ の範囲で、一般に週 1 回、合計 1、2、3 又は 4 回の用量である。あるいは、用量範囲は、およそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、及びおよそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ である。投薬は、1 日 1 回、1 週間に 1 回、1 週間に複数回 (1 日 1 回より少ない)、1 か月に複数回 (1 日 1 回より少ない)、1 か月に複数回 (1 週間に 1 回より少ない)、1 か月に 1 回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、腫瘍又はリンパ腫の症状、治療される白血病が寛解するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

【0288】

また、本発明は、自己免疫性疾患に罹っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれかの抗ヒト CD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザル CD79b (TAHO40) のような抗 TAHO 抗体-薬剤コンジュゲートを投与することを含む、自己免疫性疾患の緩和方法を提供する。好ましい実施態様では、抗体は、静脈内又は皮下に投与される。抗体-薬剤コンジュゲートは 1 用量につきおよそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $100 \text{mg}/\text{m}^2$ の範囲の用量で静脈内投与され、そして具体的な実施態様では、用量は $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ である。投薬は、1 日 1 回、1 週間に 1 回、1 週間に複数回 (1 日 1 回より少ない)、1 か月に複数回 (1 日 1 回より少ない)、1 か月に複数回 (1 週間に 1 回より少ない)、1 か月に 1 回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、治療される自己免疫性疾患の症状が寛解又は緩和するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

また、本発明は、B 細胞増殖性疾患 (リンパ腫及び白血病を含むがこれらに限定するものではない) 又は自己免疫性疾患などの B 細胞疾患を患っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれかに記載のヒト化 MA79b 抗体であって、細胞障害性分子や検出可能な分子にコンジュゲートされていない抗体を投与することを含む B 細胞疾患の治療方法を提供する。抗体は一般的に、およそ $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $1000 \text{mg}/\text{m}^2$ の用量範囲で投与されるであろう。

【0289】

一態様では、本発明はさらに、少なくとも一の本発明の抗ヒト CD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザル CD79b (TAHO40) のような抗 TAHO 抗体及び／又は少なくとも一のこのイムノコンジュゲート及び／又は少なくとも一の本発明の抗ヒト CD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザル CD79b (TAHO40) のような抗 TAHO 抗体-薬剤コンジュゲートを含有する薬学的製剤を提供する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 本発明の抗体及び／又はこのイムノコンジュゲートと、2) 薬学的許容性のある担体とを含有する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 本発明の抗体

及び／又はこのイムノコンジュゲートと、場合によって2) 少なくとも一の付加的治療剤とを含有する。更なる治療剤には以下に記載のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。典型的に、ADCは非経口的に、すなわち、注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、髄腔内及び硬膜外に投与されるであろう。

【0290】

本発明に係る抗TAHO抗体、TAHO結合オリゴペプチド、TAHO結合有機分子及び／又はTAHO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、T r i s、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；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／又はトゥイーン(TWEEN)（登録商標）、プルロニクス(PLURONICS)（登録商標）、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5-200mg/mlの間、好ましくは10-100mg/mlの間の濃度の抗体で構成される。

【0291】

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TAHO抗体、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子に加えて、1つの製剤に、例えば、TAHOポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗TAHO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））、ポリアクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸及びγエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)（

乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

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

【0292】

K. 抗TAHO抗体、TAHO結合オリゴペプチド又はTAHO結合有機分子を用いる治療

癌におけるTAHO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。一実施態様では、TAHO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TAHOタンパク質染色強度基準と合致させてもよい：

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

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

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

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

TAHOポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、TAHO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TAHOが過剰発現していることを特徴としうる。

【0293】

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TAHO過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

TAHO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TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、TAHOポリペプチドを発現している癌のステージ分類に有用である(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TAHO発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、また、例えば、ELISA又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでTAHOポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からTAHOポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【0294】

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TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるTAHO-発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び／又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子による治療は、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)

(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パリクタキセル)、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T A H O抗体、オリゴペプチド又は有機分子を投与することができる。特に、パリ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T A H O抗体、オリゴペプチド又は有機分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施態様では、抗T A H O抗体、オリゴペプチド又は有機分子は化学療法剤、例えばパクリタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(P D R)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

10

【0295】

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

20

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

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

30

【0296】

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

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗T A H O抗体(又は抗体類)、オリゴペプチド又は有機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)(例えばパクリタキセル及びドキシタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。

40

抗体、オリゴペプチド有機分子は、抗ホルモン化合物；例えばタモキシフェン等の抗-エストロゲン化合物；抗-プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第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った後、抗T A H O抗体、オリゴペプチド又は有機分子(及び場合によってはここに記載した他の薬剤)を患者に投与してもよい。

50

【0297】

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ある有益なものである。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T A H O抗体、オリゴペプチド又は有機分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば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1 k g当たり約1 μ gないし50 m g(例えば0.1-15 m g / k g / 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4 m g / k gの初期負荷量、続いて1週間に約2 m g / k gの維持用量の抗T A H O抗体を投与することからなっておりよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1 μ g / k gから100 m g / k g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。

【0298】

抗体タンパク質の患者への投与の他に、本出願は遺伝子治療による抗体の投与を考察する。抗体をコードする核酸の投与は「抗体を治療的有效量で投与する」という表現に含まれる。例えば、遺伝子治療を用いた細胞内抗体の産生に関する、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。

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、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。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0299】

現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスI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T A H O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Fc領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なFc領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ADCC)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞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Fc領域が使用される。

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

10

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【0300】

本抗TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物におけるTAHO-発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌には、造血性癌又は血液関連癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫又はリンパ性悪性腫瘍、並びに脾臓の癌及びリンパ節の癌が含まれるが、これらに限定されない。そのようなB細胞関連癌の具体的な例として、例えば、高悪性度、中悪性度及び低悪性度のリンパ腫（例えば粘膜内リンパ組織B細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫等のB細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、周辺帯リンパ腫、拡散性大細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びホジキンリンパ腫及びT細胞リンパ腫を含む）、白血病（二次性白血病、慢性リンパ性白血病、例えばB細胞白血病(CD5+Bリンパ球)、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病及び骨髄異形成症候群を含む）、プラズマ細胞悪性腫瘍等の多発性骨髄腫、並びにその他血液学的及び／又はB細胞又はT細胞関連癌が挙げられる。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてTAHOポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビボ又はインビトロで細胞のTAHOポリペプチドに結合して、TAHO-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗TAHO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TAHO抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は成長阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケ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体が好ましい。

20

30

【0301】

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

40

本発明の他の態様は、抗TAHO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TAHO抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療の有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるTAHOポリペプチド-発現癌の治療又は癌の一

50

又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(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、T A H O ポリペプチド-発現細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

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

【0302】

L. 抗体-薬剤コンジュゲート治療

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(A D C)は、例えば腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられる様々な疾病又は疾患を治療するために使用することはできる。例示的症状又は過剰増殖疾患には、良性及び悪性腫瘍；白血病及びリンパ系腫瘍が含まれる。他のものには、自己免疫を含む、神経細胞、膠細胞、星状膠細胞、視床下部、腺性、マクロファージ、上皮、間質性、胞胚腔、炎症性、血管形成及び免疫性疾患が含まれる。

動物モデル及び細胞ベースアッセイにおいて同定されるA D C化合物は、腫瘍を持つ高等霊長類及びヒト臨床治験で更に試験することができる。ヒト臨床治験を、限定しないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(N H L)、侵襲性N H L、再発侵襲性N H L、再発無痛性N H L、難治性N H L、難治性無痛性N H L、慢性リンパ性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(H C L)、急性リンパ性白血病(A L L)、及びマントル細胞リンパ腫を含むB細胞増殖疾患を被っている患者において本発明の抗C D 7 9 bモノクローナル抗体又は免疫コンジュゲートの効能を試験するために設計することができる。臨床治験は、放射線及び／又は既知の化学療法及び／又は細胞傷害剤を含む化学療法のような、既知の治療法と併用してのA D Cの効能を評価するために設計することができる。

【0303】

一般に、治療される疾病又は疾患は、B細胞増殖疾患及び／又はB細胞癌のような過剰増殖疾患である。ここで治療される癌の例には、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(N H L)、侵襲性N H L、再発侵襲性N H L、再発無痛性N H L、難治性N H L、難治性無痛性N H L、慢性リンパ性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(H C L)、急性リンパ性白血病(A L L)、及びマントル細胞リンパ腫から選択されるB細胞増殖疾患が含まれる。

癌は、本発明のA D Cが癌細胞に結合できるように、ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)又はカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)発現細胞のようなT A H O発現細胞を含みうる。癌におけるヒトC D 7 9 b (T A H O 5)又はカニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)のようなT A H Oポリペプチドの発現を決定するために、様々な診断／予後アッセイが利用できる。一実施態様では、C D 7 9 bの過剰発現はI H Cによって分析することができる。腫瘍バイオプシーからのパラフィン包埋組織切片にI H Cアッセイを施し、染色の程度及び検査される腫瘍細胞の割合に関してC D 7 9 bタンパク質の染色強度基準に一致させる。

【0304】

疾患の予防又は治療の場合、A D Cの適切な投薬量は、上で定めた処置される疾患のタイプ、疾患の重篤度と経過、分子が予防目的又は治療目的で投与されるかどうか、過去の治療、患者の臨床歴、抗体に対する応答性、及び担当医の裁量に依存する。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。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 1 kg 当たり約 1 μ g ないし 50 mg (例えば 0.1 – 20 mg/kg/用量) の分子を患者への最初の投与量の候補とすることができる。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約 1 μ g/kg から 100 mg/kg あるいはそれ以上の範囲である。患者に投与される ADC の例示的投薬量は、約 0.1 から約 10 mg/kg 患者体重の範囲である。

症状に応じて数日又は更に長い間、繰り返して投与する場合、疾患症状の所望の抑制が得られるまで、治療が持続される。例示的な投薬計画は、約 4 mg/kg の初期負荷量、続いて 1 週間に約 2 mg/kg の維持用量の抗 ErbB2 抗体を投与することを含む。他の投薬計画も有効であろう。この治療の進行状態は、通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【0305】

M. 併用治療法

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、抗癌特性を有する第二化合物と、薬学的併用製剤、又は併用療法としての投薬計画において、組み合わせることができる。薬学的併用製剤又は投薬計画の第二化合物は、好ましくは、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、併用の ADC に対して相補的活性を有している。

第二化合物は、化学療法剤、細胞傷害剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤、及び/又は心臓保護薬でありうる。かかる分子は、好適には、意図された目的に対して効果的である量で組み合わせ存在する。本発明の ADC を含む薬学的組成物は、チューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、又は DNA バインダーのような化学療法剤の治療的有効量をまた有しうる。

一態様では、第一化合物は、本発明の抗ヒト CD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザル CD79b (TAHO40) のような TAHO ADC であり、第二化合物は抗 CD20 抗体(ネイキッド抗体か ADC の何れか)である。一実施態様では、第二化合物は抗 CD20 抗体リツキシマブ(リツキサン(登録商標))又は 2H7 (ジェネンテック社, South San Francisco, CA) である。本発明の抗 CD79b ADC との併用免疫療法に有用な他の抗体は、限定しないが、抗 VEGF (例えばアバスタチン(登録商標))を含む。

【0306】

限定しないが、放射線療法及び/又は骨髄及び末梢血移植、及び/又は細胞傷害剤、化学療法剤、又は増殖阻害剤を含む他の治療計画を、本発明に従って同定された抗癌剤の投与と併用することができる。かかる実施態様の一つでは、化学療法剤は、例えばシクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキシソルビシン、ビンクリスチン(オンコビンTM)、プレドニソロン、CHOP、CVP、又は COP、又は免疫療法剤、例えば抗 CD20 (例えばリツキサン(登録商標))又は抗 VEGF (例えばアバスタチン(登録商標))のような薬剤又は薬剤の組合せである。

併用療法は、同時の又は連続的な投与計画として投与されうる。連続的に投与される場合、併用剤は二以上の投与で投与されうる。併用投与は、別個の製剤又は単一の薬学的製剤を使用する同時投与と、双方(又は全て)の活性剤がその生物学的活性を同時に作用させる時間が好ましくは存在する何れかの順の連続投与とを含む。

【0307】

一実施態様では、ADC での治療は、ここで同定された抗癌剤と、異なった化学療法剤のカクテルの同時投与を含む一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害剤の併用投与を含む。化学療法剤には、タキサン(例えばパクリタキセル及びドセタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。かかる化学療法のための調製及び投薬スケジュールは、製造者の指示書に従って、又は熟練者によって経験的に決定されるようにして、使用されうる。かかる化学療法のための調製及び投薬スケジュールは、また "Chemotherapy Service", (1992)Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md に記載されている。

上記の同時投与剤の何れかのための好適な投薬用量は現在使用されているものであり、新規に同定された薬剤と他の化学療法剤又は治療法との組合せ作用(相乗性)のために低くしてもよい。

10

20

30

40

50

併用療法は、「相乗性」をもたらし得、「相乗的」であり得、つまり活性成分が一緒に使用された場合に達成される効果が化合物を別個に使用することから得られる効果の合計よりも大きい。相乗効果は、(1)併用された単位投薬製剤の形で同時処方され同時に投与又は送達される場合；(2)別個の製剤として交互に又は平行して送達される場合；又は(3)ある他の療法によって、達成されうる。交互治療法で送達される場合、相乗効果は、化合物が、例えば別個のシリンジでの異なった注入によって連続的に投与又は送達される場合に達成されうる。一般に、交互治療中においては、各活性成分の有効投薬量が連続的に、つまり連続して投与される一方、併用療法では、二以上の活性成分の有効投薬量が一緒に投与される。

【0308】

N. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、抗T A H Oを発現する癌の治療に有用な物質を含む製造品である。該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うる。容器は、癌の症状の治療、予防及び／又は診断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りうる)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗T A H O抗体、オリゴペプチド、有機分子である。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分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。更に、製造品は製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(B W F I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を具備しうる。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更に含んでもよい。

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

【0309】

O. T A H Oポリペプチド及びT A H O-ポリペプチドコード核酸の用途

T A H O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、T A H Oコード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるT A H Oポリペプチドの調製に有用であり、これらT A H Oポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗T A H O抗体の調製において用途を見出し得る。

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

10

20

30

40

50

、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、T A H O 遺伝子のコード領域を周知のD N A 配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、32P又は35S等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン／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T A H O 遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトc D N A、ゲノムD N A 又はm R N A のライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意のE S T 配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

10

【0310】

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

20

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し、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T A H O タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それらT A H O 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、酵素分解に耐えうが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

30

【0311】

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(O R F)の翻訳開始/開始コドン(5'-A U G / 5'-A T G)又は終結/停止コドン(5'-U A A、5'-U A G 及び5'-U G A / 5'-T A A、5'-T A G 及び5'-T G A)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m R N A 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(O R F)又は「コード領域」;5'-5'トリホスフェート結合を介してm R N A 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m R N A の5'キャップ;翻訳開始コドンから5'方向のm R N A の部分で、m R N A 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'U T R);及び翻訳終結コドンから3'方向のm R N A の部分で、m R N A 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'U T R)が含まれる。

40

T A H O タンパク質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

50

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3 6 8 7 8 0 8；4 4 6 9 8 6 3；4 4 7 6 3 0 1；5 0 2 3 2 4 3；5 1 7 7 1 9 6；5 1 8 8 8 9 7；5 2 6 4 4 2 3；5 2 7 6 0 1 9；5 2 7 8 3 0 2；5 2 8 6 7 1 7；5 3 2 1 1 3 1；5 3 9 9 6 7 6；5 4 0 5 9 3 9；5 4 5 3 4 9 6；5 4 5 5 2 3 3；5 4 6 6 6 7 7；5 4 7 6 9 2 5；5 5 1 9 1 2 6；5 5 3 6 8 2 1；5 5 4 1 3 0 6；5 5 5 0 1 1 1；5 5 6 3 2 5 3；5 5 7 1 7 9 9；5 5 8 7 3 6 1；5 1 9 4 5 9 9；5 5 6 5 5 5 5；5 5 2 7 8 9 9；5 7 2 1 2 1 8；5 6 7 2 6 9 7及び5 6 2 5 0 5 0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

20

30

40

50

【0 3 1 2】

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；シロキサン骨格；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5 0 3 4 5 0 6；5 1 6 6 3 1 5；5 1 8 5 4 4 4；5 2 1 4 1 3 4；5 2 1 6 1 4 1；5 2 3 5 0 3 3；5 2 6 4 5 6 2；5 2 6 4 5 6 4；5 4 0 5 9 3 8；5 4 3 4 2 5 7；5 4 6 6 6 7 7；5 4 7 0 9 6 7；5 4 8 9 6 7 7；5 5 4 1 3 0 7；5 5 6 1 2 2 5；5 5 9 6 0 8 6；5 6 0 2 2 4 0；5 6 1 0 2 8 9；5 6 0 2 2 4 0；5 6 0 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 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。

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。

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-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られる]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-、及び上で参照した米国特許第5489677号に記載された-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[ここで天然ホスホジエステル骨格は-O-P-O-CH₂-と表される]及び上で参照された米国特許第5602240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5034506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。

【0313】

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C₁～C₁₀アルキル又はC₂～C₁₀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[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及びO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]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：C₁～C₁₀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、アラリル、O-アルカリル又はO-アラリル、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(CH₂)₂ON(CH₃)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。

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。LNAs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；561

10

20

30

40

50

0 3 0 0 ; 5 6 2 7 0 5 3 ; 5 6 3 9 8 7 3 ; 5 6 4 6 2 6 5 ; 5 6 5 8 8 7 3 ; 5 6 7 0 6 3 3 ; 5 7 9 2 7 4 7 ; 及び 5 7 0 0 9 2 0 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。

【0314】

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（ $-C \equiv C-CH_3$ 又は $CH_2-C \equiv CH$ ）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（ブソイドウラシル）、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-ブロモ、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-デアザグアノシン、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も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0.6-1.2℃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3687808；並びに米国特許4845205；5130302；5134066；5175273；5367066；5432272；5457187；5459255；5484908；5502177；5525711；5552540；5587469；5594121；5596091；5614617；5645985；5830653；5763588；6005096；5681941及び5750692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。

【0315】

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。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みうる。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、Biochimie, 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、セファロスポリン、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09/334130号（1999年6月15日出願）及び米国特許4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5241136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928及び5688941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。

【0316】

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チドにさえ導入すること

10

20

30

40

50

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のモノマー単位、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、オリゴヌクレオチド及び／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。

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、組み合わせられてもよい。そのような取り込み、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5108921; 5354844; 5416016; 5459127; 5521291; 5543158; 5547932; 5583020; 5591721; 4426330; 4534899; 5013556; 5108921; 5213804; 5227170; 5264221; 5356633; 5395619; 5416016; 5417978; 5462854; 5469854; 5512295; 5527528; 5534259; 5543152; 5556948; 5580575; 及び5595756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。

【0317】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属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、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-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。

10

【0318】

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

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

20

【0319】

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

30

40

また、プローブをPCR技術に用いて、密接に関連したTAHO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、TAHOをコードするヌクレオチド配列は、そのTAHO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。

【0320】

TAHOのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例

50

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

また、T A H O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、T A H OをコードするcDNAは、T A H OをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、T A H O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T A H O導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたT A H Oをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はT A H O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。

【0321】

あるいは、T A H Oの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたT A H Oをコードする変更ゲノムDNAと、T A H Oをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、T A H Oをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するT A H O「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、T A H OをコードするcDNAは、確立された技術に従い、T A H OをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。T A H OをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターするために使用する選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)を数キロベース含む[例えば、相同組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, 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), p. 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、期間において「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、T A H Oポ

リペプチドの欠乏によるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

また、T A H O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D N A又はm R N A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R N A及びD N A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。

【0322】

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、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、D E A E -デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リボソーム媒介トランスフェクションである(Dzau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。リボソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び／又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu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。

ここに記載したT A H O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T A H O核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のT A H Oポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、本発明のT A H Oポリペプチドは、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に比較して疾患性組織において特異的に発現する。T A H O核酸分子には、P C R、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。

【0323】

この発明は、T A H Oポリペプチド(アゴニスト)を模倣、又はT A H O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T A H Oポリペプチドと結合又は複合化する、さもないと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T A H Oポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分

子薬剤候補の同定に適したものにする。

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

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T A H O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。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるT A H O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T A H Oポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきT A H O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。

【0324】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子によってコードされる特定のT A H Oポリペプチドと結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィ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G A L 4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はD N A結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がG A L 4のD N A結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。G A L 1-l a c Zリポーター遺伝子のG A L 4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したG A L 4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）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。

【0325】

ここで同定されたT A H O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、T A H Oポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、T A H Oポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がT A H O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、T A H Oポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合T A H Oポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。T A H Oポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したT A H O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、例えばリガンドバニング及びF A C S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、そこではポリアデニル化R N AがT A H Oポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このR N Aから生成されたc D N Aライブラリがプールに分配され、C O S細胞又は他のT A H Oポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したT A H Oポリペプチドへ曝露する。T A H O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。

【0326】

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

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

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

他の潜在的なT A H Oポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスR N A又はD N A作成物であり、例えば、アンチセンスR N A又はD N A分子は、標的m R N Aにハイブリ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m R N Aの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、三重螺旋形成又はアンチセンスD N A又はR N Aを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのD N A又はR N Aへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟T A H Oポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスR N Aオリゴヌクレオチドの設計に使用される。D N Aオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重螺旋—Lee等, *Nucl, Acid Res.*, 6: 3073 (1979); Cooney等, *Science*, 241

10

20

30

40

50

: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりT A H O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T A H O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、T A H O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。

【0327】

10

潜在的アンタゴニストは、T A H Oポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりT A H O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。

20

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。

【0328】

30

単離されたT A H Oポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にT A H Oポリペプチドを生成するために、ここで用いることが可能である。次に、生成されたT A H Oポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗T A H O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T A H Oポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

T A H O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ボソームも抗体、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。

40

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。

【0329】

50

M. 抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(P E G)、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

【0330】

N. スクリーニング方法

本発明の更に他の実施態様は、T A H Oポリペプチドを含むと疑われる試料中のT A H Oポリペプチドの存在を決定する方法であって、T A H Oポリペプチドに結合するその抗体薬剤コンジュゲートに試料を暴露し、試料中のT A H Oポリペプチドへのその抗体薬剤コンジュゲートの結合を決定することを含み、かかる結合の存在が試料中のT A H Oポリペプチドの存在を示す方法に関する。場合によっては、試料は、T A H Oポリペプチドを発現していることが疑われる細胞(癌細胞でありうる)を含みうる。本方法で用いられるその抗体薬剤コンジュゲートは、場合によっては検出可能に標識され、固体担体に結合等されうる。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物中における腫瘍の存在を診断する方法であって、(a) T A H Oポリペプチドに結合するその抗体薬剤コンジュゲートに、哺乳動物から得られた組織細胞を含む試験試料を接触させ、(b) その抗体薬剤コンジュゲートと試験試料中のT A H Oポリペプチドの間の複合体形成を検出することを含み、複合体の形成が哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法に関する。場合によっては、抗体薬剤コンジュゲートは、検出可能に標識され、固体担体に結合等され、及び／又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を持つことが疑われる個体から得られる。

【0331】

I V. 抗C D 7 9 b抗体及びイムノコンジュゲートの更なる使用方法

A. 診断法と検出の方法

一態様では、本発明の抗T A H O抗体及びイムノコンジュゲートは、生体試料中のT A H Oポリペプチドの存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」なる用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。ある実施態様では、生体試料は、細胞又は組織を含む。ある実施態様では、このような組織には、他の組織、例えばB細胞及び／又はB細胞関連組織と比較して高いレベルでT A H Oポリペプチドを発現する正常及び／又は癌性組織が含まれる。

一態様では、本発明は、生体試料中のT A H Oポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、T A H Oポリペプチドへの抗T A H O抗体の結合に許容される条件下で抗T A H O抗体と生体試料を接触させ、抗T A H O抗体と任意のT A H Oポリペプチドとの間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。

一態様では、本発明は、T A H Oポリペプチドの発現増加と関係している疾患を診断する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、抗T A H O抗体と試験細胞を接触さ

せ、T A H Oポリペプチドへの抗T A H O抗体の結合を検出することによって試験細胞によるT A H Oポリペプチドの発現レベル(量的に又は質的に)を測定し、そして、試験細胞によるT A H Oポリペプチドの発現レベルをコントロール細胞(例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞、又はこの正常細胞と同等のレベルでT A H Oポリペプチドを発現する細胞)によるT A H Oポリペプチドの発現レベルと比較することを含み、コントロール細胞と比べて試験細胞によるT A H Oポリペプチドの発現レベルが高い場合にT A H Oポリペプチドの発現の増加に関連する細胞増殖性疾患の存在が示される。ある実施態様では、試験細胞は、T A H Oポリペプチドの発現の増加に関連する疾患があると疑われる患者から得られる。ある実施態様では、前記疾患は、癌又は腫瘍などの細胞増殖性疾患である。

10

【0332】

本発明の抗体を使用して診断されうる例示的な細胞増殖性疾患には、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(N H L)、侵襲性N H L、再発侵襲性N H L、再発無痛性N H L、難治性N H L、難治性無痛性N H L、慢性リンパ性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(H C L)、急性リンパ性白血病(A L L)、及びマントル細胞リンパ腫を含むB細胞疾患及び／又はB細胞増殖性疾患が含まれる。

ある実施態様では、上記のような診断ないし検出の方法は、表面にT A H Oポリペプチドを発現する細胞から得た膜調整物中又は細胞の表面において発現されるT A H Oポリペプチドに対する抗T A H O抗体の結合を検出することを含む。ある実施態様では、前記方法は、T A H Oポリペプチドへの抗T A H O抗体の結合に許容される条件下で抗T A H O抗体と細胞を接触させ、抗T A H O抗体と細胞表面上のT A H Oポリペプチドとの間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。細胞の表面上に発現されたT A H Oポリペプチドへの抗T A H O抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは、「F A C S」アッセイである。

20

【0333】

ある他の方法は、T A H Oポリペプチドに対する抗T A H O抗体の結合を検出するために用いてもよい。前期の方法には、限定するものではないが、当分野で周知である抗原-結合アッセイ、例えばウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、E L I S A (抗体結合免疫吸着検定)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、及び免疫組織化学(I H C)が含まれる。

30

ある実施態様では、抗T A H O抗体は標識される。標識には、限定するものではないが、直接検出される標識又は分子(例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、及び放射性標識)、並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用によって間接的に検出される酵素ないしはリガンドなどの分子が含まれる。例示的な標識には、限定するものではないが、放射性同位体である ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{131}I 、フルオロフォア、例えば希有土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、西洋わさびペルオキシダーゼ(H R P)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、H R P、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために水素ペルオキシダーゼを用いる酵素とカップリングさせたもの、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定したフリーラジカルなどが含まれる。

40

【0334】

ある実施態様では、抗T A H O抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかのT A H Oポリペプチドから抗T A H O抗体を分離することを

50

伴う。これは従来、水不溶性基質ないしは表面に吸着させる(Bennich等, 米国特許第3720760号)又は共有的にカップリングさせる(例えば、グルタルアルデヒド架橋結合を使用する)などしてアッセイ手順の前に抗T A H O抗体を不溶化するか、又は抗T A H O抗体とT A H Oポリペプチドとの複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によって抗T A H O抗体を不溶化することによって達成される。

診断ないし検出の上記いずれかの実施態様は、抗T A H O抗体の代わりに、ないしは抗T A H O抗体に加えて本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われうる。

【0335】

B. 治療法

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えばインビトロ、エキスビボ、及びインビボの治療法で使われてもよい。一態様では、本発明は、T A H Oポリペプチドへのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗T A H O抗体ないしはそのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、インビボ又はインビトロでの細胞の成長ないしは増殖を阻害するための方法を提供する。「細胞成長又は増殖を阻害する」ことは、細胞の成長ないしは増殖を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は100%低減することを意味し、細胞死を誘導することを含む。ある実施態様では、細胞は腫瘍細胞である。ある実施態様では、細胞はB細胞である。ある実施態様では、細胞は、例えば本明細書中に例示したような異種移植片である。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、B細胞増殖性疾患を治療するか又は予防するために用いる。ある実施態様では、細胞増殖性疾患は、T A H Oポリペプチドの発現及び／又は活性の増加と関係している。例えば、ある実施態様では、細胞増殖性疾患は、B細胞の表面上のT A H Oポリペプチドの発現増加と関係している。ある実施態様では、B細胞増殖性疾患は腫瘍又は癌である。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートによって処置されるB細胞増殖性疾患の例には、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NH L)、侵襲性NH L、再発侵襲性NH L、再発無痛性NH L、難治性NH L、難治性無痛性NH L、慢性リンパ性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(H C L)、急性リンパ性白血病(A L L)、及びマントル細胞リンパ腫が含まれる。

【0336】

一態様では、本発明は、抗T A H O抗体ないしそのイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含むB細胞増殖性疾患を治療するための方法を提供する。ある実施態様では、B細胞増殖性疾患を治療するための方法は、抗T A H O抗体又は抗T A H Oイムノコンジュゲートと、場合によって以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。ある実施態様では、細胞増殖性疾患を治療するための方法は、1)抗T A H O抗体と細胞障害性剤とを含むイムノコンジュゲートと、場合によって2)以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの少なくともいくつかは、ヒト以外の種のT A H Oを結合しうる。したがって、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えば、T A H Oポリペプチドを含む細胞培養物において、ヒトにおいて、又は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが交差反応するT A H Oポリペプチドを有する他の哺乳動物(例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)においてT A H Oポリペプチドを結合するために用いてもよい。一実施態様では、抗T A H O抗体ないしイムノコンジュゲートは、イムノコンジュゲートのコンジュゲートされている細胞毒性が細胞の内部にアクセスするように、抗体ないしイムノコンジュゲートをT A H Oポリペプチドと接触させて抗体ないしイムノコンジュゲート-抗原複合体を形成させることによってB細胞上のT A H Oポリペプチドをターゲティングするために使われてよい。一実施態様では、T A H OポリペプチドはヒトT A H Oポリペプチドである。

【0337】

一実施態様では、抗T A H O抗体ないしイムノコンジュゲートは、個体のT A H Oポリペプチドが結合されるように抗体ないしイムノコンジュゲートを個体に投与することを含む、T A H Oポリペプチド発現及び／又は活性の増加と関係する疾患を患っている個体において抗体を結合させるための方法に用いられうる。一実施態様では、結合抗体又はイムノコンジュゲートはT A H Oポリペプチド発現B細胞中に内部移行する。一実施態様では、T A H OポリペプチドはヒトのT A H Oポリペプチドであり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗T A H O抗体が結合するT A H Oポリペプチドを発現している哺乳動物であってもよい。また更に、個体は、T A H Oポリペプチドが(例えば、T A H Oポリペプチドの投与によって、又はT A H Oポリペプチドをコードする導入遺伝子の発現によって)導入された哺乳動物であってもよい。

10

抗T A H O抗体ないしイムノコンジュゲートは、治療目的のためにヒトに投与されうる。さらに、抗T A H O抗体ないしイムノコンジュゲートは、獣医学の目的のため又はヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するT A H Oポリペプチドを発現する非ヒト哺乳動物(例えば、霊長類、ブタ、ラット又はマウス)に投与されうる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの治療有効性を評価するため(例えば、投与の用量及び時間経過の試験する)に有用となりうる。

【0338】

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが、治療において単独、又は他の組成物と組み合わせられてもよい。例えば、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、少なくとも一の付加的治療剤及び／又はアジュバントと同時に投与されてもよい。ある実施態様では、付加的治療剤は、細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤である。このような実施態様のうちの一つでは、化学療法剤は、卵巣癌の治療に用いられる薬剤又はこの薬剤の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン(オンコビンTM)、プレドニソロン、C H O P、C V P、又はC O P、又は免疫療法剤、例えば抗C D 2 0(例えばリツキサン(登録商標))又は抗V E G F(例えばアバスタチン(登録商標))であり、ここで、併用療法は、癌及び／又はB細胞疾患、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(N H L)、侵襲性N H L、再発侵襲性N H L、再発無痛性N H L、難治性N H L、難治性無痛性N H L、慢性リンパ性白血病(C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(H C L)、急性リンパ性白血病(A L L)、及びマントル細胞リンパ腫を含むB細胞増殖疾患の治療に有用である。

20

30

【0339】

上記の併用治療には、併用投与(2以上の治療剤が同じか又は別の製剤に包含される)、及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは付加的治療剤及び／又はアジュバントの前、同時及び／又はその後に投与することができる。また、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、放射線療法と組み合わせられてもよい。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲート(及び任意の更なる治療剤又はアジュバント)は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体ないしイムノコンジュゲートを、特に抗体ないしイムノコンジュゲートの用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

40

【0340】

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体ないしイム

50

ノコンジュゲートとを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の抗体ないしイムノコンジュゲートの量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1～99%で、或いは経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量及び任意の投与経路で、用いられる。

【0341】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの一又は複数の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体ないしイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体ないしイムノコンジュゲートを予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体ないしイムノコンジュゲートへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体ないしイムノコンジュゲートは一時的又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $20\text{mg}/\text{kg}$)の抗体ないしイムノコンジュゲートを、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができる。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体ないしイムノコンジュゲートの用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の抗体ないしイムノコンジュゲートの一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2～約20、例えば約6用量の抗体ないしイムノコンジュゲートが投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

【0342】

C. 活性アッセイ

本発明の抗TAHO抗体及びイムノコンジュゲートは、当分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的な性質及び／又は生物活性について特徴付けされうる。

【0343】

1. 活性アッセイ

一態様では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗TAHO抗体ないしそのイムノコンジュゲートを同定するために提供される。生物学的な活性には、例えば、細胞成長又は増殖の阻害能(例えば「細胞殺傷」活性)、又はプログラムされた細胞死(アポトーシス)を含む細胞死誘導能が含まれうる。また、インビボ及び／又はインビトロでのこのような生物学的な活性を有する抗体ないしイムノコンジュゲートが提供される。

ある実施態様では、抗TAHO抗体又はそのイムノコンジュゲートは、インビトロでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のためのあるアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなあるアッセイは、Promega(Madison, WI)から市販されているCellTiter-GloTM発光細胞生存率アッセイである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標であるATPの存在の量に基づいて生細胞数を決定する。Crouch等(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第6602677号を参照。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング(HTS)に用いられるように96-又は384-ウェルフォーマットで行ってもよい。Cree等(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ手順は、単一の試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果、細

胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが生成される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、ATPの存在の量に比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位(RLU)として表す。

【0344】

細胞増殖についての他のアッセイは「MTT」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。Cell Titer-GloTMアッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を表す。例としてMosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63及びZhang 等 (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882を参照。

一態様では、抗TAHO抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施態様では、このようなアッセイは、例えば、プロピジウムヨウ素(PI)、トリパンブルー(Moore等 (1995) Cytotechnology, 17:1-11を参照)、又は7AADの取り込みによって示される膜統合性の喪失を測定する。例示的なPI取り込みアッセイでは、細胞は、10%の熱不活性化FBS(Hyclone)と2mMのL-グルタミンを添加した、ダルベッコ変更イーグル培地(D-MEM):ハムF-12(50:50)中で培養する。したがって、このアッセイは、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で行う。100×20mmのディッシュにディッシュ当たり3×10⁶の密度で細胞を播き、終夜接着させる。培地を取り除き、新鮮な培地のみ、又は様々な濃度の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。細胞を3日間インキュベートする。処置後、単層をPBSにて洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、1200rpmで4℃で5分間遠心して、ペレットを3mlの冷却Ca²⁺結合バッファ(10mM HEPES, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂)に再懸濁し、細胞凝集塊を取り除くために35mmのストレーナーを取り付けた12×75mmチューブ(チューブ当たり1ml、1処理群につき3チューブ)に分注する。次いで、チューブにPI(10μg/ml)を加える。試料は、FACSCANTMフローサイトメーター及びFACSCONVERTTMCellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析される。次いで、PI取り込みによって定まる統計学的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。

【0345】

一態様では、抗TAHO抗体ないしイムノコンジュゲートは、インビトロでのアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの例示的なアッセイはアネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、細胞を培養し、前段落で述べたようにディッシュに播く。培地を取り除き、新鮮培地のみ、又は0.001~10μg/mlの抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。3日間のインキュベート後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、細胞を遠心して、Ca²⁺結合バッファに再懸濁し、前段落で述べたようにチューブに分注する。その後、チューブに標識したアネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1μg/ml)を加える。試料は、FACSCANTMフローサイトメーター及びFACSCONVERTTMCellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析される。次いで、コントロールと比べて統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの他の例示的なアッセイは、ゲノムDNAのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンDNA ELISA比色アッセイである。このアッセイは、例えば細胞死検出ELISAキット(Roche, Palo Alto, CA)を用いて行うことができる。

上記いずれかのインビトロアッセイに用いるための細胞には、天然でTAHOポリペプチドを発現する又はTAHOポリペプチドを発現するように操作された細胞ないしは細胞株が含まれる。このような細胞には、同じ細胞起源の正常細胞と比べてTAHOポリペプ

チドを過剰発現する腫瘍細胞が含まれる。また、このような細胞には、T A H O ポリペプチドを発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にT A H O ポリペプチドを発現しないがT A H O ポリペプチドをコードする核酸を形質移入してある細胞株が含まれる。

【0346】

一態様では、抗T A H O 抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。ある実施態様では、抗T A H O 抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの腫瘍増殖を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインビボモデルシステムが前記の試験のために用いられうる。例示的な異種移植片システムでは、好適に免疫を低下させた非ヒト動物、例えばS C I D マウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは動物に投与される。抗体ないしイムノコンジュゲートの腫瘍増殖を阻害するか又は減少させる能力が測定される。上記の異種移植片システムのある実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者の腫瘍細胞である。このような異種移植片モデルの調製に有用な細胞には、限定するものではないが、B J A B - 1 u c 細胞(ルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入したE B V 陰性バーキットリンパ腫細胞株)、R a m o s 細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、S u D H L - 4 細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、D o H H 2 細胞(Kluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 5:221-224 (1991)、及びKluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 8:1385-1391 (1994)を参照)、G r a n t a - 5 1 9 細胞(Jadaye, D.M.等, Leukemia 11(1):64-72 (1997)を参照)ヒト白血病及びリンパ腫細胞株が含まれる。ある実施態様では、ヒト腫瘍細胞は、皮下注射によって又は哺乳動物の脂肪体などの好適な部位に移植することによって適切に免疫無防備状態にされた非ヒト動物に導入される。

【0347】

2. 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、抗T A H O 抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、ある実施態様では、抗T A H O 抗体は、細胞の表面に発現されるT A H O ポリペプチドに結合する能力について試験される。F A C S アッセイがそのような試験に用いられてもよい。

一態様では、競合アッセイを用いて、T A H O ポリペプチドへの結合について、マウスS N 8 抗体と競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。ある実施態様では、前記の競争する抗体は、マウスM A 7 9 b 抗体、ヒト化M A 7 9 b . v 1 7 抗体及び／又はヒト化M A 7 9 b . v 1 8 及び／又はヒト化M A 7 9 b . v 2 8 及び／又はヒト化M A 7 9 b . v 3 2 が結合する同じエピトープ(例えば線形又は立体のエピトープ)に結合する。例示的な競合アッセイには、限定するものではないが、Harlow及びLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)に挙げられるものなどの常套的アッセイが含まれる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)のMorris (1996) "Epitope Mapping Protocols"に示される。2つの抗体のそれぞれが50%以上他の結合をブロックする場合、これらの抗体は同じエピトープに結合すると言える。

【0348】

例示的な競合アッセイでは、固定されたT A H O ポリペプチドは、T A H O ポリペプチドに結合する第一標識抗体(例えばマウスS N 8 抗体)と、T A H O ポリペプチドへの結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。二次抗体はハイブリドーマ上清に存在してもよい。コントロールとして、固定したT A H O ポリペプチドを第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。T A H O ポリペプチドへの第一抗体の結合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたT A H O ポリペプチドと結合している標識の量を測定する。固定されたT A H O ポリペプチドと結合している標識の量がコントロール試料と比較して試験試料において実質的に減少している場合、二次抗体がT A H O ポリペプチドへの結合について第一抗体と競合していることが示唆される。ある実施態様では、固定されたT A H O ポリペプチドは、細胞の表

面上に、又はその表面上にT A H Oポリペプチドを発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

一態様では、精製した抗T A H O抗体はさらに、限定するものではないが、N末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高压液体クロマトグラフィ(H P L C)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ及びパパイン消化を含む、一連のアッセイによって特徴付けることができる。

【0349】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はA D C Cなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のF c活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び／又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、C D C及び／又はA D C C活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、F cレセプター(F c R)結合アッセイを行って、抗体がF c γ R結合を欠損している(すなわちA D C C活性を欠損していると思われる)が、F c R n結合能は維持していることを確認することができる。A D C Cを仲介する第一細胞であるNK細胞は、F c γ R I I Iのみを発現し、その一方で単核細胞はF c γ R I、F c γ R I I及びF c γ R I I Iを発現する。造血系細胞でのF c R発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のA D C C活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(P B M C)及びナチュラルキラー(N K)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のA D C C活性は、例えばClynes等のPNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、C 1 q結合アッセイを行って、抗体がC 1 qに結合できない、つまりC D C活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載のように、C D Cアッセイを行ってもよい。また、F c R n結合及びインビボクリアランス／半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【0350】

以下の実施例は例示的な目的のみであって、いずれの場合においても本発明の範囲を限定するものではない。

本明細書において引用されるすべての特許及び文献は、出典明記によってそれらの全体がここに援用される。

【実施例】

【0351】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。実施例で使用される抗体は市販されているもので、それらには、限定されないが、抗C D 1 8 0(eBioscience社M R H 7 3-1 1、BD Pharmingen社G 2 8-8及びSerotec社M H R 7 3)、抗C D 2 0(Ancell社2 H 7及びBD Pharmingen社2 H 7)、抗C D 7 2(BD Pharmingen社J 4-1 1 7)、抗C X C R 5(R&D Systems社5 1 5 0 5)、抗C D 2 2(Ancell社R F B 4、DAKO社T o 1 5、Diatec社1 5 7、Sigma社H I B-2 2及びMonosan社B L-B C 3 4)、抗C D 2 2(Leinco社R F B-4及びNeoMarkers社2 2 C 0 4)、抗C D 2 1(A T C C H B-1 3 5及びA T C C H B 5)、抗H L A-D O B(BD Pharmingen社D O B. L 1)、抗C D 7 9 a(Caltag社Z L 7-4及びSerotec社Z L 7-4)、抗C D 7 9 b(Biomed社S N 8及びBD Pharmingen社C B-3)、抗C D 1 9(Biomed社C B-1 9)、抗F C E R 2(Ancell社B U 3 8及びSerotec社D 3. 6及びBD Pharmingen社M-L 2 3 3)が含まれる。A T C C受託番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0352】

実施例 1：マイクロアレイを用いた T A H O 発現のデータ分析

マイクロアレイを用いたデータでは、組織及び培養細胞から採取した幅広い種類の R N A 試料に D N A マイクロアレイ分析を実施することにより、T A H O 発現の分析を行う。試料は、静止状態と、外部から刺激を加えた直後両方の、正常及び癌性のヒト組織及び様々な精製済み免疫細胞を含む。これら R N A 試料は、Agilent社のマイクロアレイを用いる標準的マイクロアレイプロトコルに従って分析することができる。

本実施例では、R N A を細胞から単離し、Agilent低出力 R N A 蛍光線形増幅キット (Agilent社) を用いたインビトロ転写により、シアニン 3 及びシアニン 5 標識した c R N A プローブを生成した。P R O ポリペプチド発現の試験対象となる、骨髄腫及びプラズマ細胞等の試料を、シアニン 5 を使用して標識し、試験試料の発現と比較するための汎用基準 (Stratagene社の細胞株プール) をシアニン 3 を用いて標識した。0. 1 μ g ~ 0. 2 m g の、シアニン 3 及びシアニン 5 で標識した c R N A プローブを、インサイツハイブリダイゼーションキット P l u s (Agilent) を用いてAgilent社の 6 0 塩基長オリゴヌクレオチドアレイチップにハイブリダイズした。これらのプローブをマイクロアレイにハイブリダイズした。多発性骨髄腫の分析のため、標準Agilent社推奨条件及びバッファー (Agilent) を用いて、Agilent社の全ヒトゲノムオリゴヌクレオチドマイクロアレイにプローブをハイブリダイズした。

【 0 3 5 3 】

4 R P M のハイブリダイゼーションローテータセット上で、c R N A プローブを 6 0 $^{\circ}$ C で 1 7 時間に亘りマイクロアレイにハイブリダイズする。洗浄後、シアニン 3 及びシアニン 5 蛍光分子 (5 3 2 及び 6 3 3 n m レーザ線) を励起して検出することができるAgilent社のマイクロアレイスキャナを用いて、マイクロアレイをスキャンした。特徴の認識、背景のサブトラクション及び標準化を行うAgilent社の特徴抽出ソフトウェアを用いて、スキャンされたマイクロアレイ画像から 6 0 塩基長オリゴヌクレオチドアレイにおける各遺伝子のデータを抽出し、結果として得られたデータを、Rosetta社のResolver遺伝子発現データ分析システム (Rosetta Inpharmatics, Inc.) として知られるソフトウェアパッケージにロードした。Rosetta Resolverは、強度又は割合で示す大量の遺伝子発現データの保存、検索及び分析を行うための多数の分析ツール及び関連データベースを含んでいる。

本実施例では、マイクロアレイを用いた分析のために B 細胞及び T 細胞 (コントロール) を取得した。ナイーブ B 細胞及び記憶 B 細胞、並びにプラズマ細胞を単離するため、4 人の健常な男性ドナーから提供されたleukopak又は複数の健常なドナーの全血からヒト抹消血単核細胞 (P B M C) を分離した。M A C S (Miltenyi Biotec) 磁性細胞選別システム及び抗 C D 1 3 8 ビーズを用いて C D 1 3 8 + プラズマ細胞を P B M C から単離した。別法として、抗 C D 1 9 ビーズ及び M A C S 選別を用いて全 C D 1 9 + B 細胞を選別した。C D 1 9 + (純度約 9 0 %) の濃縮後、F A C S (Moflo) 選別を行って、ナイーブ B 細胞と記憶 B 細胞を分離した。試料を遠心分離することにより、選別した細胞を回収した。選別した細胞を直ちに L T R バッファー中で溶解し、QIASHredder (Qiagen) のスピニングカラムを用いて均一化し、RNeasyミニキットにより R N A を精製した。R N A の収率は 0. 4 ~ 1 0 μ g であり、それは細胞数に依存していた。

【 0 3 5 4 】

コントロールとして、マイクロアレイ分析のために T 細胞を単離した。Stem Cell Technologies社の C D 8 細胞単離キット (Rosette Separation) を用いた陰性選別により白血球層から抹消血 C D 8 細胞を単離し、C D 8 細胞単離キットを用いた M A C S 磁性細胞選別システムにより更に精製し、C D 4 5 R O 細胞 (Miltenyi Biotec) を除去するために C D 4 5 R O マイクロビーズを添加した。C D 8 T 細胞を 3 つの試料に分割し、各試料に対し次のような刺激、即ち、(1) 抗 C D 3 及び抗 C D 2 8、並びに I L - 1 2 及び抗 I L 4 抗体、(2) サイトカイン又は中和抗体を加えない抗 C D 3 及び抗 C D 2 9、及び(3) 抗 C D 3 及び抗 C D 2 8、並びに I L - 4、I L 1 2 抗体及び抗 I F N - γ 抗体を与えた。刺激から 4 8 時間後、R N A を回収した。7 2 時間後、新鮮な培地で 8 倍に希釈

することにより細胞を拡大させた。RNAを回収してから7日後、CD8細胞を回収、洗浄し、抗CD3及び抗CD28で再度刺激した。16時間後、RNAの2回目の回収を行った。再刺激の48時間後、RNAの3回目の回収を行った。RNAは、マニュアルの指示に従ってQiagen Midi prepsを用いて、1回目のRW1洗浄ステップの後でオンカラムDNAse I消化を加えて回収した。RNAseを含まない水にRNAを溶出し、その後エタノール沈降により濃縮した。ヌクレアーゼを含まない水に沈降させたRNAを採り、最終的な最小濃度を0.5 µg/µlにした。

CD4+ TヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球（N'phil）、CD14+、CD16+及びCD16-単球及び樹状細胞（DC）から単離したRNAに対し、追加的コントロールマイクロアレイを行った。

10

【0355】

加えて、非ホジキンリンパ腫（NHL）、濾胞性リンパ腫（FL）及び多発性骨髄腫（MM）等の癌性組織から単離したRNAに対し、マイクロアレイを行った。更に、正常細胞、例えば正常なリンパ節（NLN）、正常B細胞、例えば中心芽細胞、中心細胞及び濾胞性マントル由来のB細胞、記憶B細胞、並びに正常プラズマ細胞から単離したRNAに対してマイクロアレイを実施した。これらの細胞はB細胞系由来であり、扁桃腺プラズマ細胞、骨髄プラズマ細胞（BM PC）、CD19+プラズマ細胞（CD19+ PC）、CD19-プラズマ細胞（CD19- PC）等の、骨髄腫細胞の正常な対応物である。更に、小脳、心臓、前立腺、副腎、膀胱、小腸、大腸、胎児肝臓、子宮、腎臓、胎盤、胚、膵臓、筋肉、脳、唾液腺、骨髄（髄）、血液、胸腺、扁桃腺、脾臓、精巣、及び乳腺等の正常組織に対し、マイクロアレイを実施した。

20

非B細胞と比べてB細胞に有意に発現するものとして下記に列挙する分子が同定された。特に、これら分子は、非B細胞、例えばT細胞と比較した場合、ナイーブなB細胞、IgG A+又はIgM+である記憶B細胞、及びPBMC又は骨髄由来のプラズマ細胞に異なって発現した。従って、これら分子は、哺乳動物の腫瘍の治療の良好な標的となる。

【0356】

分子	特異的発現位置	比較対象
DNA105250 (TAHO1)	B細胞	非B細胞
DNA150004 (TAHO2)	B細胞	非B細胞

【0357】

要約

図14～15では、mRNAの有意な発現は、2より大きな割合の値として示した（図14～15の縦軸）。図14～15では、前立腺、脾臓などの非B細胞における見かけ上の発現は全て、人為的結果、リンパ球による正常組織の浸潤又はベンダーによる試料統一性の欠如を表すと考えられる。

（1）TAHO4（ここではCD79aとも呼ぶ）は、非ホジキンリンパ腫（NHL）多発性骨髄腫（MM）試料及び小脳及び正常血液正常に有意に発現した（図14）。しかしながら、上述のように、前立腺、脾臓、血液、扁桃腺等の非B細胞における見かけ上の発現は、いずれも人為的結果、リンパ球による正常組織の浸潤又はベンダーによる試料統一性の欠如を示すものと考えられる。

40

（2）TAHO5（ここではヒトCD79bとも呼ぶ）は、非ホジキンリンパ腫（NHL）に有意に発現した（図15）。

TAHO4及びTAHO5は、マイクロアレイ分析による検出を行った結果、非B細胞と比較して、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫及び多発性骨髄腫等のB細胞関連疾患由来の試料に有意に発現することが同定されたので、これら分子は、リンパ腫、白血病、骨髄腫及びその他造血細胞の癌等のB細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍の治療の良好な標的である。

【0358】

実施例2：TAHO mRNA発現の定量分析

このアッセイでは、5'ヌクレアーゼアッセイ（例えば、TaqMan（登録商標））及びリ

50

リアルタイム定量PCR（例えば、Mx3000P（登録商標）Real-Time PCRシステム（Stratagene, La Jolla, CA））を、他の一次白血球タイプ等の異なる細胞タイプと比較して、B細胞等の特定の組織型に有意に過剰発現し、更には特定の組織型の非癌性細胞と比較して特定の組織型の癌性細胞に過剰発現する遺伝子を見出すために使用した。5'ヌクレアーゼアッセイ反応は、Taq DNAポリメラーゼ酵素の5'エキソヌクレアーゼ活性を利用してリアルタイムでの遺伝子発現をモニターする蛍光PCR-ベース技術である。2つのオリゴヌクレオチドプライマー（その配列は、対象である遺伝子又はEST配列に基づく）を、PCR反応で典型的な単位複製配列を生成するために使用する。三番目のオリゴヌクレオチド、又はプローブを、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計する。このプローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長可能ではなく、レポーター蛍光色素及びクエンチャー 蛍光色素で標識する。レポーター色素からのどんなレーザー誘導放射も、プローブ上で2つの色素が近接して位置する場合には、消光色素によって消光する。PCR増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存的にプローブを切断する。この結果生じるプローブ断片は溶液中で分離し、放出レポーター色素からの信号は、二番目の蛍光物質の消光効果とは無関係である。レポーター色素の1つの分子は、各新規合成分子のために遊離され、非消光レポーター色素の検出によって、データの定量的解釈に関する根拠が提供される。

5'ヌクレアーゼ手法は、Mx3000P（登録商標）Real-Time PCRシステムのようなリアルタイム定量PCR装置で行われる。このシステムは、サーモサイクラー、石英タングステンランプ、検出用の光電子増倍管（PMT）及びコンピューターで構成される。このシステムでは、サーモサイクラー上の96-ウェルフォーマットで試料を増幅する。増幅の間、レーザー誘導蛍光信号が、すべての96ウェルの光ファイバー計測ケーブルを介してリアルタイムで集められ、CCDで検出される。このシステムには、装置を作動するため、そしてデータを分析するためのソフトウェアが含まれる。スクリーニングのための出発材料は、種々の異なる白血球タイプ（Neutrophil (Neutr)、ナチュラルキラー細胞（NK）、樹状細胞（Dend.）、単球（Mono）、T細胞（CD4+及びCD8+サブセット）、幹細胞（CD34+）、から単離したmRNA（50 ng/ウェル、ラン、2通り）、並びに、ドナー多様性を試験するための、20の別々のB細胞ドナー（ドナーID：310、330、357、362、597、635、816、1012、1013、1020、1072、1074、1075、1076、1077、1086、1096、1098、1109、1112）であった。全てのRNAは購入したものであり（AllCells, LLC, Berkeley, CA）、それぞれの濃度は受領時に正確に測定した。このmRNAは、例えば蛍光定量的に、正確に定量化される。

【0359】

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初にCt、又は閾値サイクルとして表される。これは、レポーター信号が蛍光のバックグラウンドレベルを超えて蓄積するサイクルとして定義される。 ΔCt 値は、核酸試料中の特定の標識配列の開始コピーの相対数の定量的測定として用いられる。1Ct単位は、1PCRサイクル、又は標準に対しておよそ2倍の相対増加に一致し、2単位は、4倍相対増加に一致し、3単位は8倍相対増加に一致する等々であり、2つ以上の異なる組織間のmRNA発現の相対倍数増加を定量的に測定できる。試料中のCt値が低い程、その特定遺伝子の開始コピー数は多い。検量線がアッセイに含まれている場合、各標的の相対的な量は推定可能であり、コピー数が多いと、それに比例して量も多いというようにデータを見ることができ（コピー数が多いと反対にCt値は低い）、標準化された1Ctは2倍の増加に等しいという規則に変化があるとそれを矯正する。この技術を用いて、下に列挙した分子が、特定の組織又は細胞のタイプ（同一及び異なるドナー由来）と比較して特定の組織又は細胞タイプの単一（又は限られた数）で有意に（2倍以上）過剰発現していることが同定されており、その一部はまた、特定組織又は細胞タイプの正常細胞と比較したとき、癌性細胞に有意に（すなわち2倍以上）過剰発現していることが同定されているので、哺乳動物における癌の治療にとって優れたポリペプチド標的を表す。

分子	特異的発現が見られる腫瘍	比較対象
DNA 2 2 5 7 8 5 (TAHO 4)	B細胞	非B細胞
DNA 2 2 5 7 8 6 (TAHO 5)	B細胞／CD 3 4 + 細胞	非B細胞

【0360】

要約

精製されたB細胞又は20B細胞ドナー(310-1112)(AllCells)由来のB細胞から単離された総RNAにおけるTAHO 4及びTAHO 5の発現レベル、及び平均化したもの(Avg.B)は、それぞれ複数の白血球タイプ、好中球(Neutr)、ナチュラルキラー細胞(NK)(T細胞サブセット)、樹状細胞(Dend)、単球(Mono)、CD 4 + T細胞、CD 8 + T細胞、CD 3 4 + 幹細胞(データは示さない)から単離した総RNAにおけるTAHO 4及びTAHO 5の発現レベルと比較して有意に高かった。

従って、TaqMan分析により検出したところ、TAHO 4及びTAHO 5が、非B細胞と比較してB細胞に有意に発現したことから、これらの分子は、B細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍、例えばリンパ腫(つまり非ホジキンリンパ腫)、白血病(つまり慢性リンパ性白血病)、骨髓腫(つまり多発性骨髓腫)及びその他造血細胞癌の治療の良好な標的である。

【0361】

実施例3：インサイツハイブリダイゼーション

インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と局在化、特定のmRNA合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコルの最適化バージョンに従って、PCR生成³³P-標識リボプローブを用いて実施される。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK(20g/ml)で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリダイゼーションする。(33-P)UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55℃で終夜ハイブリダイゼーションする。スライドをKodak NTB2核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。

³³P-リボプローブ合成

6.0 µl (125 mCi) の³³P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) をスピード真空乾燥させた。乾燥³³P-UTPを含む各管に以下の成分を添加した：

2.0 µl の5x転写バッファー

1.0 µl のDTT (100 mM)

2.0 µl のNTP混合物(2.5 mM: 各10 µl の10 mM GTP, CTP及びATP + 10 µl のH₂O)

1.0 µl のUTP (50 µM)

1.0 µl のRNasin

1.0 µl のDNAテンプレート (1 µg)

1.0 µl のH₂O

1.0 µl のRNAポリメラーゼ (PCR産物についてT3=AS, T7=S, 通常)

管を37℃で1時間インキュベートし、1.0 µl のRQ1 DNaseを添加し、ついで37℃で15分間インキュベートした。90 µl のTE (10 mM トリス pH 7.6 / 1 mM のEDTA pH 8.0) を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50限外濾過ユニットに充填し、プログラム10を用いてスピンさせた(6分間)。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンさせた(3分間)。最終回収スピンの後、100 µl のTEを添加した。1 µl の最終生成物をDE81紙にピペットし6 ml のBIOFLUOR IIで数えた。

プローブをTBE/尿素ゲル上で走らせた。1-3 µl のプローブ又は5 µl のRNA

Mrk I I I を $3 \mu\text{l}$ のローディングバッファーに添加した。加熱ブロック上で 95°C に 3 分間加熱した後、プローブを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルを流し、試料を充填し、 $180-250$ ボルトで 45 分間走らせた。ゲルをサララップでラップし、 -70°C 冷凍機内で補強スクリーンを持つ XAR フィルムに 1 時間から終夜露出した。

【0362】

³²P-ハイブリダイゼーション

A. 凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で 5 分間解凍した。トレイを 55°C のインキュベータに 5 分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において 4% パラホルムアルデヒド中で 10 分間固定し、 $0.5 \times \text{SSC}$ で 5 分間室温で洗浄した ($25 \text{ ml } 20 \times \text{SSC} + 975 \text{ ml } \text{SQ H}_2\text{O}$)。 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼ中、 37°C で 10 分間の脱タンパクの後 (250 ml の予備加熱 RNase 無し RNase バッファー中の $10 \text{ mg}/\text{ml}$ ストック $12.5 \mu\text{l}$)、切片を $0.5 \times \text{SSC}$ で 10 分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100% エタノール中、各 2 分間脱水した。

B. パラフィン包埋切片の前処理：

スライドを脱パラフィンし、 $\text{SQ H}_2\text{O}$ 中に配置し、 $2 \times \text{SSC}$ で室温において各々 5 分間 2 回リンスした。切片を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼ K (250 ml の RNase 無し RNase バッファー中 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ を $500 \mu\text{l}$; 37°C 、15 分間) - ヒト胚又は $8 \times$ プロテイナーゼ K (250 ml の RNase バッファー中 $100 \mu\text{l}$ 、 37°C 、30 分間) - ホルマリン組織で脱タンパクした。続く $0.5 \times \text{SSC}$ でのリンス及び脱水は上記のように実施した。

C. プレハイブリッド化：

スライドを Box バッファー ($4 \times \text{SSC}$ 、50% ホルムアミド) - 飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。

D. ハイブリダイゼーション：

スライド当たり $1.0 \times 106 \text{ cpm}$ のプローブ及び $1.0 \mu\text{l}$ の tRNA ($50 \text{ mg}/\text{ml}$ ストック) を 95°C で 3 分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり $48 \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーションバッファーを添加した。ボルテックスの後、 $50 \mu\text{l}$ の 33P 混合物をスライド上のプレハイブリダイゼーション $50 \mu\text{l}$ に添加した。スライドを 55°C で終夜インキュベートした。

E. 洗浄：

洗浄は、 2×10 分間、 $2 \times \text{SSC}$ 、EDTA で室温で実施し (400 ml の $20 \times \text{SSC} + 16 \text{ ml}$ の 0.25 M EDTA 、 $V_f = 4 \text{ L}$)、次いで RNase A 処理を 37°C で 30 分間行った (250 ml RNase バッファー中 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ を $500 \mu\text{l} = 20 \mu\text{g}/\text{ml}$)。スライドを 2×10 分間、 $2 \times \text{SSC EDTA}$ で室温において洗浄した。ストリンジェントな洗浄条件は次の通り： 55°C で 2 時間、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、EDTA (20 ml の $20 \times \text{SSC} + 16 \text{ ml}$ の EDTA、 $V_f = 4 \text{ L}$)。

【0363】

F. オリゴヌクレオチド

ここに開示した様々な DNA 配列についてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは添付図に示した核酸 (又はその相補鎖) に相補的であるように得られた。

(1) DNA 225785 (TAHO4)

p1 5'-GGGCACCAAGAACCGAATCAT-3' (配列番号 14)

p2 5'-CCTAGAGGCAGCGATTAAGGG-3' (配列番号 15)

G. 結果

ここに開示した様々な DNA 配列についてインサイツ分析を実施した。これらの分析からの結果は次の通りである：

(1) DNA 225785 (TAHO4)

リンパ細胞に発現が観察された。特に、正常組織では、脾臓及びリンパ節に発現が観察され、それは胚中心、マントル、及び周辺帯といったB細胞領域と一致していた。また、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、拡散性大細胞リンパ腫、小リンパ球リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含む様々な悪性リンパ腫の組織切片に有意な発現が観察された。このデータは、造血性腫瘍、特にB細胞腫瘍におけるこの分子の潜在的役割と一貫性を持つ。

【0364】

実施例4：TAHOのハイブリダイゼーションプローブとしての使用

以下の方法は、TAHOをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとして、すなわち哺乳類におけるTAHOの存在を検出するための使用を記載する。

ここに開示した完全長又は成熟TAHOのコード化配列を含んでなるDNAを、ヒト組織cDNAライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同的なDNA（例えば、TAHOの天然に生じる変異体をコードするもの）のスクリーニングのためのプローブとしてもまた用いられる。

いずれかのライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高ストリンジェント条件で実施した。放射標識TAHO誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハルト溶液、及び10%硫酸デキストランの溶液中で、42℃において20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%SDSの水溶液中、42℃で行った。

ついで、完全長天然配列TAHOをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0365】

実施例5：大腸菌中でのTAHOの発現

この実施例は、大腸菌中での組換え発現によるTAHOの非グリコシル化形態の調製を例証する。

TAHOをコードするDNA配列は、選択されたPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322（大腸菌由来のもの；Bolivar等，Gene，2:95（1977）参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸化される。PCR増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリ-Hisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリ-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、TAHOコードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びargU遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、ついで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いて選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのLBプレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドDNAが単離され、制限分析及びDNA配列で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したLBブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を所望の光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

さらに数時間の細胞培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化TAHOTANパク質を、タンパク質が強く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【0366】

以下の手法を用いて、ポリ-His（ポリ-ヒス）タグ形態でTAHOを大腸菌で発現させてもよい。TAHOをコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレート化カラムでの迅速な精製、及びエンテ

ロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅された、ポリ-Hisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30℃で振盪しながら3-5のO.D. 600に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地(3.57 gの(NH₄)₂SO₄、0.71 gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07 gのKCl、5.36 gのDifco酵母抽出物、500 mL水中の5.36 gのShefield hycase SF、並びに110 mMのMPOS、pH 7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7 mMのMgSO₄の混合で調製)中に50-100倍希釈し、30℃で振盪させながら約20-30時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGE分析により発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及びリフォールディングまで凍結させた。

10

0.5から1 Lの発酵(6-10 gペレット)からの大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 8 バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1 M及び0.02 Mとし、溶液を4℃で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000 rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー(6 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5 mLのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに充填した。カラムを50 mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH 7.4で洗浄した。タンパク質を250 mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280 nmにおけるその吸収により見積もった。

20

【0367】

試料を、20 mMのトリス、pH 8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4℃で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを最終濃度0.4% (約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファーと10-80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分の一定分量をSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最も緻密であり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

30

40

所望の折り畳みTAHOポリペプチドを含有する画分をプールし、弱い窒素流を溶液に向けながらアセトニトリルを除去した。透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8にタンパク質を調製した。

ここで記載されるTAHOポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。

50

【0368】

実施例6：哺乳動物細胞中でのT A H Oの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるT A H Oの潜在的なグリコシル化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてp R K 5（1989年3月15日発行のE P 3 0 7 2 4 7を参照のこと）を用いた。場合によっては、T A H O D N Aを選択した制限酵素を持つp R K 5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてT A H O D N Aを挿入させる。得られたベクターは、各々p R K 5-T A H Oと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞（ATCC CCL 1573）は、ウシ胎児血清及び場合によっては栄養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 μ gのp R K 5-T A H O D N Aを、V A R N A遺伝子をコードする約1 μ gのD N Aと混合し[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]、500 μ lの1mM トリス-HCl、0.1mMEDTA、0.227M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、500 μ lの50mM HEPES (pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を滴下添加し、25℃で10分間沈殿物を形成させた。沈殿物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地（単独）又は200 μ Ci/ml ³⁵S-システイン及び200 μ Ci/ml ³⁵S-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、T A H Oポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【0369】

これに換わる技術において、T A H Oは、Somparyrac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載された硫酸デキストラン法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのp R K 5-T A H O D N Aを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。D N A-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたT A H Oを含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、T A H OをCHO細胞で発現させることができる。p R K 5-T A H Oは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。T A H Oポリペプチドの存在を判定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたT A H Oを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

【0370】

また、エピトープタグT A H Oは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。T A H Oは、p R K 5ベクターからサブクロニングした。サブクローン挿入物は、ついで、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-H i s タグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-H i s タグT A H O挿入物は、ついで、安定なク

ローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-HisタグTAHOを含む培養培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

また、TAHOは、一過性発現法によって、CHO及び／又はCOS細胞中で、あるいは他の安定な発現法によってCHO細胞中で発現させることもできる。

CHO細胞における安定な発現は、以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含むIgG1定常領域配列に融合したIgG作成物（イムノアドヘシン）及び／又はポリ-Hisタグ形態として発現する。

PCR増幅に続いて、それぞれのDNAを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化(Shuttling)ができるように作製される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター／エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を用いて約一千万のCHO細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【0371】

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地（0.2μm濾過PS20、5%の0.2μm透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mLスピナーに分けた。1-2日後、細胞を150mLの選択成長培地を満たした250mLスピナーに移し、37℃でインキュベートした。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5122469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とpHを測定した。1日目に、スピナーをサンプリングし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプリングし、温度を33℃に変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤（例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）の30mLとした。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22μmフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes、pH7.4バッファーで平衡化した6mLのNi-NTAカラムに4-5mL/分の流速で4℃においてポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトール

ル、pH 6.8を含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム (Pharmacia) にポンプ供給した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275μLの1Mトリスバッファー、pH 9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-His タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はSDS ポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン (Edman) 分解によりN末端アミノ酸配列決定した。

ここに開示されるTAHOポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。

【0372】

実施例7：酵母中でのTAHOの発現

以下の方法は、酵母中でのTAHOの組換え発現を記述する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのTAHOの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。TAHOをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してTAHOの細胞内発現を指示する。分泌のために、TAHOをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然TAHOシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又は転化酵素分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば) TAHOの発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えTAHOは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。TAHOを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示されるTAHOポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。

【0373】

実施例8：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのTAHOの発現

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

TAHOをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-His タグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域など) を含む。pVL1393 (Navagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単に述べると、TAHOコード化配列、又はTAHOのコード化配列の所望する部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGoldTMウイルスDNA (Pharmlingen) を、Spodoptera frugiperda (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRLから市販) を用いて同時形質移入することにより作成

10

20

30

40

50

される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【0374】

次に、発現されたポリ-HisタグTAHOは、例えばNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等, Nature, 362: 175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mMのHepes、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mMのEDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清をローディングバッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLのローディングバッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点であるA280のベースラインまでローディングバッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄した。A280のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開した。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi²⁺-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis10-タグTAHOを含む画分をプールしてローディングバッファーで透析した。

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

ここに開示されるTAHOポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。

【0375】

実施例9: TAHOに結合する抗体の調製

この実施例は、TAHOに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。使用することができる免疫原には、精製TAHO、TAHOを含む融合タンパク質、及び細胞表面上に組換えTAHOを発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したTAHO免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMP-L-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗TAHO抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、免疫原の静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに

蒔き、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、免疫原に対する反応性についてのE L I S Aでスクリーニングされる。抗原に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のB a l b / cマウスに腹腔内注入し、抗免疫原モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

この技術を用いて、本明細書に記載したT A H Oポリペプチドの一部を目的とする抗体を成功裏に生成することができる。より具体的には、T A H Oタンパク質のヒト及びカニクイザル形態を含む、T A H Oタンパク質を認識してそれに結合できる（標準E L I S A、F A C S分析及び／又は免疫組織学的分析により測定）機能的モノクローナル抗体を、本明細書に記載する以下のT A H Oタンパク質のヒト及びカニクイザル形態を含む、T A H Oタンパク質、即ち、T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）（D N A 2 2 5 7 8 5）、T A H O 5（ヒトC D 7 9 b）（D N A 2 2 5 7 8 6）、T A H O 3 9（c y n o C D 7 9 a）（D N A 5 4 8 4 5 4）及びT A H O 4 0（c y n o C D 7 9 b）（D N A 5 4 8 4 5 5）に対して成功裏に生成できる。

本明細書に開示するT A H Oポリペプチドのヒト及びカニクイザル形態を含むT A H Oポリペプチドを目的とするモノクローナル抗体の調製に加えて、（インビトロ及びインビボの両方で）対象のT A H Oポリペプチドを発現する細胞（又は組織）へ細胞毒素を方向付けるのに使用される細胞毒素に、多数のモノクローナル抗体を成功裏に抱合することができる。例えば、毒素（例えばD M 1）誘導体化モノクローナル抗体は、以下のT A H Oポリペプチド、即ち、T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）（D N A 2 2 5 7 8 5）、T A H O 5（ヒトC D 7 9 b）（D N A 2 2 6 7 8 6）、T A H O 3 9（c y n o C D 7 9 a）（D N A 5 4 8 4 5 4）及びT A H O 4 0（c y n o C D 7 9 b）（D N A 5 4 8 4 5 5）に対して成功裏に生成することができる。

C D 7 9 a / C D 7 9 b（T A H O 4、T A H O 5）に対するモノクローナル抗体の生成

C H O細胞へのF c又はH i sでタグを付けたヒトC D 7 9 a、ヒトC D 7 9 b又はカニクイザルC D 7 9 bの細胞外ドメイン（E C D）を発現するベクターを過渡的に形質移入することにより、マウスの免疫化用のタンパク質を生成した。形質移入した細胞の上清からニッケルカラムにてタンパク質を精製し、タンパク質の同一性をN末端配列決定により確認した。

C D 7 9 a（ヒト）抗体については、10のB a l b / cマウス（C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s / H o l l i s t e r, C A）を、ヒトC D 7 9 aの組み換えF cタグ化E D Cを用いて過剰免疫化した。C D 7 9 b（ヒト）抗体については、10のB a l b / cマウス（C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s / H o l l i s t e r, C A）を、ヒトC D 7 9 aの組み換えF cタグ化E D Cを用いて過剰免疫化した。C D 7 9 b（カニクイザル）抗体については、R i b i アジュバント（R i b i I m m u n o c h e m R e s e a r c h, I n c. / H a m i l t o n, M O）中において、カニクイザルC D 7 9 bタンパク質の、組換えF cタグ化E C Dを用いて過剰免疫化した。

ヒトC D 7 9 a抗体については、直接的E L I S AでヒトC D 7 9 a免疫原に対して強い抗体力価を示すマウス由来のB細胞、及びR a j i細胞（C D 7 9 - B細胞株）に対しR a m o s細胞（C D 7 9 陽性B細胞株）に特異的に結合するB細胞を、前述（Hongo, J .S. et al., Hybridoma, 14:253-260(1995); Kohler, G. et al., Nature, 256:495-497(1975); Freud, Y. R. et al., J. Immunol., 129:2826-2830(1982))の通り、マウス骨髓腫細胞（X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション / Rockville, MD）に融合した。ヒトC D 7 9 b抗体については、直接的E L I S AでヒトC D 7 9 b免疫原に対して強い抗体力価を示すマウス由来のB細胞、及びR a m o s細胞

に特異的に結合するB細胞を、前述 (Hongo, J.S. et al., Hybridoma, 14:253-260(1995); Kohler, G. et al., Nature, 256:495-497(1975); Freud, Y. R. et al., J. Immunol., 129:2826-2830(1982))の通り、マウス骨髓腫細胞 (X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション/Rockville, MD) に融合した。カニクイザルC D 7 9 b抗体については、直接的E L I S AでカニクイザルC D 7 9 b免疫原に対して強い抗体力価を示すマウス由来のB細胞、及びカニクイザルの末梢血液単核細胞(P B M C)に特異的に結合するB細胞集団を、前述 (Hongo, J.S. et al., Hybridoma, 14:253-260(1995); Kohler, G. et al., Nature, 256:495-497(1975); Freud, Y. R. et al., J. Immunol., 129:2826-2830(1982))の通り、マウス骨髓腫細胞 (X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション/Rockville, MD) に融合した。

ヒトC D 7 9 a、ヒトC D 7 9 b及びカニクイザルC D 7 9 bについては、10～12日後に、上清を回収し、直接E L I S AとF A C Sによって抗体産生を検査した。2回のサブクロニングの後、最も高い免疫結合を示すクローンを、ヒトC D 7 9 a、ヒトC D 7 9 b又はカニクイザルC D 7 9 b特異性及び交差反応性の更なる特徴付けのために、播種して培養した。各々のハイブリドーマ系統から回収した上清は、既に開示されているもの(上掲のHongo et al.)に類似の変更プロトコールを用いて、親和性クロマトグラフィ(ファルマシア高速タンパク質液体クロマトグラフィ(Pharmacia, Uppsala, Sweden)(FPLC))によって、前述 (Hongo, J.S. et al., Hybridoma, 14:253-260(1995); Kohler, G. et al., Nature, 256:495-497(1975); Freud, Y. R. et al., J. Immunol., 129:2826-2830(1982))の通り、精製した。次いで、精製された抗体調製物をフィルター滅菌し(0.2-μm細孔径; Nalgene, Rochester NY)、リン酸緩衝食塩水(P B S)中で4℃に保存した。

(標準E L I S A、F A C S選別分析及び／又は免疫組織化学分析により測定した場合) T A H Oタンパク質を認識し、T A H Oタンパク質に結合可能なモノクローナル抗体が、ヒトT A H O 4 (C D 7 9 a)に対して成功裏に生成し、抗ヒトC D 7 9 a-8 H 9 (ここでは、「8 H 9」又は「8 H 9 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 1 9 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体8 H 9 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-5 C 3 (ここでは、「5 C 3」又は「5 C 3 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 1 8 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体5 C 3 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-5 C 3 (ここでは、「5 C 3」又は「5 C 3 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 1 8 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体5 C 3 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-7 H 7 (ここでは、「7 H 7」又は「7 H 7 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 1 7 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体7 H 7 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-8 D 1 1 (ここでは、「8 D 1 1」又は「8 D 1 1 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 2 2 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体8 D 1 1 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-1 5 E 4 (ここでは、「1 5 E 4」又は「1 5 E 4 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 2 1 (抗ヒトD 7 9 1マウスモノクローナル抗体1 5 E 4 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託され、抗ヒトC D 7 9 a-1 6 C 1 1 (ここでは、「1 6 C 1 1」又は「1 6 C 1 1 . 1 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 2 0 (抗ヒトC D 7 9 aマウスモノクローナル抗体1 6 C 1 1 . 1 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託された。

(標準E L I S A、F A C S選別分析及び／又は免疫組織化学分析により測定した場合) T A H Oタンパク質を認識し、T A H Oタンパク質に結合可能なモノクローナル抗体が、ヒトT A H O 5 (ヒトC D 7 9 b)に対して成功裏に生成し、抗ヒトC D 7 9 a-2 F 2 (ここでは、「2 F 2」又は「2 F 2 . 2 0 . 1」と呼ぶ)と命名され、A T C C番号P T A-7 7 1 2 (抗ヒトC D 7 9 b 2 F 2 . 2 0 . 1)として2006年7月11日にA T C Cに寄託された。

10

20

30

40

50

(標準ELISA、FACS選別分析及び／又は免疫組織化学分析により測定した場合)TAHOタンパク質を認識し、TAHOタンパク質に結合可能なモノクローナル抗体が、カニクイザルTAHO40(CD79b)に対して成功裏に生成し、抗カニクイザルCD79b-3H3(ここでは、「3H3」又は「3H3.1.1」と呼ぶ)と命名され、ATCC番号PTA-7714(抗カニクイザルCD79b3H3.1.1)として2006年7月11日にATCCに寄託され、抗カニクイザルCD79b-8D3(ここでは、「8D3」又は「8D3.7.1」と呼ぶ)と命名され、ATCC番号PTA-7716(抗カニクイザルCD79b8D3.7.1)として2006年7月11日にATCCに寄託され、抗カニクイザルCD79b-9H11(ここでは、「9H11」又は「9H11.3.1」と呼ぶ)と命名され、ATCC番号PTA-7713(抗カニクイザルCD79b9H11.3.1)として2006年7月11日にATCCに寄託され、抗カニクイザルCD79b-10D10(ここでは、「10D10」又は「10D10.3」と呼ぶ)と命名され、ATCC番号PTA-7715(抗カニクイザルCD79b10D10.3)として2006年7月11日にATCCに寄託された。

キメラ抗ヒトCD79b(TAHO5)抗体(chSN8)の作製及びシーケンシング

キメラSN8IgG1の作製のために、Qiagen RNeasy Mini Kit(カタログ番号74104)及び製造元提供のプロトコルを使用して、全長RNAをRoswell Park Cancer Institute(Okazaki et al., Blood, 81(1): 84-95 (1993))から得られたSN8ハイブリドーマ細胞から抽出した。SN8モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の得られたN末端アミノ酸配列を使用して、それぞれの鎖に特異的なPCRプライマーを設計した。RT-PCRのリバースプライマーは、N末端配列に対応する遺伝子ファミリーのフレームワーク4に適合するように設計された。プライマーはまたクローニングのために所望の制限部位を添加するために設計された。軽鎖については、これらは、N末端のEcoRVとフレームワーク4の3'末端のRsrIIであった。重鎖については、添加した部位は、N末端のPvuIIとVH-CH1ジャンクションのわずかに下流のApaIであった。プライマーは以下の通りである。

CA1807. SNlight (SN8軽鎖フォワードプライマー):

5'-GGAGTACATTTCAGATATCGTGTGCTGACCCAAATCTTCCA
GCTTCTTTTGGCT-3' (配列番号: 28)

CA1808. SNlightrev (SN8軽鎖リバースプライマー):

5'-GGTGCAAGCCACGGTCCGTTTGTATTTCAGCTTGGTGC
CCTCCACC-3' (配列番号: 29)

CA1755. HF (SN8重鎖フォワードプライマー):

5'-GCAACTGGAGTACATTTCACAGGTCCAGCTGCAGCAG
TCTGGGGC-3' (配列番号: 30)

CA1756. HR (SN8重鎖リバースプライマー):

5'-GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGT
GACTGAGGTTCC-3' (配列番号: 31)

軽鎖及び重鎖のRT-PCR反応は、Qiagen One-step RT-PCRキット(カタログ番号210210)及び示唆された反応混合物と条件を使用して実施した。IgGの哺乳類細胞発現のためのpRKベクターは以前に記載された(Gorman等., DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990))。キメラSN8の軽鎖可変ドメインのクローニングのためのベクターは、部位特異的変異によりRsrII部位が導入され、ヒトkappa定常ドメインを含むpDR1の誘導体(Shalaby等., J. Exp. Med., 175 (1): 217-225 (1992); 図24もまた参照されたい)である。軽鎖RT-PCR産物は、EcoRVとRsrIIを用いて消化され、ゲル精製され、このベクターのEcoRV/RsrII部位にクローニングされる。

同様に、キメラSN8の重鎖可変ドメインのクローニングのために、重鎖RT-PCR産物をPvuII及びApaIで切断し、ベクターpDR2(Shalaby等., J. Exp. Med., 175 (1): 217-225 (1992); 図25もまた参照されたい)のPvuII-ApaI部位に

クローニングした。この p D R 2 ベクターは、ヒト I g G 1 の C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。

D N A シークエンスは、抗ヒト C D 7 9 b (c h S N 8) のための、得られたマウスヒトキメラ軽鎖 (図 9) 及び重鎖 (図 1 1) の全体のコード領域をのために得られた。D N A によってコードされるマウスヒトキメラ軽鎖及び重鎖のためのコードされたポリペプチドを図 1 0 と 1 2 にそれぞれ示す。D N A のシークエンス後、プラスミドの発現を解析した。

C H O 細胞についての上記の通り、プラスミドを一時的に 2 9 3 (アデノウイルス形質転換ヒト胎児腎臓細胞株 (Graham等, J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977)) に形質転換した。具体的には、2 9 3 細胞を形質転換の前日に継代し、血清を含む培地に播いた。翌日、リン酸カルシウムの沈殿として調製した二重鎖 D N A、次いで、p A d V A n t a g e (商標) D N A (P r o m e g a、M a d i s o n、W I) を添加し、細胞を 3 7 °C で終夜インキュベートした。細胞を血清なしの培地で培養し、4 日後に収穫した。抗体タンパク質をプロテイン A カラム上で形質転換した細胞の上清から精製し、次いで緩衝液を、1 0 m M のコハク酸ナトリウム、1 4 0 m M の N a C l、p H 6. 0 に交換し、C e n t r i c o n 1 0 (A m i c o n) を使用して濃縮した。タンパク質の種類は、N 末端シークエンシングで確認した。タンパク質濃度は、定量的なアミノ酸分析によって決定した。抗体は、ヒト C D 7 9 b (T A H O 5 0) への結合について、上記の通り、B J A B 又は R A M O S 細胞中において F A C S によって試験した。

抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体 (c h 2 F 2) の作製及びシークエンシング

キメラ 2 F 2 I g G 1 の作製のために、Q i a g e n R N e a s y M i n i K i t (カタログ番号 7 4 1 0 4) 及び製造元提供のプロトコルを使用して、全長 R N A を 2 F 2 ハイブリドーマ細胞から抽出した。2 F 2 モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の得られた N 末端アミノ酸配列を使用して、それぞれの鎖に特異的な P C R プライマーを設計した。R T - P C R のリバースプライマーは、N 末端配列に対応する遺伝子ファミリーのフレームワーク 4 に適合するように設計された。プライマーはまたクローニングのために所望の制限部位を添加するために設計された。軽鎖については、これらは、N 末端の E c o R V とフレームワーク 4 の 3 ' 末端の K p n I であった。重鎖については、添加した部位は、N 末端の B s i W I と V H - C H 1 ジャンクションのわずかに下流の A p a I であった。プライマーは以下の通りである。

9 C 1 0 L C F. E c o R V (2 F 2 軽鎖フォワードプライマー) :

5 ' - G A T C G A T A T C G T G A T G A C B C A R A C T C C A C T - 3 ' (配列番号 : 3 6)

(B = G / T / C , K = G / T , Y = C / T , M = A / C , R = A / G , D = G / A / T . S = G / C , H = A / T / C)

C 7 F 7 L C R. K p n I (2 F 2 軽鎖リバースプライマー) :

5 ' - T T T D A K Y T C C A G C T T G G T A C C - 3 ' (配列番号 : 3 7)

(B = G / T / C , K = G / T , Y = C / T , M = A / C , R = A / G , D = G / A / T . S = G / C , H = A / T / C)

1 3 G 5 H C F. B s i W I (2 F 2 重鎖フォワードプライマー) :

5 ' - G A T C G A C G T A C G C T C A G G T Y C A R C T S C A G C A R C C T G G - 3 ' (配列番号 : 3 8)

(B = G / T / C , K = G / T , Y = C / T , M = A / C , R = A / G , D = G / A / T . S = G / C , H = A / T / C)

C 7 F 7 H C R. A p a I (2 F 2 重鎖リバースプライマー) :

5 ' - A C A G T G G G C C C T T G G T G G A G G C T G M R G A G A C D G T G A S H R D R G T - 3 ' (配列番号 : 3 9)

(B = G / T / C , K = G / T , Y = C / T , M = A / C , R = A / G , D = G / A / T . S = G / C , H = A / T / C)

軽鎖及び重鎖の R T - P C R 反応は、Q i a g e n O n e - s t e p R T - P C R

キット（カタログ番号210210）及び示唆された反応混合物と条件を使用して実施した。IgGの哺乳類細胞発現のためのpRKベクターは以前に記載された(Gorman等., DN A Prot Eng Tech 2:3-10 (1990))。ベクターは修飾され、クローニングと発現を容易にするために、特定のエンドヌクレアーゼ制限酵素認識部位を含む(Shields等., J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604)。増幅したVLは、部位EcoRVとRsrIIを用いて、ヒトkappa定常ドメイン(pRK.LPG3. ヒト Kappa; 図26)を含むpRK哺乳類細胞発現ベクターにクローン化された。増幅したVHは、部位BsiWIとApaIを用いて、全長ヒトIgG1定常ドメイン(pRK.LPG4.LPG4. ヒトHC; 図27)をコードするpRK哺乳類細胞発現ベクターにクローン化された。

DNAシーケンスは、抗ヒトCD79b(2F2)のための、得られたマウスヒトキメラ軽鎖(図16)及び重鎖(図18)の全体のコード領域をのために得られた。DNAによってコードされるマウスヒトキメラ軽鎖及び重鎖のためのコードされたポリペプチドを図17と19にそれぞれ示す。DNAのシーケンス後、プラスミドの発現を解析した。

CHO細胞についての上記の通り、プラスミドを一時的に293(アデノウイルス形質転換ヒト胎児腎臓細胞株(Graham等., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977))に形質転換した。抗体タンパク質をプロテインAカラム上で形質転換した細胞の上清から精製し、タンパク質の種類は、N末端シーケンシングで確認した。抗体は、ヒトCD79b(TAHO50)への結合について、上記の通り、BJAB又はRAMOS細胞中においてFACSによって試験した。

抗カニクイザルCD79b(TAHO40)抗体(ch10D10)の作製及びシーケンシング

キメラカニクイザルCD79b(TAHO40)抗体(ch10D10)IgG1の作製のために、Qiagen RNeasy Mini Kit(カタログ番号74104)及び製造元提供のプロトコルを使用して、全長RNAを10D10ハイブリドーマ細胞から抽出した。10D10Mabの軽鎖及び重鎖の得られたN末端アミノ酸配列を使用して、それぞれの鎖に特異的なPCRプライマーを設計した。RT-PCRのリバースプライマーは、N末端配列に対応する遺伝子ファミリーのフレームワーク4に適合するように設計された。プライマーはまたクローニングのために所望の制限部位を添加するために設計された。軽鎖については、これらは、N末端のEcoRVとフレームワーク4の3'末端のRsrIIであった。重鎖については、添加した部位は、N末端のPvuIIとVH-CH1ジャンクションのわずかに下流のApaIであった。プライマーは以下の通りである。

軽鎖フォワード: CA1836

5'-GGAGTACATTTCAGATATCGTGCTGACCCCATCTCCACCTCTTTGGC-3' (配列番号: 44)

軽鎖リバース: CA1808

5'-GGTGCAAGCCACGGTCCGTTTGTATTTCCAGCTTTGGTGCTCCACC-3' (配列番号: 45)

重鎖フォワード: CA1834:

5'-GGAGTACATTTCAGATGTGTCAGCTGTCAGGAGTCTGGGACCTGGCCCTGGTG-3' (配列番号: 46)

重鎖リバース: CA1835

5'-GACCGATGGGCCCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3' (配列番号: 47)

軽鎖及び重鎖のRT-PCR反応は、Qiagen One-step RT-PCRキット(カタログ番号210210)及び示唆された反応混合物と条件を使用して実施した。重鎖については、RT-PCRのためのSuperscript III First Strand Synthesis System、Invitrogen カタログ番号18080-051を使用し、次いで、Platinum Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて増幅した。反応と条件は製造

元によって提供された。I g Gの哺乳類細胞発現のためのp R K bベクターは以前に記載された(Gorman等., DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990))。キメラ1 0 D 1 0の軽鎖可変ドメインのクローニングのためのベクターは、部位特異的変異によりR s r I I部位が導入され、ヒトk a p p a定常ドメインを含むp D R 1の誘導体(Shalaby等., J. Exp. Med., 175 (1): 217-225 (1992); 図2 4もまた参照されたい)である。軽鎖R T - P C R産物は、E c o R VとR s r I Iを用いて消化され、ゲル精製され、このベクターのE c o R V / R s r I I部位にクローニングされる。

同様に、キメラ1 0 D 1 0の重鎖可変ドメインのクローニングのために、重鎖R T - P C R産物をP v u I I及びA p a Iで切断し、ベクターp D R 2(Shalaby等., J. Exp. Med., 175 (1): 217-225 (1992); 図2 2もまた参照されたい)のP v u I I - A p a I部位にクローニングした。このp D R 2ベクターは、ヒトI g G 1のC H 1、ヒンジ、C H 2及びC H 3ドメインを含む。

D N Aシーケンスは、抗カニクイザルC D 7 9 b (c h 1 0 D 1 0)のための、得られたマウスヒトキメラ軽鎖(図2 0)及び重鎖(図2 2)の全体のコード領域をのために得られた。D N Aによってコードされるマウスヒトキメラ軽鎖及び重鎖のためのコードされたポリペプチドを図2 1と2 3にそれぞれ示す。D N Aのシーケンス後、プラスミドの発現を解析した。

C H O細胞についての上記の通り、プラスミドを一時的に2 9 3(アデノウイルス形質転換ヒト胎児腎臓細胞株(Graham等., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977))に形質転換した。具体的には、2 9 3細胞を形質転換の前日に継代し、血清を含む培地に播いた。翌日、リン酸カルシウムの沈殿として調製した二重鎖D N A、次いで、p A d V A n t a g e (商標) D N A (P r o m e g a, M a d i s o n, W I)を添加し、細胞を3 7 °Cで終夜インキュベートした。細胞を血清なしの培地で培養し、4日後に収穫した。抗体タンパク質をプロテインAカラム上で形質転換した細胞の上清から精製し、次いで緩衝液を、1 0 m Mのコハク酸ナトリウム、1 4 0 m MのN a C l、p H 6 . 0に交換し、C e n t r i c o n 1 0 (A m i c o n)を使用して濃縮した。タンパク質の種類は、N末端シーケンシングで確認した。タンパク質濃度は、定量的なアミノ酸分析によって決定した。抗体は、カニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)への結合について、下記の通り、B J A BカニクイザルC D 7 9 b細胞(カニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)発現B J A B細胞株中においてF A C Sによって試験した。

C D 7 9 a抗体の特徴付け

抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体と抗カニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)抗体が結合するエピトープを決定した。エピトープの決定のため、霊長類でもまた保存され得ることを示唆し、ヒトとマウスのC D 7 9 bの間で高度に保存されている、C D 7 9 b遺伝子の非コード領域の側面に位置するプライマーを用いて、カニクイザルと赤毛ザルの両者のC D 7 9 b遺伝子をクローニングした。

ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)のオルタナティブスプライス形態、全長細胞外I g類似ドメイン(C D 7 9 bのスプライスされた切断形態中に存在しない細胞外のI g類似ドメインを、図1 3に四角で囲む)は、正常及び悪性B細胞中において記載される(Hashimoto, S.等, Mol. Immunol., 32(9): 651-9 (1995); Alfarano等, Blood, 93(7): 2327-35 (1999))。ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)の両者の形態が認識され、抗ヒトC D 7 9 b抗体のエピトープであることを示唆する、C B 3 - 1(BD Pharmingen; Cowley, United Kingdom)及びS N 8 (Ansell; Bayport, MN and Biomeda)を含む、商業的な抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体は、膜透過ドメインの末端領域の細胞外ペプチド領域中に存在し、全長及び切断型のヒトC D 7 9 b形態(Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002))として存在する。更に、上記(2 F 2)の商業的な抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体(C B 3 - 1及びS N 8)及び抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体は、カニクイザル又は赤毛ザルのB細胞を認識しない(データ示さず)。

膜透過ドメインの末端で、全長及び切断型ヒトC D 7 9 b形態の両者で存在する細胞外ペプチド領域をカニクイザル及び赤毛ザルC D 7 9 bの同じ領域と比較した。この領域に

10

20

30

40

50

おける、ヒトCD79b (TAHO5) とカニクイザル (TAHO40) 又は赤毛ザルCD79bの、両者の唯一の差異は、シグナルペプチド配列を除いて、3個のアミノ酸の差異を伴う、11アミノ酸領域である、ARSEDRYRNPK (ヒト) (配列番号: 16) 及びAKSEDLYPNPK (カニクイザル及び赤毛ザル) (配列番号: 17) であった。ヒト、カニクイザル及びマウスCD79bにおける11アミノ酸領域を図13に示し、「試験ペプチド」と標識した (ここで「11mer」とも呼ぶ)。

11アミノ酸領域を伴うペプチドが、抗体結合に競合することができるかどうかを決定するために、BJAB細胞を競合アッセイにおいて使用した。11アミノ酸領域を含む21merペプチドを、それぞれ配列が、配列番号: 26 (ARSEDRYRNPKGSACSRIWQS) 及び配列番号: 27 (AKSEDLYPNPKGSACSRIWQS) のヒトCD79b (TAHO5) 及びカニクイザルCD79b (TAHO40) について作製した。抗ヒトCD79b (TAHO5) 又は抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体を最初ヒトCD79b (TAHO5) 又はカニクイザルCD79b (TAHO40) タンパク質のECD部位又はヒトCD79b (TAHO5) 及びカニクイザルCD79b (TAHO40) で異なる領域をカバーする21merのヒト又はカニクイザルペプチドと (1:10の抗体:タンパク質比で) 室温で30分間インキュベートした。プレインキュベーションステップの後、抗体をBJAB細胞に添加し、二次抗体として用いるラットの抗マウスIgG1-PE抗体 (BD Bioscience、クローンG18-145) を用いて、通常の染色とFACSステップで進行した。

ヒトCD79b (TAHO5) 21merペプチドは、CB3-1 (BDbioscience, San Diego, CA) SN8 (Biomed, Foster City, CA 又はBDbioscience, San Diego, CA)、AT105 (Abcam, Cambridge, MA)、及び2F2 (上記) を含む抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体の結合を阻害し、コントロール抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (3H3、8D3、9H11又は10D10) 又は抗ヒトCD79a (TAHO4) 抗体 (ZL7-4; Caltag又はSerotec (Raleigh, NC) (Zhang, L.等, Ther. Immunol., 2:191-202 (1997))の結合を阻害しなかった。カニクイザルCD79b (TAHO40) 20merペプチドは、3H3、8D3、9H11及び10D10 (上記) を含む抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体の結合を阻害し、コントロール抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (CB3-1、SN8、AT105、2F2) 又は抗ヒトCD79a (TAHO4) 抗体 (ZL7-4) の結合を阻害しなかった。コントロールとして、ヒトCD79b (TAHO5) のECDは、CB3-1 (BDbioscience, San Diego, DA)、SN8 (Biomed, Foster City, CA 又はBDbioscience, San Diego, CA)、AT105 (Abcam, Cambridge, MA)、及び2F2 (上記) を含む抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体の結合を阻害し、コントロールの抗ヒトCD79a (TAHO4) 抗体 (ZL7-4; Caltag又はSerotec (Raleigh, NC)) (Zhang, L.等, Ther. Immunol., 2:191-202 (1997))の結合を阻害しなかった。

ヒトCD79b (TAHO5) 抗体のエピトープ結合を更に決定するために、11merヒトCD79bペプチド (N末端-ARSEDRYRNPK-C末端) の3個の11merペプチドを、カニクイザルCD79ペプチドにおけるそれぞれの同じ場所におけるアミノ酸に変異させたヒトCD79bペプチドにおける3個のArg残基の1アミノ酸残基変異を伴って作製し、ここで、ペプチド変異1から3と呼ぶ。ペプチド変異1 (N末端-AKSEDRYRNPK-C末端; 配列番号: 18) は配列番号: 16の位置2にArg残基の変異を含む。ペプチド変異2 (N末端-ARSEDLYPNPK-C末端; 配列番号: 19) は配列番号: 16の位置6にArg残基の変異を含む。ペプチド変異3 (N末端-ARSEDRYPNPK-C末端; 配列番号: 20) は配列番号: 16の位置8にArg残基の変異を含む。競合アッセイを上記の通り実施した。競合アッセイは更に、11merヒトCD79bペプチドにおける、全ての3個のArg残基 (配列番号: 16における位置2、6、及び8) が、抗ヒトCD79b (TAHO5) (SN8) 抗体の結合に重要であり、11merのヒトCD79bペプチドにおいて、中央のArg残基 (配列番号: 16における位置6) だけが、抗ヒトCD79b (TAHO5) (2F2) 抗体の結

10

20

30

40

50

合に重要であることを示す。

抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のエピトープ結合を更に決定するために、11merカニクイザルCD79bペプチド (N末端-AKSEDLYPNPK-C末端) の11merペプチドを、カニクイザルCD79ペプチドにおけるそれぞれの同じ場所におけるアミノ酸に変異させたヒトCD79bペプチドにおける1個のLeu残基の1アミノ酸残基変異を伴って作製し「ペプチド変異4」と呼ぶ。ペプチド変異4 (N末端-AKSEDLYPNPK-C末端; 配列番号: 25) は配列番号: 17の位置6にArg残基の変異を含む。競合アッセイを上記の通り実施した。競合アッセイは更に、11merカニクイザルCD79bペプチドにおける、Leu残基 (配列番号: 17における位置6) が、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10) の結合に重要であることを示す。

BJAB-カニクイザルCD79b細胞 (実施例11に記載のカニクイザルCD79b (TAHO40) 発現BJAB細胞株) において、抗ヒトCD79b (TAHO5) 及び抗カニクイザルCD79b (TAHO40) のKdスカッチャード解析は類似のKd値を示した。抗ヒトCD79b (SN8) は、0.5nMのKdで細胞に結合し、一方で、抗カニクイザルCD79b (10D10) は、細胞に1.0nMのKdで結合する。抗カニクイザルCD79b (3H3) は、細胞に2.0nMのKdで結合する。抗カニクイザルCD79b (8D3) は、細胞に2.5nMのKdで結合する。抗カニクイザルCD79b (9H11) は、細胞に2.6nMのKdで結合する。

ヒトCD79a (TAHO4)、ヒトCD79b (TAHO5) 及びカニクイザルCD79b (TAHO40) に対する抗体の抗体薬剤コンジュゲート (ADC) の生成

抗ヒトCD79a (TAHO4)、抗ヒトCD79b (TAHO5) 及び抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体のための抗体薬剤コンジュゲート (ADC) の生成に使用する薬剤には、メイタンシノイドDM1及びドラスタチン10誘導体モノメチルアウリスタチンE (MMAE) 及びモノメチルアウリスタチンF (MMAF) が含まれる。(米国公開特許2005/0276812; 米国公開特許2005/0238649; Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17:114-123 (2006); Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003); Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)、これらのすべては出典明記によってその全体が本明細書中に援用される)。ADCの生成に有用なリンカーは、DM1にはBMPEO、SPP又はSMCC (本明細書中では「MCC」とも称される) であり、MMAE及びMMAFにはMC又はMC-vc-PABである。DM1では、抗体はDM1のチオ基に、そしてリンカー試薬SMCCを用いてリジンのε-アミノ基を介して結合した。あるいは、DM1では、抗体は、SPPリンカーを用いてリジンのε-アミノ基を介してDM1に結合した。SPP (N-スクシンイミジル4-(2'-ピリジルジチオ)ペンタノエート) はリジンのε-アミノ基と反応して、タンパク質上の反応性2-ピリジルジスルフィドリンカーを残す。SPPリンカーについては、フリーなスルフヒドラル (例えばDM1) と反応すると、ピリジル基が置換され、還元ジスルフィド結合により付着したDM1を残す。SPPリンカーにより付着されたDM1は還元条件下 (すなわち、例えば細胞内) で放出されるのに対して、SMCCリンカーにより付着されたDM1は還元条件下で切断に耐性がある。さらに、ADCが内部移行され、リジン-N^ε-DM1の放出を引き起こすリソソームにターゲティングされる場合、SMCC-DM1 ADCは細胞毒性を引き起こす。このリジン-N^ε-DM1は細胞内で有効な抗有糸分裂薬剤であり、細胞から放出されると非毒性である (Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006))。MMAE及びMMAFでは、抗体は、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン (vc)-p-アミノベンジルオキシカルボニル (MC-vc-PAB) によりシステインを介してMMAE又はMMAFに結合した。あるいは、MMAFでは、抗体は、マレイミドカプロイル (MC) リンカーによって、システインを介してMMAFに結合した。MC-vc-PABリンカーは、カテプシンBなどの細胞内プロテアーゼによって切断され得、切断されると遊離薬剤を放出する (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)) のに対して、MCリンカーは細胞内プロテアーゼによる切断に耐性がある。

S M C C 及び D M 1 を用いた、抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体のための抗体薬剤コンジュゲート (A D C) は、米国公開特許 2 0 0 5 / 0 2 7 6 8 1 2 において記述される手順と同様に生成した。抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 精製抗体は、5 0 m M リン酸カリウム及び 2 m M E D T A、p H 7 . 0 を含む溶液にバッファを交換した。S M C C (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) は、ジメチルアセトアミド (D M A) に溶解し、抗体溶液に加えて 1 0 : 1 の S M C C / A b 最終モル比とした。混合しながら室温で 3 時間反応させた。続いて、S M C C 修飾抗体は、1 5 0 m M N a C l 及び 2 m M E D T A、p H 6 . 0 を有する 3 5 m M クエン酸ナトリウムにて平衡化された G E H e a l t h c a r e H i T r a p 脱塩カラム (G - 2 5) で精製した。D M A に溶解した D M 1 を、S M C C 抗体調製物に添加して、1 0 : 1 の抗体に対する D M 1 のモル比とした。混合しながら室温で 4 ~ 2 0 時間反応させた。D M 1 修飾抗体溶液は、反応していない D M 1 を取り除くために 2 0 容量の P B S にてダイアフィルターし、フィルター滅菌して、4 ° C に貯蔵した。一般的に、この方法によって抗体の 4 0 ~ 6 0 % の収率が達成された。ゲル濾過及びレーザー光散乱によって評価されるように、調製物は通常 9 5 % より多くの単量体であった。D M 1 が 2 5 2 n m で吸光度最大を有するので、抗体に結合した薬剤の量は、2 5 2 及び 2 8 0 n m での差次的な吸光度測定によって決定されうる。一般的に、抗体に対する薬剤比率は 3 ~ 4 であった。

10

S P P - D M 1 リンカーを用いた、本明細書中に記載の抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) のための抗体薬剤コンジュゲート (A D C) は、米国公開特許 2 0 0 5 / 0 2 7 6 8 1 2 において記述される手順と同様に生成してもよい。抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 精製抗体は、5 0 m M リン酸カリウム及び 2 m M E D T A、p H 7 . 0 を含む溶液にバッファを交換する。S P P (Immunogen) は、D M A に溶解し、抗体溶液に加えておよそ 1 0 : 1 の S P P / A b 最終モル比とした。この正確な比率は抗体の望ましい薬剤負荷に依存する。通常、1 0 : 1 の比率はおよそ 3 ~ 4 の抗体に対する薬剤比率となる。S P P は、混合しながら室温で 3 ~ 4 時間反応させる。続いて、S P P 修飾抗体は、1 5 0 m M N a C l 及び 2 m M E D T A、p H 6 . 0 を有する 3 5 m M クエン酸ナトリウム又はリン酸緩衝生理食塩水、p H 7 . 4 にて平衡化された G E H e a l t h c a r e H i T r a p 脱塩カラム (G - 2 5) で精製する。D M A に溶解した D M 1 を、S P P 抗体調製物に添加して、1 0 : 1 の抗体に対する D M 1 のモル比とする。この結果、抗体上の利用可能な S P P リンカーの 3 ~ 4 倍のモル比となる。混合しながら室温で 4 ~ 2 0 時間、D M 1 と反応させる。D M 1 修飾抗体溶液は、反応していない D M 1 を取り除くために 2 0 容量の P B S にてダイアフィルターし、フィルター滅菌して、4 ° C に貯蔵される。一般的に、この方法によって抗体の 4 0 ~ 6 0 % 以上の収率が達成される。ゲル濾過及びレーザー光散乱によって評価されるように、抗体-薬剤コンジュゲートは通常 9 5 % より多くの単量体であった。S M C C - D M 1 コンジュゲートの調製について記載したように (上記)、結合した薬剤の量は、2 5 2 及び 2 8 0 n m での差次的な吸光度測定によって決定されうる。

20

30

40

M C - M M A F、M C - M M A E、M C - v a l - c i t (v c) - P A B - M M A E 又は M C - v a l - c i t (v c) - P A B - M M A F 薬剤リンカーを用いた、本明細書中に記載の抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) のための抗体薬剤コンジュゲート (A D C) もまた、米国公開特許 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9 において記述される手順と同様に生成されてもよい。精製された抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4)、抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 及び抗カニクイザル C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体は、p H 8 . 0 で 5 0 0 m M ホウ酸ナトリウム及び 5 0 0 m M 塩化ナトリウムに溶解し、さらに過剰量の 1 0 0 M M ジチオトレイトール (D T T) にて処理される。3 7 ° C でおよそ 3 0 分間インキュベートした後、S e p h a d e x G 2 5 樹脂による溶出によりバッファを交換し、1 m M D T P A を含む P B S に

50

て溶出する。チオール／A b 値は、溶液の 280 nm での吸光度からの還元抗体濃度と D T N B との反応によるチオール濃度とを測定し、412 nm での吸光度を測定することによって調べられる。還元抗体は P B S に溶解し、氷上で冷やす。D M S O 中の例えば M C - v a l - c i t (v c) - P A B - M M A E などの薬剤リンカーをアセトニトリル及び水に溶解し、冷やした還元抗体を含む P B S に加える。1 時間のインキュベートの後、過剰量のマレイミドを加えて反応を止め、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。反応混合物は遠心限外濾過によって濃縮し、抗体薬剤コンジュゲートを精製し、P B S の G 2 5 樹脂による溶出によって脱塩し、無菌条件下にて 0.2 μ m フィルターにて濾過し、貯蔵のために凍結させる。

【0376】

実施例 10：特異的抗体を用いた T A H O ポリペプチドの精製

天然又は組換え T A H O ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-T A H O ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-T A H O ポリペプチドは、対象の T A H O ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗 T A H O ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテイン A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテイン A でのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、C n B r - 活性化セファロースTM (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態の T A H O ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによる T A H O ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化 T A H O ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化 T A H O ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムは T A H O ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。ついで、カラムは、抗体／T A H O ポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約 p H 2 - 3 といった低 p H、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ)で溶離され、T A H O ポリペプチドが回収される。

【0377】

実施例 11：インビトロでの腫瘍細胞死滅アッセイ

対象の T A H O ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を、標準的な発現ベクター及びクローニング法を使用して得る。あるいは、対象の T A H O ポリペプチドを発現する多くの腫瘍細胞株は例えば A T C C から公的に入手可能であり、標準的な E L I S A 又は F A C S 分析法を使用して常套的に同定することができる。ついで抗 T A H O ポリペプチドモノクローナル抗体(市販及びその毒素コンジュゲート誘導体)をアッセイで用いて、T A H O ポリペプチド発現細胞を死滅させるインビトロでの抗体の能力を定量することができる。

例えば、対象の T A H O ポリペプチドを発現する細胞を上述のようにして得て、96 ウェルの皿に蒔く。一分析例では、抗体／毒素コンジュゲート(又は裸の抗体)を4日の期間の細胞インキュベーションの間、含ませる。第二の独立の分析例では、細胞を抗体／毒素コンジュゲート(又は裸の抗体)と共に1時間インキュベートし、ついで洗浄して、4日の期間、抗体／毒素コンジュゲートの不存在下でインキュベートする。ついで、細胞生存度を、PromegaのCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(カタログ番号 G 7 5 7 1)を使用して測定する。未処理細胞はネガティブコントロールになる。

抗ヒト C D 7 9 a (T A H O 4) 及び抗ヒト C D 7 9 b (T A H O 5) 抗体については

10

20

30

40

50

、B細胞株（ARH-77、BJAB、Daudi、DOHH-2、Su-DHL-4、Raji及びRamos）を、別々の無菌丸底96ウェル組織培養物処理済プレート（Cellstar 650 185）に、1ウェル当たり細胞5000個の密度で調製した。細胞は、アッセイ培地（RPMI 1460、1%のL-グルタミン、10%のウシ胎児血清（FBS；HyClone）及び10mMのHEPES）であった。細胞を37℃のインキュベーターに一晩置いた。

抗カニクイザルCD79b（TAHO40）抗体については、トランスジェニックカニクイザルCD79b（TAHO40）BJAB細胞株（ここでは、「BJABカニクイザルCD79b」又は「BJABカニクイザルCD79b」又は「BJABカニクイザルCD79b」）を生成した。BJAB細胞株（t（2；8）（p112；q24）（IGK-1MYC）転移、変異p53遺伝子を含み、Epstein-Barrウイルス（EBV）陰性である、Burkittのリンパ腫細胞株）（Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001）を、通常のAMAXAヌクレオフェクションプロトコル（Solution T, Program T-16）（AMAXA Inc., Gaithersburg, MD）によって、カニクイザルCD79b（TAHO40）（ここでは、「pRK. CMF. PD. カニクイザルCD79b」と呼ぶ）を含む発現ベクターを用いて形質転換した。pRK. CMF. PD. カニクイザルCD79bについては、カニクイザルCD79b（TAHO40）をクローニングした。カニクイザルCD79a（TAHO39）及びCD79b（TAHO40）のクローニングについては、カニクイザルCD79a（TAHO39）及びカニクイザルCD79b（TAHO40）のマウス及びヒトDNA配列を揃えた。オープンリーディングフレームに隣接する保存配列に対するプライマーは以下の通り生成した：

cynoCD79a（TAHO39） フォワードプライマー： 5'-TCAAACTAACCAACCCACTGGGAG-3' （配列番号：21）

cynoCD79a（TAHO39） リバースプライマー： 5'-CAGCGATTAAAGGGCTCATTTACCC-3' （配列番号：22）

cynoCD79b（TAHO40） フォワードプライマー： 5'-TCGGGACAGAGCAGTGACC-3' （配列番号：23）

cynoCD79b（TAHO40） リバースプライマー： 5'-CAAGAGCTGGGGACCAAGGGG-3' （配列番号：24）

カニクイザルCD79a（TAHO39）及びCD79b（TAHO40）プライマーを用いて、カニクイザルCD79a（TAHO39）及びCD79b（TAHO40）をカニクイザル脾臓DNAライブラリーから増幅した。PCR産物をTAベクター（Invitrogen）にクローニングし、シークエンシングした。カニクイザルCD79a及びカニクイザルCD79bORFをピューロマイシン耐性遺伝子を含む（ここで「pRK. CMV. PD」と呼ぶ）CMVプロモーターによって制御される発現ベクターにサブクローニングした。

pRK. CMF. PD. カニクイザルCD79bをBJAB細胞への形質転換とピューロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）セレクションの後、生存細胞を上位5%について抗カニクイザルCD79b抗体（3H3）を用いてFACS自動クローニングした。カニクイザルCD79b（TAHO40）を発現する最良の発現BJAB細胞株をFACS解析により選択した。形質転換したカニクイザルCD79b（TAHO40）を発現するBJAB細胞はまたヒトCD79a（TAHO4）及びヒトCD79b（TAHO5）を発現する。コントロールとして、形質転換していないヒトCD79a（TAHO4）及びヒトCD79b（TAHO5）を発現するBJAB細胞を使用した。

抗体薬コンジュゲート（実施例9に記載の、市販のZL7-4のような抗ヒトCD79a（TAHO4）、SN8のような抗ヒトCD79b（TAHO5）、又は抗ヒトCD79a（TAHO4）、抗ヒトCD79b（TAHO5）又は抗カニクイザルCD79b（TAHO40）抗体を使用）をアッセイ培地において2×10⁶g/mlに希釈した。クロスリンカーのSMCC又はジスルフィドリンカーSPPを用いてコンジュゲートをDM

10

20

30

40

50

1 毒素にリンクさせた（実施例 9 及び 2005 年 5 月 31 日出願の米国出願第 11/141344 号及び 2004 年 11 月 5 日出願の米国出願第 10/983340 号を参照されたい）。更に、MC-バリナーシトルリン（vc）-PAB 又は MC を用いて、コンジュゲートを、ドルスタチン 10 誘導体、モノメチルオーリスタチン E（MMAE）毒素又はモノメチルオーリスタチン F（MMAF）毒素（実施例 9 及び 2005 年 5 月 31 日出願の米国出願第 11/141344 号及び 2004 年 11 月 5 日出願の米国出願第 10/983340 号を参照されたい）にリンクさせてもよい。ハーセプチンを主成分とするコンジュゲート（SMCC-DM1 又は SPP-DM1）をネガティブコントロールとして使用した。コンジュゲートの充填容量に対応する遊離型 L-DM1 相当物を、ポジティブコントロールとして使用した。希釈に先立ち、試料を攪拌して確実に混合物を均一化した。抗体薬コンジュゲートを更に 1:3 まで希釈し続けた。Rapidplate（登録商標）96/384 Zymark 自動化システムを用いて、この細胞株を一行当たり各試料 50 µl を充填した。プレート全体に充填したら、プレートを 3 日間に亘り再度インキュベートし、毒素の効果を出現させた。全てのウェルに 10 分間に亘って 1 ウェル当たり 100 µl の Cell Glo（Promega、カタログ番号 G7571/2/3）を添加することにより反応を停止させた。停止させたウェルの内容物 100 µl を、底が透明な 96 ウェル白組織培養物処理済プレート（Costar 3610）に移し、蛍光を読み取って相対的光単位（RLU）として報告した。この実験に使用した TAO 抗体には、抗ヒト CD79a（TAHO4）（ZL7-4）及び抗ヒト CD79b（TAHO5）（SN8）を含む市販の抗体が含まれる。

要約

a. 抗ヒト CD79a（TAHO4）

DM1 毒素（抗ヒト CD79a（ZL7-4）-SMCC-DM1）にコンジュゲートさせた抗ヒト CD79a（TAHO4）（ZL7-4）抗体は、抗ヒト CD79a（TAHO4）（ZL7-4）抗体単独又は RAMOS 細胞における（データ示さず）DM1 毒素（抗HER2-SMCC-DM1）にコンジュゲートしたネガティブコントロールの抗HER2と比較して、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

b-1. 抗ヒト CD79b（TAHO5）

DM1 毒素（抗ヒト CD79b（SN8）-SMCC-DM1）にコンジュゲートさせた抗ヒト CD79b（TAHO5）（SN8）抗体は、抗ヒト CD79b（TAHO5）（SN8）抗体単独又は RAMOS 細胞における DM1 毒素（抗HER2-SMCC-DM1）にコンジュゲートしたネガティブコントロールの抗HER2と比較して、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

b-2. 抗カニクイザル CD79b（TAHO40）

(1) DM1 ADC

(a) BJAB-カニクイザル CD79b 細胞

DM1 毒素（抗ヒト CD79b（SN8）-SMCC-DM1）にコンジュゲートさせた抗ヒト CD79b（TAHO5）（SN8）抗体は、抗ヒト CD79b（TAHO5）（SN8）抗体単独又は RAMOS 細胞における DM1 毒素（抗HER2-SMCC-DM1）にコンジュゲートしたネガティブコントロールの抗HER2と比較して、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。ポジティブコントロールとして、DM-1 ダイマー単独、及び DM1（抗ヒト CD79b（SN8）-SMCC-DM1）にコンジュゲートした抗ヒト CD79b（TAHO5）抗体（SN8）をまた比較し、BJAB-カニクイザル CD79b 細胞において、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

0.33 nM の IC50 を有する抗カニクイザル CD79b（10D10）-SMCC-DM1 は、BJAB-カニクイザル CD79b 細胞において有意な腫瘍殺傷を示さなかった。2 nM の IC50 を有する抗ヒト CD79b（SN8）-SMCC-DM1 又は 26 nM の IC50 を有するハーセプチン（登録商標）（トラスツズマブ）-SMCC-DM1 よりも多い BJAB-カニクイザル CD79b 細胞の殺傷を示した。

(b) BJAB 細胞

コントロールとして、DM1（抗カニクイザル CD79b（10D10）-SMCC-

DM1) にコンジュゲートさせた抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10) 抗体を、BJAB細胞 (形質転換せず) 中で解析し、BJAB細胞中で、有意な腫瘍殺傷を示さなかった。ネガティブコントロールの、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10) 単独、DM1 (ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) -SMCC-DM1) にコンジュゲートしたハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) 抗体及び抗体無しは、BJAB細胞中で有意な腫瘍細胞殺傷を示さなかった。ポジティブコントロールとして、DM-1ダイマー単独、及びDM1 (抗ヒトCD79b (SN8) -SMCC-DM1) にコンジュゲートした抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8) をまた比較し、BJAB-カニクイザルCD79b細胞において、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

10

10nMのIC50を有する抗カニクイザルCD79b (10D10) -SMCC-DM1及び30nMのIC50を有するハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) -SMCC-DM1は、BAJB細胞において有意な殺傷を示さなかったが、0.4nMのIC50を有する抗ヒトCD79b (SN8) -SMCC-DM1は、BJAB細胞の有意な殺傷を示した。

(2) MMAF ADC

(a) BJAB-カニクイザルCD79b細胞

MMAF (抗カニクイザルCD79b (10D10) -MC-MMAF) にコンジュゲートさせた抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10) は、BJAB-カニクイザルCD79b細胞において有意な腫瘍殺傷を示さなかったネガティブコントロールの、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10)、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8)、ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) 抗体、MMAF (ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) -MC-MMAF) にコンジュゲートしたハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) と比較して、BJAB-カニクイザルCD79b細胞において、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。ポジティブコントロールとして、MMAF (抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMAF) にコンジュゲートした抗ヒトCD79b (TAHO5) (SN8) 抗体をまた比較し、BJAB-カニクイザルCD79b細胞において、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

20

0.07nMのIC50を有する抗カニクイザルCD79b (10D10) -MC-MMAFは、0.6nMのIC50を有する抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMAFよりも多いBJAB-カニクイザルCD79b細胞の殺傷を示した。

30

(b) BJAB細胞

コントロールとして、MMAF (抗カニクイザルCD79b (10D10) -MC-MMAF) にコンジュゲートさせた抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10) 抗体を、BJAB細胞 (形質転換せず) 中で解析し、BJAB細胞中で、有意な腫瘍殺傷を示さなかった。ネガティブコントロールの、抗カニクイザルCD79b (TAHO40) 抗体 (10D10)、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8)、ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) 抗体、MMAF (ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) -MC-MMAF) にコンジュゲートしたハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) は、BJAB細胞中で有意な腫瘍細胞殺傷を示さなかった。ポジティブコントロールとして、MMAF (抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMAF) にコンジュゲートした抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8) をまた比較し、BJAB-カニクイザルCD79b細胞において、有意な腫瘍細胞殺傷を示した。

40

694nMのIC50を有する抗カニクイザルCD79b (10D10) -MC-MMAFは、BAJB細胞において有意な殺傷を示さなかったが、0.2nMのIC50を有する抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMAFは、BJAB細胞の有意な殺傷を示した。

有意な腫瘍細胞殺傷を示す抗TAHO抗体の能力を考慮すると、TAHO分子は、リンパ腫 (すなわち非ホジキンリンパ腫)、白血病 (すなわち慢性リンパ性白血病)、ミエローマ (すなわち多発性ミエローマ) 及び他の造血系細胞の癌などのB細胞関連の癌を含む、哺

50

乳動物の腫瘍の治療のための優れた標的であろう。抗T A H Oポリペプチドモノクローナル抗体は、リンパ腫(すなわち非ホジキンリンパ腫)、白血病(すなわち慢性リンパ性白血病)、ミエローマ(すなわち多発性ミエローマ)及び他の造血系細胞の癌などのB細胞関連の癌を含む、腫瘍のインビトロの増殖の低減に有用である。具体的には、エピトープにおける類似性を考慮すれば、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体を用いた抗カニクイザルC D 7 9 b (T A H O 4 0)の親和性及びインビトロにおける効能は、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体のためのカニクイザルにおける毒性学の研究及び効能の研究において有力な代用となり得る。

【0378】

実施例12：インビボ腫瘍細胞殺傷アッセイ

10

1. 異種移植片

コンジュゲートするか又はコンジュゲートしていない抗T A H Oポリペプチドモノクローナル抗体の有効性を試験するために、マウスの腫瘍に対する抗T A H O抗体の効果を分析した。具体的には、R A J I細胞、R A M O S細胞、B J A B細胞(t(2;8)(p112;q24)(I G K-M Y C)転位、変異したp53遺伝子を含み、エプスタイン-バーウイルス(E B V)陰性であるパーキットリンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)、G r a n t a 5 1 9細胞(サイクリンD1(B C L 1)の過剰発現を引き起こすt(11;14)(q13;q32)(B C L 1-I G H)転位を含み、P 1 6 I N K 4 B及びP 1 6 I N K 4 A欠失を含み、E B V陽性であるマントル細胞リンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)、U 6 9 8 M細胞(リンパ芽球性リンパ肉腫B細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)及びD o H H 2細胞(I g 重鎖によって作動されるB c 1-2の過剰発現を引き起こす濾胞性リンパ腫t(14;18)(q32;q21)の転位特徴を含み、P 1 6 I N K 4 A欠失を含み、t(8;14)(q24;q32)(I G H-M Y C)転位を含み、E B V陰性である濾胞性リンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)を含む複数の異種移植片モデルにおける抗体の腫瘍退行能を調べた。

20

抗ヒトC D 7 9 a又は抗ヒトC D 7 9 b抗体の有効性の分析のために、雌C B 17 I C R S C I Dマウス(6-8週齢、Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)の側腹部に、 5×10^6 のR A J I細胞、 5×10^6 のR A M O S細胞、 2×10^7 のB J A Bルシフェラーゼ細胞、 2×10^7 のG r a n t a-5 1 9細胞、 5×10^6 のU 6 9 8 M細胞又は 2×10^7 のD o H H 2細胞を皮下接種した。平均200mm²にまで異種移植片腫瘍を成長させた。以下特に示さない場合には、0日目は、腫瘍が平均200mm²であり、処置の第一用量/又は唯一の用量が投与された日を指す。腫瘍体積は、二次元に基づいて算出され、カリパスを用いて測定し、式： $V = 0.5 a \times b^2$ に従ってmm³で表した。このときa及びbはそれぞれ腫瘍の長径及び短径である。各実験群から採取したデータは平均±S Eで表した。マウスは100から200mm³の平均腫瘍体積を有する8から10匹のマウスのグループに分け、この点において静脈内(i. v.)治療を開始した。抗体又はA D Cの投与は、2から3週間の200から500µg/m²の薬剤濃度に相当する2から10mg/kgの単回投与又は毎週200から500µg/m²のそれぞれの投与が3から10mg/kgの複数回投与であった。抗体はA D C又はコンジュゲートしていない抗体をコントロールとした。実験期間の間、週に1回又は2回腫瘍を測定した。腫瘍体積が3000mm³に達する前、又は、腫瘍が切迫潰瘍化の徴候を示すときに、マウスを安楽死させた。すべての動物のプロトコルは、Institutional Animal Care and Use Committee(I A C U C)の承認を得た。

30

40

使われた抗体と毒素間のリンカーは、D M 1又はM CのためのジスルフィドリンカーS P P又はチオエーテル架橋剤S M C C、モノメチルアウリスタチンE(M M A E)又はモノメチルアウリスタチンF(M M A F)のためのマレイミド成分とパラアミノベンジルカルバモイル(P A B)自己犠牲的成分とを有するM C-バリナーシトルリン(v c)-P A B又

50

は(バリニン-シトルリン(v c))ジペプチドリンカー試薬が含まれる。使用した毒素はDM1、MMAE又はMMAFであった。この実験に使用したTAHO抗体には、抗ヒトCD79a(TAHO4)(ZL7-4)及び抗ヒトCD79b(TAHO5)(SN8)、及び抗ヒトCD79b(TAHO5)(2F2)及び抗ヒトCD79a(TAHO4)(8H9、5C3、7H7、8D11、15E4及び16C11)抗体を含む、実施例9に記載の抗体を含む市販の抗体が含まれた。実施例9に記載の抗カニクイザルCd79b(TAHO40)(3H3、8D3、9H11、及び10D10)をまた使用してもよい。

ネガティブコントロールには、限定するものではないが、抗HER2(ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ))ベースのコンジュゲート(SMCC-DM1又はSPP-DM1又はMC-MMAF又はMC-v c-PAB-MMAF又はMC-v c-PAB-MMAE)が含まれた。ポジティブコントロールは、限定されるものではないが、コンジュゲート搭載の投与量に等しいフリーのL-DM1が含まれた。

要約

抗ヒトCD79a(TAHO4)

(a) Ramos 異種移植片

18日間の経過では、DM1(抗ヒトCD79a-SMCC-DM1)にコンジュゲートされた抗ヒトCD79a(TAHO4)抗体は、ネガティブコントロールの抗ハーセプチン-SMCC-DM1と比較して、RAMOS腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。ADCは、0日目に単回用量で投与した。

(b) BJAB 異種移植片

18日間の経過では、(表8に示す通り)単回用量で0日目に投与されたDM1(抗ヒトCD79a(5C3、7H7、8D11、15E4又は16C11)-SMCC-DM1)にコンジュゲートされた、5C3、7H7、8D11、15E4及び16C11抗体を含む抗ヒトCD79a(TAHO4)抗体は、ネガティブコントロールのハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-SMCC-DM1と比較して、BJABルシフェラーゼ腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表11に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79a(5C3、7H7、8D11、15E4又は16C11)-SMCC-DM1及び抗ヒトCD79b(2F2又はSN8)-SMCC-DM1は、有意に腫瘍成長を阻害した(データは示さず)。さらに、表8では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表11

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79a(5C3)-SMCC-DM1	2/9	2/9	7.03	192
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-SMCC-DM1	0/9	0/9	4.07	192
抗ヒトCD79b(2F2)-SMCC-DM1	3/9	3/9	4.07	192
抗ヒトCD79b(SN8)-SMCC-DM1	3/9	5/9	2.96	192

(c) BJAB 異種移植片

14日間の経過では、(表12に示す通り)単回用量で0日目に投与されたDM1(それぞれ、抗ヒトCD79a(8H9)-SMCC-DM1及び抗ヒトCD79b(SN8)-SMCC-DM1)にコンジュゲートされた、8H9抗体、及び抗ヒトCD79b(SN8)抗体を含む抗ヒトCD79a(TAHO4)抗体は、ネガティブコントロールのPBS、抗糖タンパク質-120(ここでは、「gp120」と呼ぶ)、抗ヒトCD79b(SN8)、抗ヒトCD79a(8H9)及びDM1(抗gp120-SMCC-DM1)とコンジュゲートした抗gp120と比較して、BJABルシフェラーゼ腫瘍をもつS

C I Dマウスの腫瘍成長の阻害を示した。A D Cは、すべてのA D C及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表9に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトC D 7 9 a (8 H 9) - S M C C - D M 1 及び抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1 は、有意に腫瘍成長を阻害した(データは示さず)。さらに、表8では、P R = 部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はC R = 完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0 mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表12

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79a (8H9)-SMCC-DM1	3/8	2/8	4.0	200
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	2/8	5/8	3.1	200
PBS	0/8	0/8	NA	NA
抗gp120)	0/8	0/8	3.2	NA
抗ヒトCD79b (SN8)	0/8	0/8	3.1	NA
抗ヒトCD79a (8H9)	0/8	0/8	4.0	NA
抗gp120-SMCC-DM1	0/8	0/8	3.2	200

10

(2A) 抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)

20

D M 1 (抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1) にコンジュートした抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) は、薬剤コンジュゲートの単回投与によって、R a m o s 異種移植片において、部分的な縮退 (P I) 又は完全寛解 (C R) を示した。更に、D M 1 又はM M A F (抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1 又は抗ヒトC D 7 9 b - M C - M M A F) とコンジュゲートした抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 抗体は、薬剤コンジュゲートの単回投与によって、B J A B、G r a n t a 5 1 9 及びD o H H 2 異種移植片において、部分的な縮退 (P I) 又は完全寛解 (C R) を示した。

(a) R a m o s 異種移植片

18日間の経過では、D M 1 (抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1) にコンジュゲートされた抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 抗体は、ネガティブコントロールの抗ハーセプチン-S M C C - D M 1 と比較して、R A M O S 腫瘍をもつS C I Dマウスの腫瘍成長の阻害を示した。A D Cは、0日目に単回用量で投与した。

30

(b) B J A B 異種移植片

14日間の経過では、D M 1 (抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1) にコンジュゲートされた、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) 抗体は、ネガティブコントロールの抗ハーセプチン-S M C C - D M 1 又は抗ハーセプチン抗体と比較して、B J A B ルシフェラーゼ腫瘍をもつS C I Dマウスの腫瘍成長の阻害を示した。抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1 抗体による阻害のレベルは、抗C D 2 0 抗体による阻害レベルに類似していた。具体的には、15日目において、抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1 で処理した10匹のマウスのうち1匹が腫瘍の部分的な縮退を示し、抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1 で処理した10匹のマウスのうち9匹が腫瘍の完全寛解を示した。15日目において、抗ハーセプチン-S M C C - D M 1、抗ハーセプチン抗体で処理した10匹のマウスのうち10匹は、腫瘍を誘発した。15日目において、抗C D 2 0 抗体で処理した10匹のマウスのうち5匹が腫瘍の部分的縮退を示した。A D Cは、すべてのA D C及びコントロールについて0日目及び5日目に、複数回用量で(表13に濃度でそれぞれの投与量が示されるように)投与した。更なる抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1 による処理は、14日目に行われた。具体的には、抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1 及び抗C D 2 0 は、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表13では、P R = 部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はC R = 完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0 mm³に落ち込んだ場合)

40

50

を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表13

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	1/10	9/10	5.26	236
コントロール:				
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-SMCC-DM1	0/10	0/10	5	236
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)	0/10	0/10	10	NA
抗CD20	5/10	0/10	10	NA

10

(c) B J A B 異種移植片 (MMA E、MMA F、DM 1)

80日間の経過では、MMA F (抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMA F又は抗ヒトCD79b (SN8) -MC-vc-PAB-MMA F)、DM 1 (抗ヒトCD79b (SN8) -SMCC-DM 1)又はMMA F (抗ヒトCD79b (SN8) -MC-vc-PAB-MMA E)にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b (TAHO5)抗体 (SN8)は、ネガティブコントロールのMMA E又はMMA Fにコンジュゲートしたハーセプチン (登録商標)、ハーセプチン (登録商標) -MC-MMA F、ハーセプチン (登録商標) -MC-vc-PAB-MMA E及びハーセプチン (登録商標) -MC-vc-PAB-MMA Fと比較して、B J A B ルシフェラーゼ (Burkittリンパ腫) 腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表14に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMA F、抗ヒトCD79b (SN8) -SMCC-DM 1及び抗ヒトCD79b (SN8) -MC-vc-PAB-MMA Fは、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。コントロールのハーセプチン (登録商標) ADC及びMC-vc-PAB-MMA E (ハーセプチン (登録商標) -MC-vc-PAB-MMA E及び抗ヒトCD79b (SN8) -MC-vc-PAB-MMA E)にコンジュゲートした抗ヒトCD79b (SN8) ADCは、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表11では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

20

30

表14

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	0/8	8/8	4.16	322
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	0/8	8/8	5	324
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-vc-PAB-MMAE	0/8	8/8	3.94	317
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-vc-PAB-MMAF	5/8	0/8	3.86	322
コントロール:				
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-MC-MMAF	0/8	0/8	4.59	322
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-MC-vc-PAB-MMAE	2/8	5/8	4.17	317
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-MC-vc-PAB-MMAF	0/8	0/8	3.73	322

40

(d) B J A B 異種移植片

更に、30日間の経過では、MMA F (抗ヒトCD79b (SN8) -MC-MMA F)又はDM 1 (抗ヒトCD79b (SN8) -SMCC-DM 1)にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b (TAHO5)抗体 (SN8)は、ネガティブコントロールの抗ヒトCD79b (TAHO5)抗体 (SN8)、抗gp120単独、MMA F (抗gp120

50

—MC—MMAF又は抗gp120—MC—vc—PAB—MMAF)又はMMAE(抗gp120—MC—MMAF)にコンジュゲートされた抗gp120又はDM1(抗gp120—MC—MMAF)にコンジュゲートされた抗gp120と比較して、BJABルシフェラーゼ(Burkittリンパ腫)腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表15に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b(SN8)—MC—MMAF及び抗ヒトCD79b(SN8)—SMCC—DM1は、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表12では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。 10

表15

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	0/8	8/8	3.4	150
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	1/8	2/8	1.1	50
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	0/8	8/8	3.1	150
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	0/8	0/8	1	50
コントロール:				
抗gp120	0/8	0/8	3.4	NA
抗gp120-SMCC-DM1	0/8	0/8	2.6	150
抗gp120-MC-MMAF	0/8	0/8	3.3	150
抗ヒトCD79b (SN8)	0/8	0/8	3.4	NA

20

(e) BJAB異種移植片

更に、20日間の経過では、MMAF(SN8—MC—MMAF)にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b(TAHO5)抗体(SN8)は、ネガティブコントロールのMMAF若しくはDM1(抗gp120—MC—MMAF又は抗gp120—MC—vc—PAB—MMAF)又はMMAE(抗gp120—MC—MMAE)にコンジュゲートされた、抗gp120と比較して、BJABルシフェラーゼ(Burkittリンパ腫)腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。MMAE又はMMAFにコンジュゲートした抗CD22のポジティブコントロールもまた比較した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表16に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b(SN8)—MC—MMAF及び抗ヒトCD79b(SN8)—MC—vc—PAB—MMAF及び上記に示すポジティブコントロールは、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。コントロールのMC—vc—PAB—MMAEを伴う抗gp120—ADC及び抗ヒトCD79b(SN8)ADC(抗gp120—MC—vc—PAB—MMAE及び抗ヒトCD79b(SN8)—MC—vc—PAB—MMAE)は有意に腫瘍の倍加を阻害した(データ示さず)。さらに、表13では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。 30 40

表17

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	1/8	1/8	2.1	100
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	2/8	6/8	6.2	300
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	1/8	0/8	2.3	100
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	6/8	0/8	6.8	300
コントロール:				
抗gp120-MC-SMCC-DM1	0/8	0/8	5.2	300
抗gp120-MC-MMAF	0/8	0/8	6.6	300
抗gp120	0/8	0/8	6.8	NA
抗ヒトCD79b (SN8)	0/8	0/8	6.8	NA
抗CD22 (10F4v3)-MC-MMAF	2/8	0/8	6.8	300

(f) Granta 異種移植片

21日間の経過では、MMAF (SN8-MC-MMAF) 又はDM1 (SN8-SMCC-DM1) にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8)、又は単独の抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8) は、ネガティブコントロールの抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8)、抗gp120又はMMAF若しくはDM1 (抗gp120-MC-MMAF又は抗gp120-SMCC-DM1) にコンジュゲートされた、抗gp120と比較して、Granta-519 (マントル細胞リンパ腫) 腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。MMAF (10F4v3-MC-MMAF) にコンジュゲートした抗CD22 (10F4v3) のポジティブコントロールもまた比較した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表17に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1及び抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF及び上記に示すポジティブコントロールは、100 g/m² 及び300 g/m² の薬剤濃度において、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表14では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0 mm³ に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表11

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79a (5C3)-SMCC-DM1	2/9	2/9	7.03	192
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-SMCC-DM1	0/9	0/9	4.07	192
抗ヒトCD79b (2F2)-SMCC-DM1	3/9	3/9	4.07	192
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-CM1	3/9	5/9	2.96	192

(g) D o H H 2 異種移植片

21日間の経過では、MMAF又はDM1 (SN8-MC-MMAF又はSN8-MC-DM1) にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8)、又は単独の抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8) は、ネガティブコントロールの抗gp120又はMMAF若しくはDM1 (抗gp120-MC-MMAF又は抗gp120-SMCC-DM1) にコンジュゲートされた、抗gp120と比較して、D o H H 2 (濾胞性リンパ腫) 腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。MMAF (抗CD22 (10F4v3-MC-MMAF)) にコンジュゲートした抗CD22 (10F4v3) のポジティブコントロールもまた比較した。ADCは、すべてのADC及びコン

コントロールについて0日目に、単回用量で(表18に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b (SN8) - SMCC-DM1、抗ヒトCD79b (SN8) - MC-MMAFは、 100 g/m^2 及び 300 g/m^2 の薬剤濃度において、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表15では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が 0 mm^3 に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表18

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²	
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	2/8	0/8	2.1	100	10
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	0/8	8/8	6.2	300	
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	0/8	0/8	2.3	100	
抗ヒトCD79b (SN8)-MC-MMAF	1/8	6/8	6.8	300	
抗ヒトCD79b (SN8)	0/8	1/8	6.8	NA	
コントロール:					
抗gp120-MC-SMCC-DM1	0/8	0/8	5.2	300	
抗gp120-MC-MMAF	0/8	0/8	6.6	300	
抗gp120	0/8	0/8	6.8	NA	20

(h) U698M異種移植片

21日間の経過では、DM1 (抗ヒトCD79b (SN8) - SPP-DM1) にコンジュゲートされた、抗ヒトCD79b (TAHO5) 抗体 (SN8) は、ネガティブコントロールのDM1 (ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) - SPP-DM1) とコンジュゲートしたハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ) と比較して、U698M (リンパ肉腫B) 腫瘍をもつSCIDマウスの腫瘍成長の阻害を示した。ADCは、すべてのADC及びコントロールについて2日目、8日目及び15日目に、複数回用量で(表19に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトCD79b (SN8) - SPP-DM1は、有意に腫瘍倍加を阻害した(データは示さず)。さらに、表16では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が 0 mm^3 に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表19

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-SPP-DM1	0/10	10/10	4.59	242.72
コントロール:				
ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-SPP-DM1	0/4	0/4	5.9	239.86

(2B) 抗カニクイザルCD79b (TAHO40)

コンジュゲート又は未コンジュゲート抗カニクイザルCD79b (TAHO40) モノクローナル抗体の効能を調べるために、上記の通り、マウスの腫瘍における抗TAHO抗体の効果を調べてもよい。具体的には、RAJI細胞、RAMOS細胞、BJAB細胞(t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC) 転位、変異したp53遺伝子を含み、エプスタイン-バーウイルス (EBV) 陰性であるバーキットリンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)、Grant a519細胞(サイクリンD1 (BCL1) の過剰発現を引き起こすt(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH) 転位を含み、P16INK4B及びP16INK4A欠失を含み、EBV陽性であるマントル細胞リンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The L

eukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001))、U 6 9 8 M細胞(リンパ芽球性リンパ肉腫B細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)及びD o H H 2細胞(I g 重鎖によって作動されるB c l - 2の過剰発現を引き起こす濾胞性リンパ腫t (1 4 ; 1 8)(q 3 2 ; q 2 1)の転位特徴を含み、P 1 6 I N K 4 A欠失を含み、t (8 ; 1 4)(q 2 4 ; q 3 2) (I G H - M Y C)転位を含み、E B V陰性である濾胞性リンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)を含む複数の異種移植片モデルにおける抗体の腫瘍退行能を調べた。

2. びまん性異種移植片

コンジュゲート又は非コンジュゲート抗T A H Oポリペプチドモノクローナル抗体の効能を更に試験するために、マウスのびまん性腫瘍における抗T A H O抗体の効果を解析した。

ルシフェラーゼを安定に発現するB J A B細胞をS C I Dマウスの尾静脈に注入した。バイオルミネセンスイメージングを腫瘍増殖を監視するために使用した。細胞注射の10日後に、マウスはルミネセンスシグナルをベースにグループ化し、A D Cで処理した。マウスは、(注射後7日と14日に)2回、5 m g / k gの抗体投与量において、コントロールのハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ) - S M C C - D M 1 (7匹のマウス)又はD M 1 (抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1) (8匹のマウス)とコンジュゲートした抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) (S N 8)で処理した。

コントロールグループのマウスは以下の通り犠牲死させた。7匹のマウスのうち2匹を21日目、残りの5匹は、後肢麻痺のため、5日目。抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1で処理した8匹のマウスのうちの1匹は、70日目にイメージングした際には腫瘍の兆候を示し、81日目に犠牲死させたが、抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1で処理した8匹のマウスのうちの7匹は、健康であり、152日目まで腫瘍の兆候は示さなかった。このように、これらの5 m g / k gの抗体投与量における抗ヒトC D 7 9 b (S N 8) - S M C C - D M 1は、試験した動物の87%において、びまん性のB J A B腫瘍を取り除いた。

3. B細胞レセプターの内在化

A D Cを用いた腫瘍の治療の効果を決定するために、B細胞レセプターの表面発現を腫瘍B J A B異種移植片において解析した。

B細胞レセプターの表面発現の解析のために、13日間の時間経過B J A B異種移植片実験を、下記の差異はあるが、上記の通り開始した。B J A B腫瘍は、500 m m ²まで成長させ、0日目において、D M 1 (抗ヒトC D 7 9 b - S M C C - D M 1)にコンジュゲートした抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) (S N 8又は2 F 2)又はコントロール抗体、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)単独(S N 8又は2 F 2)又は抗-g p 1 2 0又はD M 1 (抗-g p 1 2 0 - S M C C - D M 1)にコンジュゲートした抗g p 1 2 0を用いた(表19に示す通り)単回投与量において治療した。抗体で処理した2日後に、それぞれの治療グループについて、2個の腫瘍を取り除き、B細胞レセプターの表面発現をフローサイトメトリーで調べた。

残りの腫瘍はフローサイトメトリー解析のために選択せず、残りの13日の時間経過に従った。D M 1 (S N 8 - S C C - D M 1又は2 F 2 - S M C C - D M 1)にコンジュゲートした抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体(S N 8又は2 F 2)は、ネガティブコントロールの抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5)抗体(S N 8)、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) (2 F 2)、抗g p 1 2 0又はD M 1 (抗-g p 1 2 0 - S M C C - D M 1)にコンジュゲートした抗g p 1 2 2 0と比較して、B J A Bルシフェラーゼ腫瘍を有するS C I Dマウスにおける腫瘍増殖の阻害を示した。A D Cは、すべてのA D C及びコントロールについて0日目に、単回用量で(表17に示されるように)投与した。具体的には、抗ヒトC D 7 9 b (S N 8又は2 F 2) - S M C C - D M 1は、有意に腫瘍成長を阻害した(データは示さず)。さらに、表8では、P R = 部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はC R = 完全再生(投与後

10

20

30

40

50

のいずれかの時の腫瘍体積が 0 mm^3 に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示す。

表20

治療	PR	CR	Ab mg/kg	医薬 ug/m ²
抗ヒトCD79b (SN8)-SMCC-DM1	2/8	0/8	4.1	200
抗ヒトCD79b (2F2)-SMCC-DM1	2/8	0/8	4.5	200
コントロール:				
抗ヒトCD79b (SN8)	0/8	0/8	4.5	NA
抗ヒトCD79b (2F2)	0/8	0/8	4.5	NA
抗gp120	0/8	0/8	4.5	NA
抗gp120-MC-SMCC-DM1	0/8	0/8	3.5	200

FACS解析の要約

FACS解析から、CD79a、CD79b及びIgMの表面発現は、抗gp120又はDM1（抗-gp-120-SMCC-DM1）にコンジュゲートした抗gp120を用いて治療した腫瘍においてよりも、抗ヒトCD79b（TAHO5）抗体（SN8又は2F2）又はDM1（抗ヒトCD79b-SMCC-DM1）にコンジュゲートした抗ヒトCD79b（TAHO5）抗体を用いて治療した腫瘍において、有意に低かった。CD22の表面発現は、抗ヒトCD79b（TAHO5）抗体（SN8又は2F）又はDM1（抗ヒトCD79b-SMCC-DM1）にコンジュゲートした抗ヒトCD79b（TAHO5）抗体を用いた治療に影響を受けなかった。

異種移植片及びびまん性異種移植片における有意に腫瘍の倍加を阻害する抗TAHO抗体の能力を考慮すると、TAHO分子は、リンパ腫(すなわち非ホジキンリンパ腫)、白血病(すなわち慢性リンパ性白血病)、ミエローマ(すなわち多発性ミエローマ)及び他の造血系細胞の癌などのB細胞関連の癌を含む、哺乳動物の腫瘍の治療のための優れた標的であろう。さらに、抗TAHOポリペプチドモノクローナル抗体は、リンパ腫(すなわち非ホジキンリンパ腫)、白血病(すなわち慢性リンパ性白血病)、ミエローマ(すなわち多発性ミエローマ)及び他の造血系細胞の癌などのB細胞関連の癌を含む、腫瘍のインビボの増殖の低減に有用である。

更に、抗ヒトCD79a（TAHO4）及び抗ヒトCD79b（TAHO5）ADCの（上記の異種移植片における）効能はタンパク質標的の表面発現レベル又はフリーの薬剤に対する感受性に相関していなかった。したがって、抗TAHOポリペプチドモノクローナル抗体は、TAHOポリペプチドが低い発現レベルである腫瘍のインビボにおける腫瘍増殖の低減のために有用であり得る。

【0379】

実施例13：免疫組織化学

TAHOポリペプチドの組織発現を決定し、実施例1のマイクロアレイの結果を確認するため、本出願人のヒト組織バンク由来の口蓋扁桃、脾臓、リンパ節及びパイエル板を含む、スナップ凍結したリンパ組織及びホルマリン固定したパラフィン包埋（FFPE）リンパ組織において、TAHOポリペプチド発現の免疫組織化学的検出を試験した。

TAHO標的発現の罹患率を、FFPEリンパ組織マイクロアレイ（Cybrdi）及び24の凍結ヒトリンパ検体において評価した。凍結組織検体を5µmの切片にし、空気乾燥させ、免疫染色に先立って5分間アセトンで固定した。パラフィン包埋組織を5µmの切片にし、SuperFrost Plus顕微鏡スライド（VWR）に載せた。

凍結切片について、スライドをTBST、1%のBSA及び0.05%のアジ化ナトリウムを含む10%の正常ウマ血清に30分間入れ、次いでアビジン／ビオチン遮断キット（Vector）試薬を用いてインキュベートし、その後一次抗体を添加した。マウスのモノクローナル一次抗体（市販）を、ビオチニン化したウマ抗マウスIgG（Vector）を用いて

検出し、その後アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体 (ABC Elite, Vector) 及び金属増強ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB, Pierce) を用いてインキュベートした。コントロール切片は、アイソタイプ的一致する無関係なマウスモノクローナル抗体 (Pharmingen) を用いて同等の濃度でインキュベートした。ABC-HRP 試薬の適用後、増幅希釈液中でビオチンチラミド (Perkin Elmer) を用いて 5 ~ 10 分に亘り切片をインキュベートし、洗浄し、ABC-HRP 試薬を用いて再度インキュベートした。上述のように、DAB を用いて検出を行った。

FFPE ヒト組織切片を希釈水に入れて蠟を取り除き、沸騰水中で 20 分間 Target Retrieval 溶液 (Dako) で処理し、その後 20 分間冷却した。残留する内在性のペルオキシダーゼ活性を 1 × 遮断溶液 (KPL) を用いて 4 分間遮断した。アビジン/ビオチン遮断試薬、及び、10 % の正常ウマ血清を含む遮断バッファーを用いて切片をインキュベートした後、モノクローナル抗体を加え、遮断バッファー中において 0.5 ~ 5.0 µg/ml まで希釈した。次いで、ビオチン化した抗マウス二次抗体を用いて切片を連続的にインキュベートし、その後 ABC-HRP による検出及び DAB を用いた色素生産性検出を行った。上述の Tyramide Signal Amplification を使用して、TAHO 標的 (CD21、CD22、HLA-DOB) の数を求めるための染色の感受性を増大させた。

TAHO 分子は、B 細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍、例えばリンパ腫 (つまり非ホジキンリンパ腫)、白血病 (つまり慢性リンパ性白血病)、骨髄腫 (つまり多発性骨髄腫) 及びその他造血細胞癌の治療の良好な標的である。

【0380】

実施例 14: フローサイトメトリー

TAHO 分子の発現を決定するため、正常細胞及び疾病細胞、例えば慢性リンパ性白血病 (CLL) 細胞を含めた様々な細胞を用いて FACS 分析を行った。

A. 正常細胞: TAHO4 (ヒト CD79a) 及び TAHO5 (ヒト CD79b)

扁桃腺 B 細胞のサブタイプについて、新鮮な扁桃腺を冷たい HBSS 中で分割し、70 µm の細胞濾過器に通した。細胞を一度洗浄し、数を数えた。AutoMACS (Miltenyi) を用いて CD19 + B 細胞を濃縮した。簡単に言うと、ヒト IgG を用いて扁桃腺細胞を遮断し、抗 CD19 マイクロビーズを用いてインキュベートし、AutoMACS でのポジティブ選択に先立って洗浄した。CD19 + B 細胞の画分を、プラズマ細胞のフローサイトメトリー分析のために保存した。B 細胞の亜集団を検索するために、FITC-CD77、PE-IgD、及び APC-CD38 を用いて残りの CD19 + 細胞を染色した。PE-Cy5-CD19 を用いて CD19 + 濃縮を分析したところ、純度は 94 ~ 98 % の CD19 + の範囲であった。扁桃腺 B 亜集団を、流速 18,000 ~ 20,000 個/秒で MoFlo by Michael Hamilton により検索した。濾胞性マントル細胞を IgD + / CD38 - 画分として、記憶 B 細胞を IgD - / CD38 - として、中心細胞を IgD - / CD38 + / CD77 - として、及び中心芽細胞を IgD - / CD38 + / CD77 + として回収した。細胞は 50 % の血清中に一晚保存するか、又は染色し、2 % のパラホルムアルデヒドを用いて固定した。プラズマ細胞の分析のために、ストレプトアビジン-PE-Cy5 によって検出される対象の標的に対し、Cd138-PE、CD20-FITC、及びビオチン化した抗体を用いて扁桃腺 B 細胞を染色した。ストレプトアビジン-PE-Cy5 によって検出される対象の標的に対し、ビオチン化抗体を用いて扁桃腺 B 亜集団を染色した。BD FACSCaliber によりフロー分析を行い、FlowJo ソフトウェア v 4.5.2 (TreeStar) を用いてデータを更に分析した。TAHO4 (ヒト CD79a) 及び TAHO5 (ヒト CD79b) 等の市販されているビオチンコンジュゲート抗体をフローサイトメトリーに用いた。

正常細胞の TAHO4 (ヒト CD79a) (ZL7-4) 及び TAHO5 (ヒト CD79b) (CB-3) の要約

対象の TAHO ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を用いて、検索した扁桃腺-B サブタイプ上の発現パターンを行った。TAHO4 (ヒト CD79a) (抗ヒト CD79a を使用) 及び TAHO5 (ヒト CD79b) (抗ヒト CD79b を使用) は、記憶

10

20

30

40

50

B細胞、濾胞性マントル細胞、中心芽細胞、及び中心細胞に有意な発現を示した（データは示さない）。

対象のT A H Oポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を用いて扁桃腺プラズマ細胞上の発現パターンを実行した。T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）（抗ヒトC D 7 9 aを使用）及びT A H O 5（ヒトC D 7 9 b）（抗ヒトC D 7 9 bを使用）は、プラズマ細胞に有意な発現を示した（データは示さない）。

従って、F A C Sによって評価した、扁桃腺-Bサブタイプ上のT A H O 4及びT A H O 5の発現パターンを考慮すると、これらの分子は、B細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍、例えばリンパ腫（つまり非ホジキンリンパ腫）、白血病（つまり慢性リンパ性白血病）、骨髓腫（つまり多発性骨髓腫）及びその他造血細胞癌の治療の良好な標的である。

10

【0381】

B. C L L細胞：T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）及びT A H O 5（ヒトC D 7 9 b）

以下の精製済み又は蛍光色素抱合m A B sをC L L試料のフローサイトメトリーに使用した：C D 5-P E、C D 1 9-P e r C P C y 5. 5、C D 2 0-F I T C、C D 2 0-A P C（BD Pharmingenから購入）。更に、C D 2 2（Ancell社RFB4）、C D 2 3（BD Pharmingen社のM-L 2 3 3）、C D 7 9 A（Serotec社又はCaltag社のZL 7-4）、C D 7 9 B（BD Pharmingen社C B-3）、C D 1 8 0（eBioscience社MHR 7 3-1 1）、C X C R 5（R&D Systems社5 1 5 0 5）に対する市販のビオチン化抗体、をフローサイトメトリーに使用した。C D 5、C D 1 9及びC D 2 0抗体を使用してC L L細胞に入れ、細胞生存率をチェックするためにP I染色を実施した。

20

まず、細胞（容積1 0 0 m l中1 0⁶個）を、それぞれ1 m gのC D 5、C D 1 9及びC D 2 0抗体、並びにそれぞれ1 0 m gのヒト及びマウスγグロブリン（Jackson Immuno Research Laboratories、West Grove、PA）を用いてインキュベートし、非特異的結合を遮断し、次いで適切な濃度のm A b sを用いて3 0分間暗所において4℃でインキュベートした。ビオチン化した抗体を使用した場合、次いで製造者の指示に従ってストレプトアビジン-P E又はストレプトアビジンA P C（Jackson ImunoResearch Laboratories）を加えた。FACS calibur（BD Biosciences、San Jose、CA）においてフローサイトメトリーを実行した。線形モードにおいて、前方散乱（F S C）及び側方散乱（S S C）信号が記録され、対数モードで蛍光信号が記録された。死滅した細胞及び残骸を細胞の散乱特性を用いて外に出した。CellQuest Pro ソフトウェア（BD Biosciences）及びFlowJo（Tree Star Inc.）を用いてデータを分析した。

30

C L L試料における、T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）及びT A H O 5（ヒトC D 7 9 b）の要約

対象のT A H Oポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を用いてC L L試料の発現パターンを実行した。T A H O 4（ヒトC D 7 9 a）及びT A H O 5（ヒトC D 7 9 b）は、C L L試料に有意な発現を示した（データは示さない）。

従って、F A C Sによって評価した、慢性白血病（C L L）試料における、T A H O 4及びT A H O 5の発現パターンを考慮すると、これら分子は、B細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍、例えばリンパ腫（つまり非ホジキンリンパ腫）、白血病（つまり慢性リンパ性白血病）、骨髓腫（つまり多発性骨髓腫）及びその他造血細胞癌の治療の良好な標的である。

40

【0382】

実施例 1 5：T A H Oの内部移行

T A H O抗体のB細胞株への内部移行を、A R H 7 7、S u D H L 4、U 6 9 8 M、h u B及びB J A B細胞株を含むR a j i、R a m o s、D a u d i及びその他B細胞株において評価した。

2 0の反応に使用できる細胞を有するB細胞（～5 0×1 0⁶個）の、ワンレディトゥスプリット(one ready-to-split) 1 5 c mディッシュを使用した。細胞はパッセージ2 5以下（週齢8週未満）であり、マイコプラズマを起こすことなく健常に成長していた。

蓋を緩めた1 5 m lのFalconチューブ中において、1 μ g/m lのマウス抗T A H O抗

50

体を、2 ml 中 2.5×10^6 個の細胞を有する正常な成長培地（例えば PRMI / 10 % FBS / 1 % グルタミン）に加え、37 °C で 5 % CO₂ のインキュベーターに 24 時間入れた。培地は、1 : 10 の FcR ブロック（MACS キット、希釈してアジ化物を除去）、1 % の pen / strep、5 μM のペプスタチン A、10 μg / ml のロイペプチン（リソソームプロテアーゼインヒビター）及び 25 μg / ml の Alexa 488 トランスフェリン（再循環経路を標識し、生存している細胞を示す；或いは、全ての経路を標識するために、Ax 488 デキストラン液相マーカーを用いてもよい）を含むものであった。急速に内部移行する抗体について、5 分毎のタイムポイントを採用した。1 時間未満のタイムポイントについては、1 ml の完全な無炭酸塩培地（Gibco 18045-088 + 10 % の FBS、1 % のグルタミン、1 % の pen / strep、10 mM の Hepes (pH 7.4)）を使用し、CO₂ インキュベーターではなく 37 °C の水槽において反応を実施した。

10

所定の時間過程を終了後、遠心分離（1500 rpm の G6-SR において 4 °C で 5 分間、又は 4 °C のベンチトップ型エッペンドルフ遠心分離において 2500 rpm で 3 分間）することにより細胞を回収し、1.5 ml の無炭酸塩培地（エッペンドルフ）、又は 1.5 ml の Falcon チューブ用 10 ml の培地中で 1 度洗浄した。細胞に対し、2 度目の遠心分離を行い、室温で 20 分間 PBS 中 3 % パラホルムアルデヒド（EMS）0.5 ml に再懸濁し、細胞を固定させた。

以下のステップを全て行った後、遠心分離により細胞を回収した。細胞を PBS 中において洗浄後、PBS 中 50 mM の NH₄Cl（Sigma）0.5 ml 中で 10 分間消光し、4 分間の遠心分離回転の間に PBS 中 0.1 % のトリトン-X-100 5 ml で 4 分間透過処理した。PBS 中で細胞を洗浄し、遠心分離した。1 μg / ml の Cy3-抗マウス（又は抗種 1° 抗体）を加えることにより、室温で 20 分間に亘り、200 μl の完全無炭酸塩培地における抗体の取り込みを検出した。無炭酸塩培地中において細胞を 2 度洗浄し、25 μl の無炭酸塩培地中に再懸濁し、ポリリジンでコーティングした 8 ウェルの Labtek II スライドのうち 1 つのウェルに細胞を滴下し、少なくとも 1 時間（又は冷蔵庫で一晩）置いた。非結合細胞は全て吸引し、スライド上において、50 × 24 mm のカバーガラスの下に、Vectashield を含む DAPI を 1 ウェル当たり 1 滴載せた。100 倍の対物レンズを用いて、抗体の内部移行について細胞を試験した。

20

【0383】

30

要約

(1) T A H O 4 / C D 7 9 a（抗ヒト C D 7 9 a（T A H O 4）抗体 Serotec ZL7-4 又は Caltag ZL7-4 を用いて検出した）は、1 時間以内に Ramos 細胞、1 時間以内に Daudi 細胞及び 1 時間以内に S u D H L 4 細胞に内部移行し、3 時間でリソソームに送達された。

(2) T A H O 5 / C D 7 9 b（抗 C D 7 9 b 抗体 Ancell 社 S N 8 を用いて検出）は、Ramos 細胞、Daudi 及び S u - D H L 4 細胞内に 20 分で内部移行し、1 時間でリソソームに送達された。

従って、それぞれ、抗 T A H O 抗体を用いて免疫蛍光により評価した、T A H O 4 及び T A H O 5 の B 細胞株への内部移行を考慮すると、これら分子は、B 細胞関連癌を含む哺乳動物の腫瘍、例えばリンパ腫（つまり非ホジキンリンパ腫）、白血病（つまり慢性リンパ性白血病）、骨髄腫（つまり多発性骨髄腫）及びその他造血細胞癌の治療の良好な標的である。

40

【0384】

実施例 16 : T A H O 共局在

細胞内への内部移行の際にどこに抗 T A H O 抗体が運搬されるか否かを決定するために、B 細胞株へ内部移行された抗 C D 7 9 b 抗体の共局在試験を Ramos 細胞株において評価してもよい。LAMP-1 は後期エンドソーム及びライソソームのためのマーカーであり (Kleijmeer et al., Journal of Cell Biology, 139(3): 639-649 (1997); Hunziker et al., Bioessays, 18:379-389 (1996); Mellman et al., Annu. Rev. Dev. Biology,

50

12:575-625 (1996))、後期エンドソーム／ライソソーム様区画であるMHCクラスII区画(MIIC)を含む。HLA-DMはMIICのためのマーカーである。

Ramos細胞を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗ヒトCD79b (SN8) 抗体、FcRブロック(Miltenyi)及び $25\mu\text{g}/\text{ml}$ Alexa647-トランスフェリン(Molecular Probes)を含む完全無炭酸塩培地(Gibco)にて、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン(Roche)及び $5\mu\text{M}$ ペプスタチン(Roche)の存在下で、 37°C で3時間インキュベートして、ライソソームの分解を阻害させる。次いで、細胞を2回洗浄し、3% パラフォルムアルデヒド(Electron Microscopy Sciences)にて室温で20分かけて固定し、 50mM NH_4Cl (Sigma)にて反応を止め、0.4% サポニン/2% FBS/1% BSAにて20分間透過させ、次いで、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Cy3抗マウス(Jackson Immunoresearch)とともに20分間インキュベートを行う。次いで、マウスIgG(Molecular Probes)にて20分間反応をブロックした後、Image-iT FXシグナルエンハンサー(Molecular Probes)とともに30分間インキュベートを行う。最後に、細胞を、ライソソーム及びMHC(MHCクラスII経路の一部であるライソソーム様区画)のマーカーであるZenon Alexa488-標識マウス抗LAMP1 (BD Pharmingen)と共に20分間インキュベートし、その後3% PFAにて固定する。 $20\mu\text{l}$ のサポニンバッファに細胞を再懸濁し、ポリ-リジン(Sigma)コートスライドに付着させ、DAPI含有VectaShield(Vector Laboratories)を有するカバーガラスをマウントする。MHC又はライソソームの免疫蛍光のために、上記のように細胞を固定し、透過処理し、亢進させ、次いで製造業者(Molecular Probes)の指示に従って、過剰量のマウスIgGの存在下にてZenon標識Alexa555-HLA-DM(BD Pharmingen)とAlexa488-Lamp1にて共染色する。

要約

抗ヒトCD79b (TAHO5) (SN8) 抗体は1から3時間取り込まれたLAMP 1と共局在し、再生マーカーのトランスフェリンよりも有意に少ない共局在を示した。

したがって、それぞれの抗T A H O抗体の免疫蛍光によって評価される、抗ヒトC D 7 9 b (T A H O 5) のM I I C又はライソソームへの内在化を考慮すれば、分子が、リンパ腫(すなわち非ホジキンリンパ腫)、白血病(すなわち慢性リンパ性白血病)、ミエローマ(多発性ミエローマ)及び他の造血系細胞の癌などのB細胞関連の癌を含む、哺乳動物の腫瘍の治療のための優れた標的であることを示すであろう。

【 0 3 8 5 】

実施例 17：システイン操作抗TAHO抗体の調製

本明細書において開示されるようにシステイン操作抗ヒトCD79b (TAHO5) 及び抗カニクイザルCD79b (TAHO40) のような抗TAHO抗体の調製を行った。

c h S N 8 抗体をコードする D N A (軽鎖、配列番号： 1 0、図 1 0；及び重鎖、配列番号： 1 2、図 1 2)は、本明細書において開示される方法によって突然変異を誘発し、軽鎖及び重鎖を修飾した。また、c h S N 8 抗体をコードする D N A (重鎖、配列番号： 1 2；図 1 2)は、本明細書において開示される方法によって突然変異を誘発し、重鎖の F c 領域を修飾してもよい。

抗 c y n o C D 7 9 b (T A H O 4 0) 抗体 (c h D 1 0) をコードする D N A (軽鎖、配列番号： 4 1 ; 図 2 1 及び重鎖、配列番号： 4 3、図 2 3) は、本明細書において開示される方法によって突然変異を誘発し、軽鎖及び重鎖を修飾した。また、抗 c y n o C D 7 9 b 抗体をコードする D N A (重鎖、配列番号： 4 3、図 2 3) は、本明細書において開示される方法によって突然変異を誘発し、重鎖の F c 領域を修飾してもよい。

システイン操作抗CD79b抗体の調製において、軽鎖をコードするDNAに突然変異を誘発し、図30(chSN8 チオMAbの軽鎖、配列番号：58)及び図36(チオMAb抗cyノCD79b (TAHO40) (ch10D10)の軽鎖、配列番号：96)に示すように、軽鎖のカバット位置205(連続した位置208)でシステインをバリンと置換させた。重鎖をコードするDNAに突然変異を誘発し、図35(チオMAb 抗cyノCD79b (TAHO40) (ch10D10)抗体の重鎖、配列番号：61)、図31(MA79b チオMAbの重鎖、配列番号：60)に示すように、重鎖のEU位置118(

連続した位置 118 ; カバット番号 114) でシステインをアラニンと置換させた。表 6 ~ 7 に示すように、抗 CD79b 抗体の Fc 領域を、重鎖 Fc 領域の EU 位置 400 (連続した位置 400 ; カバット番号 396) でシステインをセリンに置換させてもよい。

【0386】

A. 還元及び再酸化によるコンジュゲートのためのシステイン操作抗 T A H O 抗体の調製

完全長のシステイン操作(engineered)抗ヒト CD79b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル CD79b (T A H O 40) のような抗 T A H O 抗体は、C H O 細胞において発現させ、プロテイン A 親和性クロマトグラフィの後にサイズ排斥クロマトグラフィを行って精製した。精製された抗体は、500 mM ホウ酸ナトリウム及び 500 mM 塩化ナトリウムにておよそ pH 8.0 に再構成し、およそ 50 ~ 100 倍モル過剰量の 1 mM T C E P (トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド ; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80 ; Soltec Ventures, Beverly, MA) にて、37 °C でおよそ 1 ~ 2 時間かけて還元させる。還元された T h i o M a b を希釈し、10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5 の H i T r a p S カラムに流し、0.3 M 塩化ナトリウムを含む P B S にて溶出させる。溶出された希釈 T h i o M a b は、pH 7 の 2 mM デヒドロアスコルビン酸(d h A A) にて 3 時間、又は 2 mM 水溶性硫酸銅(C u S O₄) にて室温で終夜処理する。環境大気酸化も有効であろう。Sephadex G25 樹脂による溶出によってバッファを交換し、1 mM D T P A を含む P B S にて溶出する。チオール / A b 値は、溶液の 280 nm の吸光度からの還元抗体濃度と D T N B (Aldrich, Milwaukee, WI) との反応及び 412 nm の吸光度の測定によるチオール濃度とを決定することによって概算する。

【0387】

実施例 18 : システイン操作抗 T A H O 抗体と薬剤-リンカー中間生成物のコンジュゲートによる、システイン操作抗 T A H O 抗体薬剤コンジュゲートの調製

実施例 17 の還元及び再酸化手順の後、システイン操作抗ヒト CD79b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル CD79b (T A H O 40) のような、T A H O 抗体は、P B S (リン酸緩衝食塩水) バッファにて再構成し、氷上で冷やす。マレイミドなどのチオール反応性官能基を有する、M C - M M A E (マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチン E)、M C - M M A F、M C - v a l - c i t - P A B - M M A E、又は M C - v a l - c i t - P A B - M M A F などのアウリスタチン薬剤リンカー中間生成物の抗体当たりの操作システインとおよそ 1.5 モル相当物を D M S O にて希釈し、アセトニトリルと水にて希釈し、冷却した還元、酸化抗体を含む P B S に加える。およそ 1 時間後、過剰量のマレイミドを加えて反応を止め、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。反応混合物は遠心限外濾過によって濃縮し、システイン操作抗ヒト CD79b (T A H O 5) 又は抗カニクイザル CD79b (T A H O 40) のような、T A H O 抗体薬剤コンジュゲートは精製し、P B S の G 25 樹脂による溶出によって脱塩し、無菌条件下で 0.2 µm フィルターにて濾過し、貯蔵のために凍結する。

c h S N 8 - H C (A 118 C) チオ M A b - B M P E O - D M 1 の調製を以下のように行った。抗 c h S N 8 - H C (A 118 C) チオ M A b 上の遊離システインは、抗体の表面上の反応しなかったマレイミド基を残す、ビス-マレイミド試薬 B M (P E O) 3 (Pierce Chemical) にて修飾した。これは、50 % エタノール / 水混合物に 10 mM の濃度になるまで B M (P E O) 3 を溶解し、抗 c h S N 8 - H C (A 118 C) チオ M A b をおよそ 1.6 mg / ml (10 マイクロモル) の濃度でリン酸緩衝生理食塩水を含む溶液に 10 倍モル過剰量の B M (P E O) 3 を加え、それを 1 時間反応させることによって達成した。過剰量の B M (P E O) 3 は、150 mM N a C l バッファを含む 30 mM クエン酸塩、pH 6 のゲル濾過 (HiTrap カラム、Pharmacia) によって除去した。ジメチルアセトアミド (D M A) に溶解したおよそ 10 倍モル過剰量の D M 1 を、抗 c h S N 8 - H C (A 118 C) チオ M A b - B M P E O 中間生成物に加えた。また、ジメチルホルムアミド (D M F) を用いて、薬剤部分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させ、ゲル濾過又は P B S への透析を行い反応しなかった薬剤を除去した。P B S の S 200 カラムのゲル濾過を用いて、

高分子量集合体を取り除き、精製された抗 $chSN8-HC(A118C)$ チオ $MAb-BMPEO-DM1$ を供給した。

【0388】

同じプロトコールによって、チオコントロール $hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1$ 、チオコントロール $hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF$ 、チオコントロール $hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE$ を生成した。

上記の手順によって、以下のシステイン操作抗 $TAHO$ 抗体薬剤コンジュゲート (TD) を調製し、試験した。

1. $A118C$ チオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)$ と $MC-MMAF$ とのコンジュゲートによるチオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF$; 10
2. $A118C$ チオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)$ と $BMPEO-DM1$ とのコンジュゲートによるチオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1$;
3. $A118C$ チオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)$ と $MC-val-cit-PAB-MMAE$ とのコンジュゲートによるチオ 抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE$;
4. $A118C$ チオ $chSN8-HC(A118C)$ と $MC-MMAF$ とのコンジュゲート 20
によるチオ $chSN8-HC(A118C)-MC-MMAF$;
5. チオ $chSN8-LC(V205C)$ と $MC-MMAF$ とのコンジュゲートによるチオ
 $chSN8-LC(V205C)-MC-MMAF$.

【0389】

実施例 19 : システイン操作 $ThioMAb$ 薬剤コンジュゲートの細胞表面抗原に対する結合親和性の特徴付け

$BJAB$ -ルシフェラーゼ細胞に発現される $CD79b$ に対するチオ $huMA79b.v18$ 、チオ $huMA79b.v28$ 薬剤コンジュゲート及びチオ $MA79b$ 薬剤コンジュゲートの結合親和性を、 $FACS$ 分析にて測定した。さらに、 $cynoCD79b$ を発現している $BJAB$ 細胞に発現される $CD79b$ に対するチオ 抗 $cynoCD79b(ch10D10)$ 薬剤コンジュゲートの結合親和性を、 $FACS$ 分析にて測定した。 30

簡単にいうと、 $100\mu l$ 中およそ 1×10^6 個の細胞を、様々な量 (100 万個の $BJAB$ -ルシフェラーゼ細胞又は $cynoCD79b$ を発現する $BJAB$ 細胞につき、 $1.0\mu g$ 、 $0.1\mu g$ 又は $0.01\mu g$ の Ab) の以下のいずれかの抗 $CD79b$ チオ MAb 薬剤コンジュゲート又はネイキッド (コントロールとしてのコンジュゲートしていない Ab) と接触させた。(1) (1) チオ $chSN8-LC(V)205C-MC-MMAF$ 又は (2) チオ $chSN8-HC(A118C)-MC-MMAF$ (それぞれ、図 3 2 A-B) ; 又は (3) チオ抗カニクイザル $CD79b(TAHO)40(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE$ 、(4) チオ抗カニクイザル $CD79b(TAHO)40(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1$ 40
、又は (5) チオ抗カニクイザル $CD79b(TAHO40)(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF$; (それぞれ図 3 3 B-3 3 D を参照)。 PE コンジュゲートマウス抗ヒト Ig を二次検出抗体 ($BD Cat\#555787$) として用いた。

細胞表面に結合した抗 $CD79b$ 抗体は、 PE コンジュゲートマウス抗ヒト Ig を用いて検出した。図 3 2-3 3 のプロット線は、抗原結合が試験したチオ MAb 薬剤コンジュゲートのすべてについておよそ同じであったことを示す。

【0390】

実施例 20 : 抗 $TAHO ThioMAb$ 薬剤コンジュゲートによるインビトロ細胞増殖低減についてのアッセイ

抗 $TAHO ThioMAb$ -薬剤コンジュゲートのインビトロ作用強度は、細胞増殖ア 50

ッセイにて測定した。Cell Titer-Glo (登録商標) 発光細胞生存率アッセイは、甲虫類ルシフェラーゼの組み換え発現に基づいた、市販されている (Promega Corp., Madison, WI) 均質アッセイ法である (米国特許第 5 5 8 3 0 2 4 号 ; 同第 5 6 7 4 7 1 3 号 ; 同第 5 7 0 0 6 7 0 号)。細胞増殖アッセイは、代謝的に活性な細胞の指標である ATP の存在量に基づいて、培養中の生きている細胞数を決定する (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993) ; 米国特許第 6 6 0 2 6 7 7 号)。Cell Titer-Glo (登録商標) アッセイは、自動化ハイスループットスクリーニング (HTS) を実施しやすいように 96 ウェルフォーマットで行った (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995))。均質なアッセイ手順は、血清添加培地にて培養した細胞に単一試薬 (Cell Titer-Glo (登録商標) 試薬) を直接添加することを伴う。

10

均質な「add-mix-measure」フォーマットにより細胞溶解と、ATP 存在量と比例した発光シグナルの生成が生じる。基質であるカプトムシルシフェリンは、ATP の AMP への同時転換と光子の生成と共に、組み換えホタルルシフェラーゼにより酸化的に脱炭酸される。生きている細胞は、相対的な発光単位 (RLU) に反映される。データは、ルミノメーター又は CCD カメラ画像形成装置によって記録されうる。発光出力は、経時的に測定された RLU として表される。%RLU は「非薬剤コンジュゲート」コントロールと比較した規準化した RLU 割合である。あるいは、発光からの光子をシンチラントの存在下でシンチレーション計測器にて計測することもできる。次いで、光単位は CPS (数/秒) として表されうる。

20

【0391】

チオMAb-薬剤コンジュゲートの有効性は、Cell Titer Glo 発光細胞生存率アッセイ (Promega Corp. Technical bulletin TB288 ; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)) を変更した、以下のプロトコルを用いた細胞増殖アッセイにより測定した。

1. およそ 3000 の BJAB、Grant a-519 又は WSU-DLCL2 細胞を培地に含む 40 μ l の細胞培養物分量を、384 ウェルの不透明な壁のプレートの各ウェルに置いた。
2. TDC (ThioMAb 薬剤コンジュゲート) (10 μ l) を、4 通りの実験ウェルに加え、10000、3333、1111、370、123、41、13.7、4.6 又は 1.5 ng/ml の終濃度にし、「非薬剤コンジュゲート」コントロールウェルは培地のみとし、3 日間インキュベートした。
3. プレートは、およそ 30 分かけて室温にした。
4. Cell Titer-Glo 試薬 (50 μ l) を加えた。
5. 内容物を環状振とう器上で 2 分間混合した。
6. プレートは、室温で 10 分間インキュベートし、発光シグナルを安定化させた。
7. 発光は、%RLU (相対的な発光単位) として記録し、グラフに表した。無薬剤-コンジュゲート培地にてインキュベートした細胞からのデータは 0.51 ng/ml にプロットした。

30

培地: BJAB、Grant a-519 及び WSU-DLCL2 細胞は、RPMI 1640 / 10 % FBS / 2 mM グルタミン中で生育させた。

40

【0392】

実施例 21: 抗TAHO ThioMAb 薬剤コンジュゲートによるインビトロ腫瘍増殖の抑制のためのアッセイ

A. Grant a-519 (ヒトマントル細胞リンパ腫)

投与した薬剤コンジュゲートと用量を変え、実施例 12 (上記参照) に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコルを用いた類似の試験において、CB17 SCID マウスの Grant a-519 異種移植片 (ヒトマントル細胞リンパ腫) におけるチオMAb 薬剤コンジュゲートの有効性を調べた。薬剤コンジュゲート及び用量 (すべての ADC 及びコントロールについて 0 日目に投与された) は以下の表 21 に示す。

コントロール Ab は、chSN8-MC-MMAF 又は MA79b-MC-MMAF と

50

した。コントロールHC(A118C)チオMAbは、チオhu-抗HER2-HC(A118C)-MMAFチオMAbとした。結果を表21及び図34に示す。

図34Aは、表21に示す用量の、重鎖A118C又は軽鎖V205C抗CD79bTDCにて処置したCB17SCIDマウスのGranta-519異種移植片の経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットするグラフである。具体的には、チオchSN8-HC(A118C)-MC-MMAF及びチオchSN8-LC(V205C)-MC-MMAFの投与は、ネガティブコントロール(抗hu-HER2-MC-MMAF及びチオhu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF)と比較すると、腫瘍増殖の阻害を示した。他のコントロールにはMA79b-MC-MMAFが含まれた。

さらに、同じ試験では、初めの14日間の体重変化の割合を各投与群で測定した。結果(図34B)は、これらチオMAb薬剤コンジュゲートの投与によりこの期間では体重の割合の有意な減少も体重減少も起こらなかったことを示した。

さらに、表21では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示し、NAは不適用である。(DAR=抗体に対する薬剤比)

表21

インビトロ腫瘍体積減少

チオchSN8-HC(A118C)-又はチオchSN8-HC(A118C) MMAF コンジュゲート投与

In Granta-519 ゼノグラフト in CB17 SCID マウス

抗体投与	PR	CR	投与量 MMAF ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	投与量Ab (mg/kg)	DAR (医薬 /Ab)
コントロールhu-抗HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6.8	4.0
チオコントロールhu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	191	6.8	1.85
コントロールchSN8-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2.3	3.0
コントロールchSN8-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6.8	3.0
チオchSN8-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2.3	1.9
チオchSN8-HC(A118C)-MC-MMAF	4/9	0/9	190	6.8	1.9
チオchSN8-LC(V205C)-MC-MMAF	0/8	0/8	60	2.3	1.8
チオchSN8-LC(V205C)-MC-MMAF	5/9	4/9	180	6.8	1.8

B. BJAB-cynoCD79b(TAHO40)異種移植片

投与した薬剤コンジュゲートと用量を変え、実施例12(上記)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコルを用いた類似の試験において、CB17SCIDのcynoCD79b(TAHO40)を発現するBJAB(パーキットリンパ腫)細胞(BJAB-cynoCD79b)異種移植片におけるチオMAb薬剤コンジュゲートの有効性を調べた。薬剤コンジュゲート及び用量(すべてのADC及びコントロールについて0日目に投与された)は以下の表22に示す。

コントロールAbはベヒクル(バッファ単独)とした。コントロールチオMAbは、チオhu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1、チオhu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF及びチオhu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE抗体チオMAbとした。結果を表22及び図37に示す。

図37は、表22に示す用量の、重鎖A118C抗CD79bTDCにて処置したC

B17 SCIDマウスのBJAB-cynoCD79b異種移植片の経時的な腫瘍増殖の阻害をプロットするグラフである。具体的には、チオ抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1、チオ抗cynoCD79b (TAHO40) (chD10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE及びチオ抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAFは、ネガティブコントロール(チオ-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1、チオ-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE及びチオ-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF及びA-ベヒクル)と比較して、腫瘍増殖の阻害を示した。

さらに、表22では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示し、NAは不適用である。(DAR=抗体に対する薬剤比)

表22

インビトロ腫瘍体積減少

チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C) DM1, MMAF又はMMAEコンジュゲート投与
In BJAB-カニクイザルCD79b (TAHO40) ゼノグラフト in CB17 SCID マウス

抗体投与	PR	CR	投与量 MMAF, MMAE or DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	投与量 Ab (mg/kg)	DAR (医薬 /Ab)
コントロールベヒクル	0/9	0/9	NA	NA	NA
チオコントロール hu- 抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1.86
チオコントロール hu- 抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	23	1	1.55
チオコントロール hu- 抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1.9
チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1.8
チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1.86
チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1.9

【0393】

C. BJAB-cynoCD79b (TAHO40) 異種移植片

投与した薬剤コンジュゲートと用量を変え、実施例12(上記)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコルを用いた類似の試験において、CB17 SCIDマウスのcynoCD79b (TAHO40)を発現するBJAB(パーキットリンパ腫)(BJAB-cynoCD79b)異種移植片におけるチオMAb薬剤コンジュゲートの有効性を調べた。薬剤コンジュゲート及び用量(すべてのADC及びコントロールについて0日目に投与された)は以下の表23に示す。

コントロールチオMAbは、チオ-hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1及びチオ-抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A1

18C)抗体チオMAbとした。結果を表23及び図38に示す。

図38は、表23に示す用量の重鎖A118C抗CD79b TDCにて処置したCB17 SCIDマウスのBJAB-cynoCD79b異種移植片の経時的な腫瘍増殖の阻害をプロットするグラフである。具体的には、チオ-抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1は、ネガティブコントロール(チオ-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1)と比較して、腫瘍増殖の阻害を示した。他のコントロールには、チオ-抗cynoCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)が含まれた。

結果を以下の表23に示す。表23では、PR=部分再生(投与後いずれかの時の腫瘍体積が0日目に測定した腫瘍体積の50%以下に落ち込んだ場合)又はCR=完全再生(投与後のいずれかの時の腫瘍体積が0mm³に落ち込んだ場合)を示す、試験したマウスの合計数のうちのマウス数を示し、NAは不適用である。(DAR=抗体に対する薬剤比)

表23

インビトロ腫瘍体積減少

チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C) DM1 コンジュゲート投与
In BJAB-カニクイザルCD79b (TAHO40) ゼノグラフト in CB17 SCID マウス

抗体投与	PR	CR	投与量 MMAF, MMAE or DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	投与量Ab (mg/kg)	DAR (医薬 /Ab)
チオコントロール hu- 抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1.86
チオコントロール抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	27	1	1.8
チオ抗カニクイザルCD79b (TAHO40) (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1.8

【0394】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、バージニア20110-2209米国(ATCC)に寄託した：

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA194917-3044	PTA-2985	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-8H9 (8H9.1.1)	PTA-7719	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-5C3 (5C3.1.1)	PTA-7718	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-7H7 (7H7.1.1)	PTA-7717	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-8D11 (8D11.1.1)	PTA-7722	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-15E4 (15E4.1.1)	PTA-7721	2006年7月11日
抗ヒト CD79a-16C11 (16C11.1.1)	PTA-7720	2006年7月11日
抗ヒト CD79b-2F2 (2F2.20.1)	PTA-7712	2006年7月11日
抗カニクイザル CD79b-3H3 (3H3.1.1)	PTA-7714	2006年7月11日
抗カニクイザル CD79b-8D3 (8D3.7.1)	PTA-7716	2006年7月11日

抗カニクイザル CD79b-9H11 (9H11.3.1) PTA-7713 2006年7月11日

抗カニクイザル CD79b-10D10 (10D10.3) PTA-7715 2006年7月11日

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に886OG 638を参照しての37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図1】

DNA225785

```
TGCTGCAACTCAAATAACCAACCACTGGGAGAAGATGCTGGGGGTCCAGGAGTCCTC
CAAGCTCTGCTGCCACCATCTTCTCTCTTCTGCTGCTGCTGCTACCTGGGCGCTT
GGTGCCAGGCGCTGTGGATGCACAAGGTCCAGCATCATTGATGGTGAGCCTGGGGGAA
GACGCCCACTTCCAATGCCCGCACAAATAGCAGCAACAACGCCAACGTACCTGGTGGCGC
GTCTCCATGGCACTACAGTGGGCGCCCTGAGTTCTTGGGCGCGGGCAGGACCCCAAT
GGTACGCTGATCATCCAGATGTGAACAAGAGCCATGGGGCATATACGTGTGCCGGGTC
CAGGAGGGCAACGAGTCATACAGCAGTCCTGCGGCACCTACCTCCGCGTGCGCCAGCCG
CCCCCAGGCGCTTCTTGGACATGGGGGAGGGCAACAAGAACCGAATCATCACAGCCGAG
GGGATCATCTCTCTGTTCTGCGCGGTGGTGCCTGGGACGCTGCTGCTGTTCAAGAAACGA
TGCCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGATGCGGGGATGAATATGAAGTGAACCTTTAT
GAAGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGACATCTCCCGGGGCTCCAGGGC
ACCTACAGGATGTGGGAGGCTCAACATAGGAGATGTCAGCTGGAGAACCGGTGACAC
CCCTACTCTGCGAGGCTGCCCCGCTGCTGTGCACCCAGCTCCAGTGTCTCAGCTCAC
TTCCCTGGGACATTCTCTTTTCCAGCCCTTCTGGGGGCTTCCTTAGTCATATCCCCAGT
GGGGGGTGGGAGGGTAACCTCACTCTTCTCCAGGCCAGGCTCCTTGGACTCCCTTGGG
GTGTCCCACTCTTCTCTCTCTTAACTGCCCCACCTCTTAACCTAATCCCCACGCCCCGC
TGCCTTTCCAGGCTCCCCCAGCGGTAATGAGCCCTTAATCGCTGCCTTAGGG
GAGCTGATTGTAGCAGCTCGTTAGTGTCAACCCCTCTCTCTGATGTCAGGCGCACT
TAGTGATAATAAATCTTCCCACTGC
```

【図2】

DNA225785

```
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSN
NANVTWVRVHLGNYTWPEFLGPGEDPNGTLIIQNVKSHGGIYVCRVQEGNESYQSCG
TYLVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITABGIILLFCAVVPGTLLFRKRWQNEKLGLDAGD
EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTVDVGSNLNIGDVQLEKP
```

シグナル配列

アミノ酸1-29.

膜貫通ドメイン

アミノ酸143-163.

イムノグロブリンドメイン

アミノ酸47-108.

免疫受容体活性化チロシンモチーフ

アミノ酸185-205.

N-グリコシル化部位

アミノ酸57-60, 63-66, 73-76, 88-91, 97-100, 112-115

カゼインキナーゼIIリン酸化部位

アミノ酸45-48, 197-200, 209-212.

N-ミリスチル化部位

アミノ酸6-11, 102-107, 175-180, 205-210.

リボソームタンパク質S2サインI

アミノ酸16-27.

10

20

【図 4】

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRWQSPRFITARKGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQENDENPQQLKLEGRMEESQNESLATLTIQIGRIFEDNGIY
FCQQCKNNTSEVYQCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

アミノ酸 1-28.

アミノ酸5-25, 159-179.

アミノ酸58-124.

アミノ酸193-213.

アミノ酸73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

アミノ酸49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

アミノ酸 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

アミノ酸113-120.

アミノ酸 40-45, 118-123.

【図 6】

<p1 .カニクイザルCD79a

シグナル配列

アミノ酸 1-32.

膜貫通ドメイン

アミノ酸142-162.

イムノグロブulinリンドメイン

アミノ酸184-204.

免疫受容活性化チロシンモチーフ

アミノ酸47-107.

イムノグロブリンV-セットドメイン

アミノ酸 32-125.

N-グリコシル化部位

アミノ酸 57-60, 62-65, 72-75, 87-90, 96-99.

カゼインキナーゼⅡリン酸化部位

アミノ酸45-48, 196-199, 208-211.

N-ミリストイル化部位

アミノ酸6-11, 37-42, 58-63, 83-88, 101-106, 174-179, 204-209.

リボソームタンパク質S2サイン1

アミノ酸 16-27.

【図 7】

421. *カンニクイ#1* (CD79b)
CTATGGTGTATGTGATGATGATGACCGGTACCGGTATGATTCGACGACGAGAGAGGTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAAACCG
CGGCGCTCTTACAGCTGACGCGCGCCACTGTGTGGATATCTCGAAATTCGCCCTTGGGACAGACGATGACGATCGCCTAGG
CAGGCTGGGGTGTGTCTCTGTCTGCTGAGTGGTGGCTGTCTGTCTGTCTCTGACAGAGCCAGTGCAGTTCATGAC
CAGCCAAATTCAGAGAGCTGTGATCCGAGATCTCCAAAGGTGGTGTCTTTCGATCTCGAGCTGACAGAGCCAGCCAGTTCATGACG
AGGAAACCGGGGTCTTACGCTGTGAAATGTGATCTTGTGATGACACAGACATCTAGCATCTGATGTAGCTGGCTCCGGAAGCC
GAGGACGAGGACGAGGACCCCAAGGTGAACTCTGAGGACGAGGCCCATGTCATCGACCAAAACAGCTCTCTCCACACCC
TCATCATTCGAAGATACCGGTTTGGGAGACAGCGCATCTATCTTCTCAGACAGATGACGACAGCATCTCGGAGGTGTAC
CGGGGCTCGGCACTGAGGCTCGAGTATGGGGTTCAGCATCTTTCGACAGGACGACGACGACAGACAGCATCGGAGGTGTG
CATCATCATGATTCAGACCGCTGTGATCATCTTCTCATCTTACCATTTGCTTCCTGTGGACAGAGATGACGACGAC
CGGACCGGCAATGAGAGAGGATACCACTACAGAGGCTGGACATTCAGGAGTTCAGGAGTTCAGGAGTTCAGGAGTTC
CGGACGAGGAGAGTGAAGTGGTGTCTTGGCTGACGACCCACCGAGCTCAGGAGTTCAGGAGTTCAGGAGTTCAGGAGTTC

【图 9】

キメラ抗ヒトCD79b(chSN8)軽鎖

GACTCCGACGTCGACCTCGGTTCTCATCGATTGAAATTCGACCAAGGGAGATGGTCAATGATCACTCTTTTCTAGTAA
 GGAAATCTCTGGAAGTCAATTCGAAATCTGGTGCACCAATCTGAGCTTTTCTGGCTGCTGCTCGGAGCAGAGGCG
 CACACATCTCCTGACGAGCAGCACAAGATGGTATGATGATCGGTGATGTTTCTTGAATGATGATCAACGAGAACGAGAC
 AGCACCACCAACTTCATCTATGCTGCAATCGAATCTAGAAATCTGGGATCCCAACGAGGTTTATGTGCGACGTGGGCTGGG
 CAGACATCTTCCCTCAACATCTGCTTGGAGAGAGAGAGTCTGCAATCTATCTGTCAAGAGAGTAAATGAGAAATCTG
 GCGATCTCTCGGGCGAGCAGCACCGAGCTGCGAGCTGGCTGCACTATCTGCTCTTCACTTCCTCGCCATCTCG
 ATGACAGCAGTTGAAATCTGGACCTGCTCTGTTGTGTGCTGCTGCTGAAATCACTCTATCCAGAGAGCGCCCAAGTATCAGTGG
 TACAGGTTGGATTAAGCGGCTTCAGATCCGACGAGAGATGTCACCGAGAGAGTCAACAGAGCAGACGACCTACAGCTCT
 CACAGCAGCACGCTTCAGCTCAGCAAGAGAGTCAAGAAATGTTACAGCTCTGCAAGTCAACCACTCAGGCGCTGGA
 GCTCGCCGCTCACAAGAGCCTTCAACAGGGGAGAGTGTATAGCTTGGCGGCAATGGCCCAACTTGTGTTATTTGACGAGTAT
 TAAATGGTTTCAAAATTAAGCAATAGCATCAAGAAATTTTTCCTACGCAATCTAGTGTCTGGTTGTGTC
 CAACATCTCAATGTTCTCTTCAATCTCGAATCTCGGAAATTAATTAATCTCGGC

【図 8】

<p1.カニクイザルCD79b

MARLALSPVSSHVLVALLLLLSAAEPVPAAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCVYTNSTFSIYLWLRKRETDKEPQQVNLQGHMHQTQNSVTTLLIQDIRFEDNGIY
QFCQRCSTSEVYRGCGTELRYMGVSTLALQKRNLT.KDGIIMQTLILFIIVPIFLLL
DKDSSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

シグナル配列

アミノ酸 1-26.

膜貫通ドメイン

アミノ酸 161-181.

イムノグロブリンDメイン

アミノ酸 59-126.

免疫受容活性化チロシンモチーフ

アミノ酸 195-215.

イムノグロブリンV-セットドメイン

アミノ酸 44-145.

N-グリコシル化部位

アミノ酸 70-73, 103-106.

CAMP-及びCGMP依存タンパク質キナーゼリン酸化部位

アミノ酸 81-84.

タンパク質キナーゼ

アミノ酸50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216.

カゼインキナーゼⅡリン酸化部位

アミノ酸22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226.

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸115-122.

N-ミリストイル化部位

アミノ酸41-46, 120-125.

【図 10】

キメラ抗ヒトCD79b(chSN8)軽鎖

DIVLTVQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDVDYDGDSTFLNYYQKPGPPKLFYIYAASNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQSNEDPLTFGAGTELELKRITVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図 1 1】

キメラ抗体 CD79b(chSN8)重鎖

TGGTTCTATCGATTGAATTCACCAATGGGATGGTCAATGATCATCTCTTTTCTAGTAGCAATCGCAATCGAGTACATT
CAGAAAGTTTCAGCTGACAGCTGGGGCTGAATGATGAAGCTGGGGCTCAGTAGAATATCTCTGCAAGCTACTGCTGTC
TACACATTCAGTACTACTGATAGAGTGGTAAAGAGAGGCTGGACATGGCTTGGAGTGGATGGAGAGATTTTAC
TGGAGTGGTGTACTACTCAATAGATTTTCAAGGGCAAGGCCATTTCACTGAGATACATCTCTCCACACAGCT
ACATCAACTCAGACGCTGACATCTGAGAGCTCTGCGCTCTATCTGTAAGACAGATACCGTTTCTTCTTGATAC
TGGGGCCAGAGAACTCATCTACCGCTCTCTGAGCTCTCAACAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGGACCTCTCTCA
GACACCTCTGGGGGACACAGCGGCTGGGCTGGCTGAGGACTACTTCCCGAACCGCTGAGGCTGGTGGTGGAACT
CAGGCGCTCTGACAGCGGCTGACACCTTCCGGCTGCTCTACAGTCTCTCAGGACTCTCTCTCAGCAGCGTGGT
ACTGGGCTCTGAGAGCTTGGGACCCAGACCTCATCTGCMACGTGAATCAACAGCCAGCAACACCAAGTGGACAA
GAACTTGGCCCAATCTTGTGCAAAACTCAACATGCCCCGCTGCCAGACCTGACTCTCTGGGGGACCGCTCAG
TCTTCTCTTCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACTGCTGGTGGTGGAGTG
AGCCAGAGACCTTGGGTCAAGTTCACTGGTACGTGAGCGGCTGGAGTGCATAATGCCAAGCAAGGCGCGGA
GGAGCAGTACAAACAGACACTACCTGCTGGTCAAGCTCTCCGCTCTGACCGAGCTGCTGATGCGAGGATGCA
AGTGAAGTCTCCCAAGGCTCTCCAGGCTCTCCAGGCTCTCGAAGAACATCTCCAAAGCAAGGCGGCGCGGAGCA
CAGGTGTACACCTGCGCCCAATCCCGGAGAGATGACAGAACAGGTGAGCTGACTGCTGCTCAAGGCTTCTA
TCCAGCGACATCCGCTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCGGAGAACAACTCAAGACACACGCTCTCCGCTGCTGCT
CCGAGCGCTCTTCTCTCAGCAGCTACCGTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
GTGATGCTAGAGGCTCTGCAACACCACTACACGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
GAGTCGACCTGCGAAGCTTGGCGGCTCAT

【図 1 2】

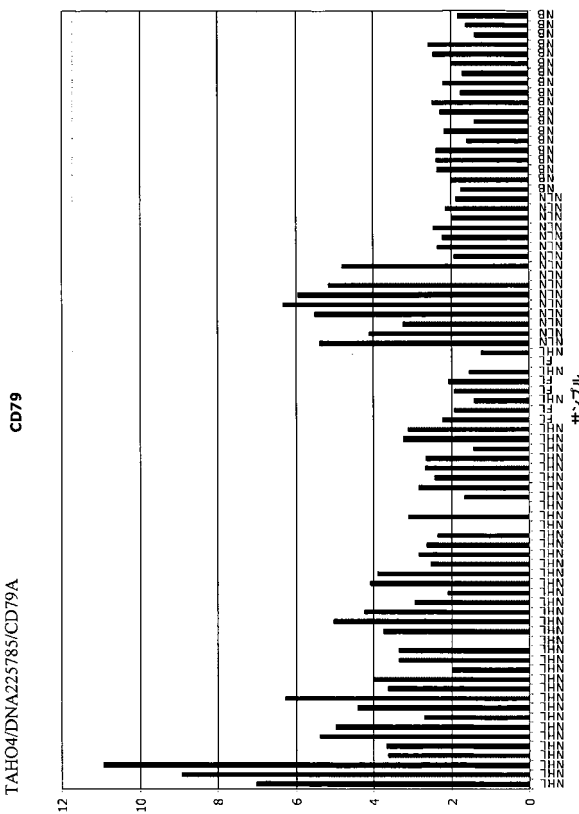
キメラ抗体 CD79b(chSN8)重鎖

EVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFSSYVWVVKQRPQHGLEWIGEILPGGGDTN
NEIFKKGKATPTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSTVTVSSAST
KGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLQTQTYICNIVNHPKPSNTKVDKKVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSV
FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVENESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLSPG

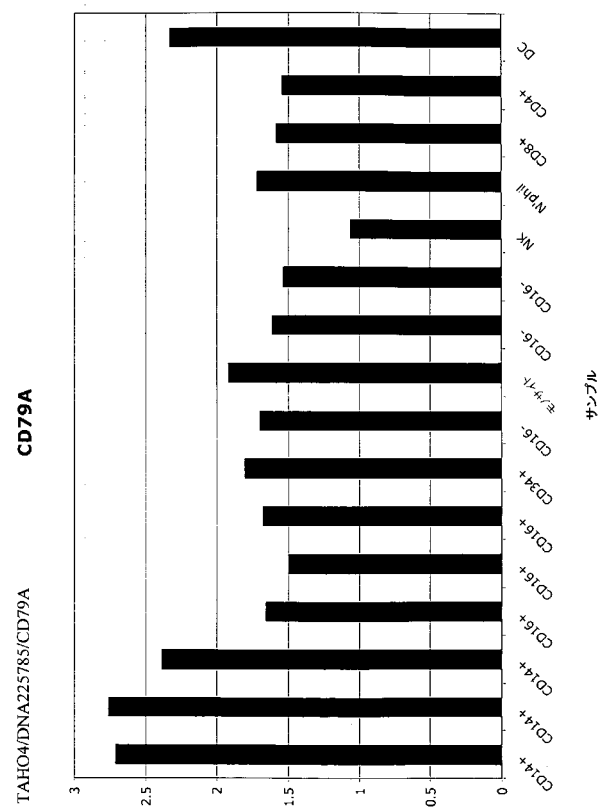
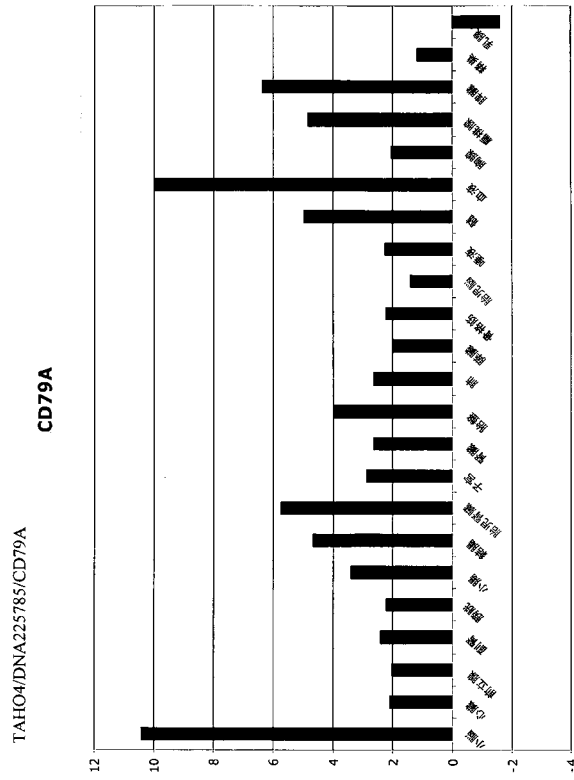
【図 1 3】

シグナル配列		試験ペプチド	
hCD79b	1	MAKALALFVPSWVWVALLLLLSAEF-VFAAKSEDRVRNPKGSACSRIMQS	49
Cy _h CD79b	1	MAKALALFVPSWVWVALLLLLSAEF-VFAAKSEDRVRNPKGSACSRIMQS	50
mCD79b	1	MAKALALFVPSWVWVALLLLLSAEF-VFAAKSEDRVRNPKGSACSRIMQS	49
hCD79b	50	PRRIARRKGFVKKMHCTM--SASNVSWMKRMENPQQVKKHKKRMBE	96
Cy _h CD79b	51	PRRIARRKGFVKKMHCTM--SASNVSWMKRMENPQQVKKHKKRMBE	100
mCD79b	50	PRRIARRKGFVKKMHCTM--SASNVSWMKRMENPQQVKKHKKRMBE	96
hCD79b	99	SONESLATLTIGQIRFEDNGIYFCQKCM--NTSEVYKGGCGTELRVMGFST	147
Cy _h CD79b	101	TONSSVTLTIQDIREFEDNGIYFCQKES--KTSEVYKGGCGTELRVMGFST	149
mCD79b	97	TONSSVTLTIQDIREFEDNGIYFCQKES--KTSEVYKGGCGTELRVMGFST	146
TMFサイン			
hCD79b	148	LAOLKORNTLKDGIIMQTLIIILFIIVPIIFLLDKDDSKAGMEEDHTYE	197
Cy _h CD79b	150	LAOLKORNTLKDGIIMQTLIIILFIIVPIIFLLDKDDSKAGMEEDHTYE	199
mCD79b	147	LAOLKORNTLKDGIIMQTLIIILFIIVPIIFLLDKDDSKAGMEEDHTYE	196
ITAMサイン			
hCD79b	198	GLDIDQATATYEDIVTLRTGEVKWVSVGEHPGQE	229 SEQ ID NO. 4
Cy _h CD79b	200	GLDIDQATATYEDIVTLRTGEVKWVSVGEHPGQE	231 SEQ ID NO. 8
mCD79b	197	GLDIDQATATYEDIVTLRTGEVKWVSVGEHPGQE	228 SEQ ID NO. 13

【図 1 4 A】

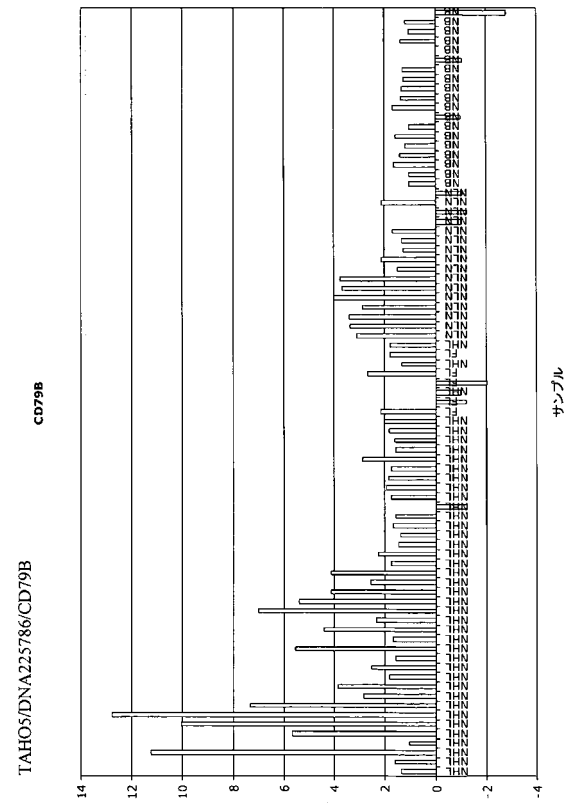
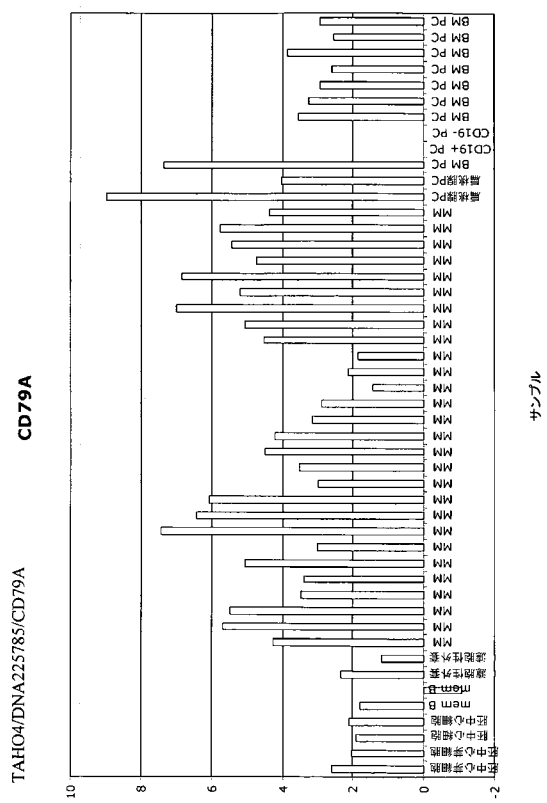


【図 1 4 C】

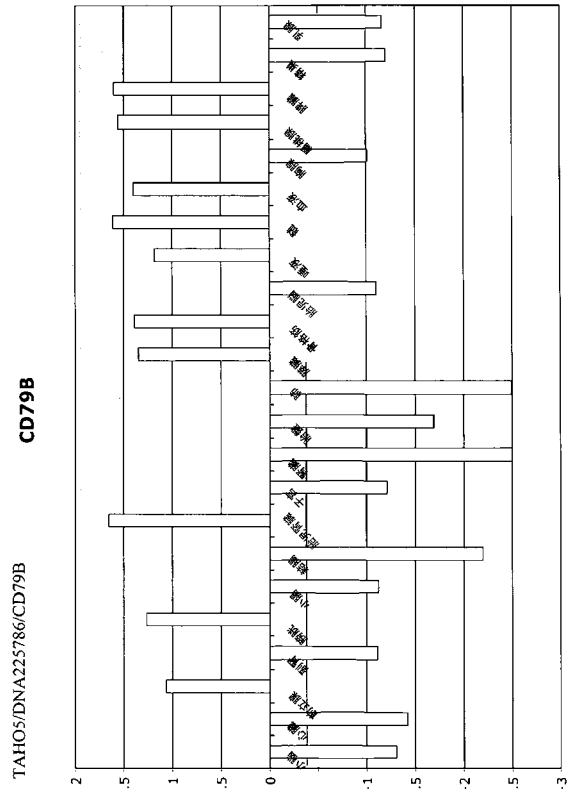


【図 1 4 D】

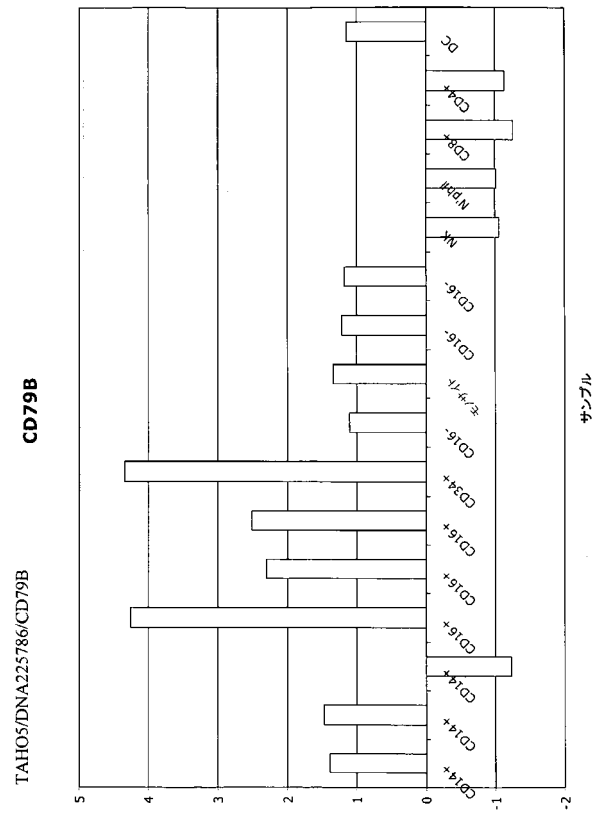
【図 1 5 A】



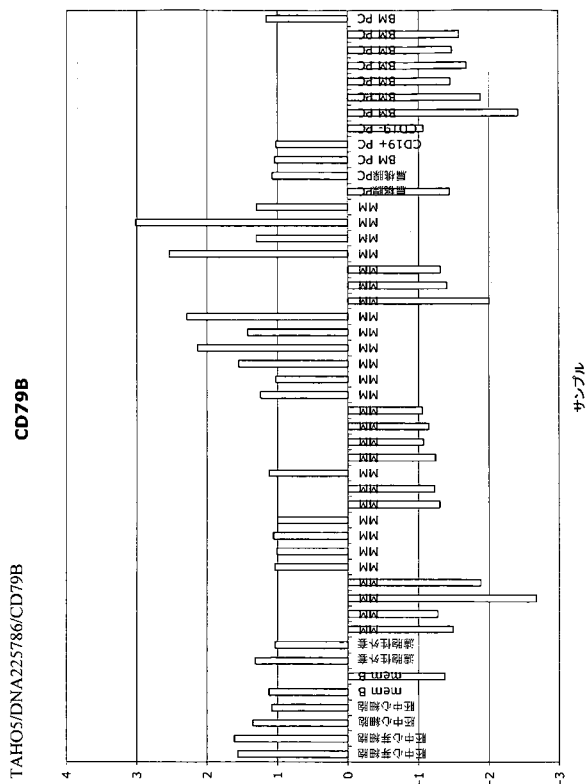
【 図 1 5 B 】



【図 1 5 C】



【図 1 5 D】



【 図 1 6 】

キメラ抗ヒトCD79b(2F2)軽鎖

GATATCGTGTATGACCCAGAGCTCCACTACTTTGGTCGGTTACCATGTGACCAACAGCCTCCATCTCTCGAAGTCAAGTCA
GAGCCTCTTAGTATAGTATGGAAGACATATATGAATGGTTATACAGAGCGGACGAGCTCTCGAGCGCGCTTAATTT
ATCTGTGTGCTAAATAGTATCTTGAGTCTCTCGAGGTCCTGAGGTCTGCTGAGGTGATACGAGGACAGATTTCCACATCAAAAT
ACGAGATGAGGCTTGGGAGATTTGGGAGATTTGTTGTCTCGAGAGTACATATTTCCGTGATCGCTTCGAGGGGGGTAC
CAAGGTGTGGAGTCAAGCAAGCTTTGGAGTGACATCTGTCTTATCTCCGCGCATCTGTGAGACAGATTTGAAATCTGGAA
CTGTCTCTTGTGTGCTGTGAAATCTTCTATCCGAGAGAGGCGAAATGATCTGAGGAGGTGAGTATGAGCCCTCGA
CTCGGTAACTCCGAGAGAGGTGTCCAGAGACAGACAGAGACAGCTTACAGCTTCAGAGGTGAGTCTGAGCAGCTCGAG
CAAAAGCGGAGTACAGAAATCAAAAGTTCTAGCTCTCGAGTCAACCAATCAGAGGCGCTGAGCTGCGCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGCGGAGTACAGAGTGT

【図 17】

キメラ抗体-CD79b(2F2)重鎖

DIVMTQPLTSLVTLIQGPASISCKSSQSLDSOCKYLNMLLQRFQOSPERLLIYLSKLDSCVPDRFTGSGSGDTFLIKI
 SVREADIGVYCCWQGTFFPIFGGGIKVKEIKTIVAFSVHIFPPSDDEQLKSGTASVYVCLLNINYPREAKYQWKVDNALQ
 SGNQESVTEQDSKDSITYSLSSLTILSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図 18】

キメラ抗体-CD79b(2F2)重鎖

CAGGTTCAACTCCAGCAACCTGGGCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGGCTTCACTGAGAGCTGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTA
 CAGCTTTCACCACTACTCGATGAACCTGGTGAAGCAGAGGCTTGGACAAGGCTTGAATGGATTCGGTATGATTGATCTCTT
 CAGACAGTGAACCTCAGTACATCATATCTTCAGAGGACAAGGCACTTTGACTGTAGACAAATCTCTCAGACAGGCTTAC
 TTGCAGCTCAGCAGGCTGAGCACTTCGGCTCTATTACTGTGCAAGAACTCTACTTGTGGGTCAAGGAC
 CTGAGTCAAGCTGTCTTACCTTCACAGGGGCCCATTCGGTCTTCCCTGGGACGCTCTCTGCAAGGACGCTCTGGGG
 GCACAGGGCCCTGGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAGCGGTGACGGTGTCTGTGAAGCTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGTGCACACCTTCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCTCAGCAGCGGTGGTGAAGTGTGCGCTCTAG
 CAGCTTGGGCACCCAGACCTTACATCTGCAAGTGAATCAAGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTGAGCCCA
 AATCTTGTGCAAAACTCAGCATGCCACCTGCCAGACCTGAACTCTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAAACCAAGGACAACCTCATGATCTCCGGACCTTGAAGTCAATGCTGGGTGAGCTGAGCCACGAGACCC
 TGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGCTGGAGGCTGCAATATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGTACAGTCAACA
 GCAGTACCGGCTGCTCAGGCTCTCAGCTCTGCAACAGGCTGGTGAATGGCAAGAGTACCAAGTGCAGGCTCTCC
 AACAGGCTCTCCAGGCCCATCGAAGAACCACTCTCCAGGCAAGAGGCAAGCCGAGAACCAAGCTGTACAACCT
 GCCCATCTCCGGGAGAGATGACCAAGAACAGGTCAGGCTGACCTGCTGCTGAAGGCTTCTTCCGACGACATGG
 CCTGTGAGTGGAGAGCATATGGGCGAGGAGACACTTACAGACCAAGCCCTCCGCTGAGCTCCGAGGCTCTCTTC
 TTCTCTACAGCAGCTCAAGCTGGACAAGAGAGGTTGSCAGCAGGGGAAGGCTTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGC
 TCTGCACAAACCATACAGCAAGAGGCTCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

【図 19】

キメラ抗体-CD79b(2F2)重鎖

QVQLQQPGAEIVRPGASVILSKASGYTFTSYMMRWVKQRPQGLEWIGKMTIDPSDSETHYHILFKDKATLIVDKSSSTAY
 LQLSLTSEDGAVYICARMLXLMGQGTSTVIVSLASTIGPSTFPLAPSSKSTSGGTALNGLCLVDYTFEPVITVSNWGALT
 SGVHTFAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSLGITYICNVNHKFSNTKVDKKVHPKSCDKHTCCPCPAPELILGGPSVFLPP
 PKPDRLTMSRTPEVTKCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGVHNAKTRPEEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKALPAPFIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTTTPPVLDSGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVPSGVWHEALHHNHYTKQSLSLSPG

【図 20】

キメラ抗体-クニクニザルCD79b(ch10D10)

ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCAATGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTCTAGT AGCAACTGCA
 ACTGGAGTACATTACAGATATCGTGCTGACC GAATCTCCAC CCTCTTTTGGC TGTGTCTCTA GGCACAGGG
 CCACCATATC CTGCAGAGCC AGTGAAAGTG TTGATAGTTA TGGCAAACT TTTATGCACT GGCACAGCA
 GAAACAGGA CAGCCACCA AACTCTCAT CTATCTGTA TCCAACTAG AATCTGGAT CCCTGCCAG
 TTGAGTGCA GTGGGTCAAG GACAGACTC ACCCTACCA TTATCTCTGT GGAAGCTGAT GATGTTGCA
 CCAATATCTG TCACCAAGT AATGAGATC GGTTCAGT CCGTGGAGC ACCAGCTGG AATCAAG
 GACCGTGGCT GCACCATCTG TCTCATCTT CCGGCCATCT GATGAGGAT TGAATCTGG AATGCTCTT
 GTTGTGTCC TGTGATTA CTTTATCCC AGAGGGCCA AAGTACAGTG GAAGTGGAT AAGCCCTCC
 AATCGGTAA CTCCAGAG AGTGTACAG AGCAGGACAG CAAGGACAG AACTACAGC TCAGCAGAC
 CCTGAGCTG AGCAAGCAG ACTACAGAA ACACAAAGT TACGCTTGG AAGTCACCA TCAGGGCTTG
 AGCTCCGCC TCACAAAG CTTCAACAG GGAGGTGTT AAGCTTGGCC GCCATGGCC AACTTGTTA
 TTGCAGCTTA TATGTTTAC AAATAAGCA

【図 21】

キメラ抗体-クニクニザルCD79b(ch10D10)

DIVLTQSPFSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGTKTFMHHWHQKPKGQPPKLLIYRVSNLES
 GIPARFSGSGSRDTDFLTINPVEADVDVATYYCQSNEDPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDDEQLKSGTASVYVCLLNINYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSL
 STLTLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図 2 2】

キメラ抗カニクイザルCD79b(ch10D10)重鎖

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACAG TGGGATGGTC ATGTATCATC CTITTTCTAG TAGCACTGCG
AATCTGAGTA CATTTCAGAG TTGAGCTGCA GGAGTCGGGA CTTGGCTG9 TGAACCTTC TCGAGTCTTG
TCCCTTCACT GCATCTGAC TCGCTACTA ATCAACAGTG ATTATGCTG GAACCTGATC TCGAGTCTTG
CAGAAACAA ATGAGAGTG ATGGGACAA TATGTGACAG TCTGTGACT ACTACAC CATTCTTCAA
AGGTCAATC TCTATCATC GAGACATC CAAGAACAG AGTCACTCT TCTTCTGCTG TGTGACTCT
GAGGACAG CCAATATTA CTGTTCAGAG ATGGACTCT GGGTTCAGG CACCACTCT GAGTCTCT
CAGCTCCAC CAAGGCGCA TGGTCTTTC CCCTGGCAC CTCTTCAAG AGCACTCTG GGGCAGAC
GGCTCTGGG TCCCTGGTCA AGGACTACT CCCTGAACT GTGAGGCTG GTGAGGCTG AGGCGCTG
ACAGGGGCG TGCACACTT CGGCTGTG CTACAGTCT CAGGACTCTA CTCCCTGAGC AGGTGGTA
CTGTGCTTC TAGCAGCTTG GGCACCCAG CTAAGTCTG CACGTGAT CACAGTCA CACACACAA
GGTGACAG AAGGTTGAG CCAATCTTG TGACAAACT CACGATGCG CACGCTCC AGCACTGAA
CTCTGGGGG GAGCTGAGT CTCTCTTC CCCCAGAAC CCAAGACAC CCAATGACT CCGGAGCC
CTGAGTCA C ATGGTGGTG GTGAGCTGA GCGACGAGA CCGTGAAGT AGGTTCACT GGTGCTGGA
CGGCTGGAG GTGATAATG CAGACGAGA CCGGAGGAG GAGGATGCA CAGGATGCA TCCACGAG
AGGCTCTCA CCGCTCTGA CAGGACTCT CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA
CCCTCCAC CCGCTCTGA AAGCACTCT CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA
CCTGCGCA CCGGCTGAG AAGTCACT CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA
CCAGGACA TCGGCTGAG GTGAGGAG AAGTCACT CCAAGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA
TGTGACTC CAGGCTCTT TCTCTCTC ACAGGAGT CAGGCTCTC ACAGGAGT CAGGCTCTC
GAGGCTCT TATGCTCTG TATGCTCTG TATGCTCTG TATGCTCTG TATGCTCTG TATGCTCTG
TCTCGGTTA AATGAGTGG AGGCTCTG CAGGCTCTG CAGGCTCTG CAGGCTCTG CAGGCTCTG
TTATGTCAG TTATGTCAG TTATGTCAG TTATGTCAG TTATGTCAG TTATGTCAG TTATGTCAG

【図 2 3】

キメラ抗カニクイザルCD79b(ch10D10)重鎖

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSYDAWNWIRQFPNGKLEWMGNWYSGSTTY
NPSSLKRSISITRDTSKNQFFLQLNSVTSSEDTATYYCRSMDFWQGGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPELPGGSLVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYINSTRYRVSV
LTVLHQDLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SYMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【図 2 4 A】

pDR1

1 TTC GAG CTC GCC CGA CAT TGA TTA TTG ACT AGT TAT TAA TAG TAA TCA
49 ATT ACG GGG GTA TTA GTT CAT AGC CGC TCA TAT TAA TAA TAA TCA
97 TAA CTT ACG GTA AAT GGC CGC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
145 CCA TTT ACG TCA ATA ATG ACG TAT GTT GGT CCC ATA ATA ACG CCA ATA GGG
193 ACT TTG CAT TGA CGT CAA TGG TGG GTG GAG TAT TTA CGG TAA ACT GCC CAC
241 TTG GCA GTA CAT CAA GTG TAT CAT ATG CCA AGT ACG CCC CCG ATT GAC
289 GTC AAT GAC GAT AAA TGG CCC GCG TGG CAT TAT GCG CAG TAC ATG ACC
337 TTA TGG GAC GTT CCT ACT TGG CAG TAC ATC TAC GTA TTA GTC ATC GCT
385 ATT ACC ATG GTG ATG CGG TTT TGG CAG TAC ATC AAT GGG CGT GGA TAG
433 CGG TTT GAC TTA CGG GGA TTT CCA AGT CTC CAC CCC ATT GAC GTC AAT
481 GGG AGT TTG TTT TGG CAG CAA AGT CCA CGG GAG CCG ATT GAC GTC AAT
529 AAC AAC TCC GCC CCA TTG ACG CAA ATA ATG GGC GGT AGG CGT GTA CGG TGG
577 GAG GTC TAT ATA CGC AGA SCT GGT TTA GTG AAC CGT CAG ATC GCC TGG
625 AGA CGC CAT CCA CGC TGT TTT GAG CTC CAT AGA AGA CAG CGG GAC CGA
673 TCC AGC CTC CGC GGC CGG GAA CGG TGC ATT GGA ACG CAG ATT CCC CGT
721 CGC AGT GAG GAG GTA AGT ACG GCC TAT ATA GTC TAT AGG CCC ACC CCC
769 TTG GCT TGT TTA GAA CGC GGC TAC AAT TAA TAC ATA ACC TTA TGT ATC
817 ATA CAC ATA GAA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA ACG TCC ACT TTG CTT
865 TTT TCT CCA CAG GTG TCC ACT CCC AGG TCC AAC TGA ACC TGG GTT CTA
913 TCG ATT GAA TCT CAC C **ATG** GGA TGG TCA TGT ATC ATC CTT TTT CTA
959 GTA GCA ACT GCA ACT GGA GTA CAT TCA GAT ATC CAG ATG ACC CAG TCC
1007 CGG AGC TCC CTC TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG GTC ACC ATC ACC TGC
1055 CGT GCC AGT CAG GAC ACT CGT AAT TAT TTG AAC TGG TAT CAA CAG AAA
1103 CCA GAA AAA CGT CCG AAG CTA CTG ATT TAC TAT ACC TCC CGC GTG GAG
1151 TCT GGA GTC CCT TCT CGC TCT TCT GGT TCT GGT TCT GGG AGC GAT TAC
1199 ACT CTG ACC ATC AGT AGT CTG CAA CGG GAG GAC TTC GCA ACT TAT TAC
1247 TGT CAG CAA GGT AAT ACT CTG CGC TGG ACG TTT GGA CAG GGC AAC AAG
1295 GTG GAG ATC AAA CGA ACT CTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CGG
1343 CCA TCT GAT GAG CAG GTG AAA TCT GGA ACT GGC TCT GTT GTG TGC CTG
1391 CTG AAT AAC TCT TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT
1439 AAC GCC CTC CAA TGT GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC
1487 AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA
1535 GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTG TAC GGC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
1583 GGC CTG AGC TCG CCC CTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT **TAA**
1631 GCTTGCCGCG CATGGGCCAA TCTGTTTAT TCGAGCTTATA ATGTTTACAA ATAAGCAAT
1691 AGCATCACAA ATTTGCAAAA TAAGCACTTT TTTTCACTG ATCTAGTGTG TGGTGTGCTC
1751 AATCTCATCA ATGCTCTTTA TCATGTCTGG ATCGATCGGG AATTAATTCG GCGCAGCAC
1811 ATGCGCTGAA ATAACTCTTA AAGAGCAAC TTGTTTATG AGCTCTCTAG GCGAAGAA
1871 CAGCTGTGCT ATGCTGTGTC TCGAATGTC CCAAGCTCTC CAGAGCTGCG CAGCAGCGAG
1931 AAGTATGCAA AGCATGCAAC TCAATATGTC AGCAACAGG TGTGAAAGT CCGCAGCTCT
1991 CCAAGCAAGC AGAAGTATGC AAGCAATGCA TCTCAATAG TCAGCAACCA TAGTCCCGCC
2051 CTTACTCTCG CCACTCCGCG CCACTACTCT GCGGCTTTG CCAATCTCT CCGCCCATGG
2111 CTGACTAAT TTTTATTTAT ATGCAAGGCG CAGAGCGCGC TCGGCTCTG AGCTATTCCA
2171 GAGTAGTGA GGAGGCTTTT TTGAGGCGCT AGGCTTTTTC AAAAGACTGT TAACAGCTGT
2231 GCACTGGGCG TCGTTTTCACA ACGTCTGTGAC TGGGAAAACC CTGGGCTTAC CCACTTTAAT
2291 GCGCTTTCGAG CACATCTCCG CTTGCGCCAG TCGGCTAATA GCGAAGAGGC CCGCAGCGAT
2351 GCGCTTTCCT AACAGTTTGG TAGCTGTAAT GGCAGATGCG GCCTGATGCG GTATTTTCTC
2411 CTGACGATC TGTGCGGTAT TTACACAGC ATAGCTCAA GCAACATAG TACGCGCCCT
2471 GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGTATTACGC CAGCGTGACC GCTACACTTG

【図 2 4 B】

2531 CCAAGCGCCCT AGCGCCCGCT CTTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG
2591 GCTTTCGCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGCG TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGTCTTTAC
2651 GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT
2711 GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAAATAGT GGAATCTTGT
2771 TCCAAACTGG AACAAACACT AACCTATCT CCGGCTATTC TTTTGAATTA TAAGGATTT
2831 TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA ACATAAATTT AACCGAATTT
2891 TTAACAAAAA ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAAT TGCTCTGATG
2951 CCGCATAGTT AAGCAACACT CGCTATGCTT ACGTGACTGT GTCATGCTG CGCCCGCAGA
3011 CCGCCCAACA CCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTGTCTG CTCCCGCAT CCGCTTACAG
3071 ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCAACCT CATCACCGAA
3131 ACGCGGAGG CAGTATCTTT GAAGACGAAA GGGCTCTGAT ATACGCTTAT TTTTATAGT
3191 TAATGTCTAT ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG
3251 CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACAATCAAA ATGTATCCG TCAATGAGACA
3311 ATAAACCTGA TAAATGCTTC AATAAATATG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TCAACATTT
3371 CCGTGTGCGC CTIATTCCTT TTTTTCGCGC ATTTTGCCTT CTTGTTTTTG CTCACCCAGA
3431 AACGCTGTGT AAAGTAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGT GTTATATCGA
3491 ACTGGATCTC AACAGCGGTA AGATCTTTG GAGTTTTGCG CCGGAAGAAC GTTTTCCAAT
3551 GATGAGCACT TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CCGGCTATTA TCCCTGTGAT ACCTCGGCGA
3611 AGAGCAACTC GGTGCGCGCA TACACTATG CAGAAATGAC TTGTTTGAAT ACTCACGAGT
3671 CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGCGATGAC AGTAAGAGAA TTATGCACTG CTGCAATAAC
3731 CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACT ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT
3791 AACCGCTTTT TTGCACACA TGGGGGATCA TGTAATCTCG CTTGATCGTT GGGAACCGGA
3851 GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCAAG ATGCCAGCAG CAATGGCAAC
3911 AACGTTGCGC AAACATATTA CTGGGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGCG AACAAATTAAT
3971 AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGAGG ACCACTTCTG CCGCTCGGCC TCCCGCTGG
4031 CTGTTTAT TCTGATAAAT CTGAGACCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGAGC
4091 ACTGGGGCCA GATGTAAGT CCTCCGATG CAGTAGTCT TACACGACG GAGTCAAGC
4151 AACTATGATG GAACGAAATA GACAGATGCG TGAGTAGAGT GCCTCACTGA TTAAGCATGT
4211 GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTAGAT GATTAAAAA TCTATTTTAA
4271 ATTTAAAGAG ATCTAGGTGA AGATCTTTT TATATATCT ATGACCAAAA TCCCTTAAAG
4331 TGAGTTTTG TTTCACTGAG GTTCAAGACC GTTCAAGACC ATCAAGGAT CTTCTTGAGA
4391 TCTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAACAAAAA AAACACACCG TACCAGCGGT
4451 GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAACTG GCTTACGAGC
4511 CCGCGAGATA CCAATACCTG TCTTCTAGT GTAGCCGATG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA
4571 ATCTGTAGCA CCGCTACAT ACTCTGCTCT GCTAATCTCT TACCAAGCTG GTTTCGCGA
4631 TGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGTTTGA CTAAGACAGA TAGTTACCGG ATAAGCGCGA
4691 GCGGTGCGGC GTTCCGTTAG CAGACCGAGG GTTCCGTTAG GAGTAACTG CGACATACAC
4751 GCAACTGAGA TACCTACAGC GTAGCATGTG AGAAGCGCGC ACGCTTCCCG AAGGAGAGAA
4811 GCGGAGACAG TATCCGTTAA TCCCGTAA CCGGACAGGT AGCAACAGGA GAGCGACAGA GGGAGCTTCC
4871 AGGGGGAAAC GCGTGTGATC TTTATAGTTC TGTGCGGTTT CGCCACCTCT GACTGTAGCG
4931 TCGATTTTTT TGATGTCTGT GAGTCTGCTG CAGGSGGGGG GAGTCTATG AAAACCGCGA GCAAGCGCGC
4991 CTTTTCAGG TTTCTGGCTT TTTGCTGGCC TTTTGTCTAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC
5051 CCTGATCTT GTGGATAACC GTATTACCGC GTTTAGTGA GTGATATACG CTCGCGCAGC
5111 CCGAAGACAG GAGCGCAGCG AGTCAGTGA CAGGAAGCGC GAAGAGCGCC CAATACCGCA
5171 ACCCGCTCTC CCGCGCGCTT GCGCATTTCA TTAATCCAGC TGGCAGAGA GGTTTCCCGA
5231 CCGGAAGCG GCGAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTAGT TACCTCACTC ATTAGGACAC
5291 CTAGGCTTTA CACTTTATG TTTCCGCTCT CAGTTTGTG TTTCCGCTCT GAGATTGTGA CCGGATAACA
5351 ATTTACACA GGAACAGCT ATGACATGA TTACGAATTA A

>長さ: 5391

【図 25 A】

pDR2

1 ATT CGA GCT CGC CCG ACA TTG ATT ATT GAC TAG TTA TTA ATA GTA ATC
49 AAT TAC GGG GTC ATT AGT TCA TAG CCC ATA TAT GGA GTT CCG CGT TAC
97 ATA ACT TAC GGT AAA TGG CCC CGC TGG CTG ACC GCC CAA CGA CCC CGC
145 CCC ATT GAC GTG AAT AAT GAC GTA TGT TCC CAT AGT AAC GCC AAT AGG
193 GAC TTT CCA TTG ACG TCA ATT GTG GGA GTA TTT ACG GTA AAC TGC CAA
241 CTT GGC AGT ACA TCA AGT GTA TCA TAT GCC AAG TAC GCC CCC TAT TGA
289 CGT CAA TGA CGG TAA ATG GCC CGC CTG GCA TTA TGC CCA GTA CAT GAC
337 CTT ATG GGA CTT TCC TAC TTG GCA GTA CAT CTA CGT ATT AGT CAT CGC
385 TAT TAC CAT GGT GAT GCG GTT TTG GCA GTA CAT CAA TGG GCG TGG ATA
433 GCG GTT TGA CTC ACG GGG ATT TCC AAG TCT CCA CCC CAT TGA CGT CAA
481 TGG GAG TTT GTT TTG GCA CCA AAA TCA ACG GGA CTT TCC AAA ATG TCG
529 TAA CAA CTC CGC CCC ATT GAC GCA AAT GGG CGG TAG GCG TGT ACG GTG
577 GGA GGT CTA TAT AAG CAG AGC TCG TTT AGT GAA CCG TCA GAT CGC CTG
625 GAG ACG CCA TCC AAC CTG TTT TGA CCT CCA TAG AAG ACA CCG GGA CCG
673 ATC CAG CCT CGC CGC CCG GGA ACG GTG CAT TGG AAC GCG GAT TCC CCG
721 TGC CAA GAG TGA CGT AAG TAC CGC CTA TAG AGT CTA TAG GCC CAC CCC
769 CTT GGC TTC GTT AGA ACG CGG CTA CAA TTA ATA CAT AAC CTT ATG TAT
817 CAT ACA CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AAC ATC CAC TTT GCC
865 TTT CTC TCC ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAC CTC GGT TCT
913 ATC GAT TGA ATT CCA CT **ATG** GGA TGG TCA TGT ATC ATC CTT TTT CTA
960 GTA GCA ACT GCA ACT GGA GTA CAT TCA GAA GTT CAG CTG GTG GAG TCT
1008 GGC TCT GGC CTG GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA
1056 GCT TCT GGC TAC TCC TTT ACC GGC TAC ACT ATG AAC TGG GTG CGT CAG
1104 CGC CCA GGT AAG GGC CTG GAA TGG GTT GCA CTG ATT AAT CCT TAT AAA
1152 GGT GTT ACT ACC TAT GCC GAT AGC TAC AAG GGC CTT TTT ACT ATA AGC
1200 CTA GAT AAA TCC AAA AAG ACA GGC GTC CTA CAG ATA AGT AAC CTT TAT
1248 GCT GAG GAC ACT GGC CTT TAT TAT TGT GCT AGA AGC GGA TAC TAC GGC
1296 ATC AGC GAC TGG TAT TTT GAT CTC TGG GGT CAA GGA ACT GTC GTC ACC
1344 GTC TCC TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TGC GTC TTC CCC CTG GCA CCC
1392 TCC TCC AAG ACC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCG CTG GGC TGC GTG CTC
1440 AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG TGC TCG TGG AAC TCA GGC GCC
1488 CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGC
1536 CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACT GTG CTT TCT AGC AGC TTA GGC
1584 ACC CAG ACC TAC ACT TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
1632 GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC
1680 CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC
1728 TTT CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CTT GAG
1776 GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG
1824 TTT AAC TGG TAC GTG GAG GGC GTG GAG GTG CAT AAT GGC AAG ACA AAG
1872 CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC
1920 ACC GTC CTG CAC CAG GAG TGG GTT TAT GAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAC
1968 GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCA GGC CCC ATC GAG AAA ACT ATC TCC AAA
2016 GGC AAA GGG CAG CCC CCA GAA CCA CAG GTG TAC AAC CCG CCC CCA TCC
2064 CGG GAA GAG ATT ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTC ACC TGC GTG GTC AAA
2112 GGC TTC TAT CCG AGC GAC ATC GGC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGC CAG
2160 CCG GAG AAC ATC TAC AAG ACC AGC CCT CCG GTG CTG GAC TCC GAC GGC
2208 TCC TTC CTC TAC AAG AAC CTC ACG CTC GTC GAG AAC AGG TGG CAG
2256 CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC

【図 25 B】

2304 CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA **TGA** GTGCG
2351 ACGGCCCTAG AGTCGACCTG CAGAAGCTTG GCGGCCATGG CCAACTTGT TTATTGGCAGC
2411 TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATGT CATTTTTTC
2471 ACTGCAITCT AGTTTGGTGT TTGTCMAACT CATCAATGTA TCTTATCATG TCTGGATGGA
2531 TCGGGAATTA ATTCGGCGCA GCACCATGGC CTGAAATAAC CTTGAAAGA GTGAACCTGT
2591 TAGGTACTCT CTGAGGCGGA AAGAACCATC TGTGGAATGT GTGTGAGTTA GGGTGTGGAA
2651 AGTCCCCAGC CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAGAGAGT GATCTCAAT TAGCTAGCAAT
2711 CCAGGTGTGG AAGTCCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAGG TATGCAAGC ATGCATCTCA
2771 ATTAGTCAGC AACCATAGTC CGGCCCTTAA CTCCGCCAT CCGGCCCTA ACTCGGCCA
2831 GTTCCGCCCA TTCTCGGCC CATGGCTGAC TAAATTTTTT TATTATGCA GAGGCGGAGG
2891 CCGCTCTGGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT AGTGGAGAGG CTTTTTTTGA GGCCTAGGCT
2951 TTTGCAAAAA GCTGTAAACA GCTTGGCACT GGCCGTGCTT TTACACGCTG GTGACTGGGA
3011 AAAACCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT TCAGACACAT CCCCCTCTG CCACTGGCG
3071 TAATGAGCAA GAGGCCCGCA CCGATCGGCC TTCCCAACAG TTGCGTAGCC TGAATGGCGA
3131 ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTCAC ACCGCATACG
3191 TCAAAGCAAC CATAGTACGC GGCTGTAGC GGCGCATPAA GCGCGCGGG TGTGTGTTT
3251 ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCGCTAGGCG CCGCTCTCTT CTGTTCTCTC
3311 CCTTCTCTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCGCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT
3371 TTAGGGTTCG GATTTAGTGC TTTACGGCAG CTGACGCCCA AAAACACTGA TTTGGGTGAT
3431 GGTTCACGTA GTGGGCCATC CGCTTGATAG GCGCTTTTTC AGCGTTTTC TTTGGAGTCC
3491 AGCTTTCTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGCGACAA CACTCAACCC TATCTCGGCG
3551 TATTCTTTTG ATTATTAAGG GATTITGCGG ATTITGCGCC TTTTGGAGCT GTGCTAGGCT
3611 ATTTAAACAA AATTTAACCG GAATTTTAA CAAAATATTA CGTTTACAAT TTTATGTTGC
3671 ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AACTCCGCTA TCGCTACGTG
3731 ACTGGGTGAT GGCTGCGGCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACGCGGCC TGACGGGCTT
3791 GTCTGCTCCC GGCATCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT TCCGGGAGC TGCATGTGTC
3851 AGAGGCTTTT ACCGTATCA CCGAAACGCG CGAGGCGAGTA TTCTTGAAGA CGAAAGGGCC
3911 TCTGTATAGC CCTATTTTTA TAGGTTAATG TCATGATAAT AATGTTTCTC TAGACGTGTC
3971 GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCGCTATTITG TTTATTTTTC TAAATACATT
4031 CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CTTGATAAAT GCTTCAATAT TATGAAAAA
4091 GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCAATT
4151 GCTTCTCTGT TTTTCTCAT CAGAAAAAGC TGGTGAAGTC AAAAGATGCT GAGGACTGAT
4211 TGGGTGACAG AGTGGGTATC ATCGAACTGG ACTCTAACAG CGTTTAAGTC TTTGAGAGTT
4271 TTCGCCCGCA AGAACGTTTT CCAATGATGA GACCTTTTAA AGGTTTGAAT CTGCGCGCGG
4331 TATATCTCCG TGATGACGCG GGGCAGAGC AACTGGTCTG CCGCATACAC TATTTCTCAG
4391 ATGACTTGGT TGAATACTCA CCACTGACAG AAAAGACTCT TCGTATGAG TATGACGATA
4451 GAGAATATGT CAGTGTGCTC ATAAACATGA GTGATAACAC TCGGCCCAAC TTACTTCTGA
4511 CAAAGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTITGCA CAACTGAGGG GATCATCTGC
4571 CTGCGCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACAACCAAGC GAGCGTGACA
4631 CACAGATGCC AGCAGCAATG GCGCAACGTT GCGCAACTT ATTAAGTGGC GACTACTTGA
4691 CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GAGTGAAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCA
4751 TTTCTGCGCT GCGCTTCCG GCTGGCTGGT TTATGCTGCA TAAATCTGGA CCGGCTGAGC
4811 GTGGGTCTCG GCGATCATGG GCGACCATGG GCAGCATGAG TGAAGCCCTG CCGTATGTAG
4871 TATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACCTA TGATGAGAAC AAATGAGACG TATGCTGAGA
4931 TAGGTGCTCT ACTGATTAA CATTGGTAAG CATTGAGACA GTTGTACTCA TATACTCTTA
4991 AGATTGATT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTGTGATA
5051 ATCTCATGAC CAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCTGTCCA TACAGTCTGC GACCCCGTAG
5111 AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCTCT TTTTCTGCG GGTAACTGCT TCGTGTGCAA
5171 CAAAAAGCT ACCGCTACCA GCGGTGTTT GTTTGCGGGA TCAAGAGCTA GCACTCTCTT
5231 TCCGGAAGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCCAA TACTGTCTCT GTAGTGTAGC
5291 CGTAGTTAGG CACACACTTC AAGAATCTC TAGCCACCCG TACATACCTT CTAAGTGTCAA

【図 25 C】

5351 TCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGG ATAAGTCTGT TCTTACCGG TTGAGTCAA
5411 CAGATAGT ACCGATAGG GCGCATGAC CGGCTGAC TGGACACAG
5471 CAGCTTGGT CAGACGAC TACACGAC TCGATACCT ACAGGTGAG CATTGAGAA
5531 GCGCACCTC TCCGAGGG AGAAGGCGC AAGGTATCC GTTAGCGCG AGGTGUGAA
5591 CAGGAGGCT CACGAGGAG CTTCCAGGG GAAAGCGCTG GTATCTAT AGCTGTGCG
5651 GGTTCGCGCA CTTCTGACT GAGCGTGT TTTTGTAG CTGCTGAGT GGGCGAGCC
5711 TTATGAAAT CCGCAGAAC GCGGCCCTTT TAGGTTCTT GACCTTTTC TGGCTTTTG
5771 CTACATGTT CTTTCTGCG TTATCCCTCT ATTTGTGGA TGCCTTTAT ACCGCTTTG
5831 ATGAGCTGA TACCGCTGC CCGACGGA CAGCAGTGC GTGAGGAGG
5891 AAGCGGAGA GCGCCCAAT GCCTCCCGC GCGTGGCGG ATTCATTAAT
5951 CCACTGSCA CGACGTTT CCGACTGGA AAGCGGAC TGAGCGCAAC GCGATTAATG
6011 TGAATGACT CACTGATTG GCGCCGAG CTTTACAT TATGCTCCG GCTGTAGT
6071 TGTGTGAA TGTGACCGA TAACTTTC ACACAGAA CAGTATGAC CATGATTAG

6131 AATTA
>長さ: 6135

【図 26 A - 1】

pRK.LPG3.Δ-Kappa

TTCCAGCTCGCCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCCGCTTACAACTTACGGTAAATGGCCCGCTTGGCTGACC
GCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCCAATCAGG
ACCTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGATATCATATGCCAAGTACGCCGCCCTATTGACGTCAATGACGCTAAATGGCCCGCTCGGCATTA
TGCCCACTACATGACCTTATGGGACTTCTCTACTTGGCAGTACATCTACGATTATAGCATCTGCT
ATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG
GATTTCCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCAACCAAAATCAACGGGA
CTTTCCAAAAGTGTGTAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGTGAGGCGTACCGGTGG
GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGAGGCCCATCCACGCT
GTTTTTGAACCTCATAGAAAGACACCGGACCGATCCAGCTCCCGCGCGGGAACGGTGCATTTGG
AAGCGCGATTCCCGGTGCCAAGAGTGAAGTAAAGTACCGCTTATAGAGTCTATAGGCCCAACCCCC
TTGCTCTTCGTAGAACGCGGCTCAAAATTAACATACCTTATGTATCATACATACGATTTTA
GGTGACATATAGAATAACATCCACTTGGCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCGCTCAAGT
TGCACTCCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTATGTATCATCTCTTTTCTAGT
AGCAACTGCACTGGAGTACATTGAGATATCCAGTACCGAGCTCCCGAGCTCCCTGTGCGCG
TCTGTGGCGATAGAGTGGTACCCTACCTGCGCTGCGTAAAGCGGTGCGAGCGGAGAGGTGATA
GCTACTCTGATCTGGTATCAACAGAAACCGAGAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACGCGGCTC
GTACTTGGAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGAGTCCGCTTCTGGGACGAGTTTCACTCTG
ACCATCAGCAGTCTGACGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTGACGAAAGTCAGAGGATC
CGTACACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAAACGAATCTGGCTGACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATCTGCTTCTGTTGTGTGCTGCTGGAAT
AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTTAACT
CCAGAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCTTGAC
GCTGAGCAAGAGCAGTACAGAGAAACAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCATCAGGCGCTG
AGCTCGCCCGTCAACAAAGACTTCAACAGGGGAGAGTGTAAAGCTTGGCGCCATGGGCCAAT
TGTTTATTGCACTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCACAAAATAAAGC
ATTTTATTGACGATTTCTAGTTTGGTTTGGTTTGTCTCCAACTCATCAATGTATCTTATCTGCTCG
ATCGGGAATTAATTCCGCGCAGCACCATGGCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAG
GTATCTTCTGAGGCGGAAAGAACCACTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGGTGTTGAAAGTCCCC
AGGCTCCCCAGCAGCAGAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCACTGAGTGGGA
AAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAAGATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
TAGTCCGCGCCCTAACTCCGCCCTCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATCTCCGCC
CATGGCTGACTAATTTTTTATTTATGAGAGGCGGAGGCGGCTCGGCTCTGAGCTATTC
CAGAAGTAGTAGGAGGCTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAGCTGTTAAACAGCTTGGC
ACTGGCGCTGTTTAAACAGTCTGACTGGGAAACCTTGGCTTACCCAACTTAACTGCTCT
GCAGCACATCCGCCCTTCGCGAGCTGGCGTAAATAGCAGAGAGGCGCGCACCGATCGCCCTCCC
AAAGTTGGTAGCTGAAATGGCGAAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCACTCTGTG
CGGTATTTCAACACCGCATACGTCAAAGCAACTAGTACCGCCCTTGTACGCGCGCATTAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCC
TTTCTGCTTTCTTCTCTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGGTCAAGCTCTAAATCGG
GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGCGACCTCGACCCCAAAACCTTGAATTGG
GTGATGGTCTAGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTCGCGCTTTCAGCTTGGAGTGC
CAGCTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACACACTCAACCTATCTCGGCTAT
TCTTTGATTATTAAGGAGTTTGGCGATTTCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAAC

【図 26A-2】

(続き)

AAAAATTTAAACGGAATTTTAAACAAATATTAACATTTTACAAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCGATAGTTAAGCAACCTCGCTATCGTACGCTGAGTGGGTCTAGGCTG
CGCCCGGACCGCCCAACACCGCTGACCGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCGCGGATCCGCT
TTACAGACAAGCTGTGACCGCTCTCGGGAGCTGCATGTCTCAGAGGTTTTCACCGTCACTACCG
AAACCGCGGAGGCGATATTTCTGAAGACGAAAGGGCTCTGATACGCTATTTTATAGGTTA
ATGTCAATGATAATAATGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCGCTCATGAGACAATAACCCCTGA
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGAGTATTCACATTTCCGCTGTCCGCTTAA
TTCCTTTTTTTCGGGCAITTTGCTTCTCTGTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAACGCGGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGGAAGACGTTTTCCTAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTAT
GTGGCGCGGTATTATCCGCTGATGACGCGCGGGCAAGACAACTCGGTGCGCGCATACACTATTC
TCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGAATGGCATGACGTA
AGAAATTAAGAGTGTGCTGCCATAACCATGAGTGATGAACACTCGGGCCAACTTACTCTGACAA
CGATCGGAGGACGGAAGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAATCGCTCT
TGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACACGAGCGTGACACCAACGATGCCA
CGACGAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAACTGGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
AACAAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCGCTTCC
GGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCGGTTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTTGCA
GCATCGGGGCGAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGCGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTTGTAAT
GTCAGACCAAGTTTAC

【図 26B】

TCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCC
TTTTTGATTAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAATTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
CGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATTCCTTTTTTCTCGCGGTAATCTGCTGCTGCAAA
ACAAAAAAACACCGCTACACGAGGTTGGTTTGTGTCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTTCTAGTGTAGCGCTAGTT
AGGCCCAACTCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
TGTGCTGCTGCGCACTGGCGATGAATGCTGCTCTTACCGGTTGCACTCAAGACGATAGTTACGG
ATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGAC
CTACACCGCACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCATTTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGCGCGACAGGTATCCGTAAGCGCGAGGTTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGGACTTCCAG
GGGGAACCCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGGGTTTCGCCCACTCTGACTTGAAGCGTCGATTT
TTTGATGCTCTGTCAGGGGGGGGAGCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTTACGG
TTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACGCTCGCGCAGCGGAACGACGAGCGCAG
CGAGTCAAGTGAAGCGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGCTGG
CGATTCATTAACTCCAGCTGCAACAGGTTTCCGACTGGAAGCGGGCATGTGAGCGCAACG
CAATTAATGTGAGTTACTCTACTCATTAGGCAACCCAGCGCTTTACACTTTATGCTTCCGCTCG
TATGTTGTGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCATATGACCATGATTAC
GAATTA

【図 27A-2】

(続き)

AACTCCGCCAGTTTCGCCCATCTTCGCCCATAGGCTGACTAAATTTTTTTATTTATGACAGAG
CGCGAGGCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGCTTTTTTGGAGGCTTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTGTTAACAGCTTGGCACTGGCGCTCGTTTACAAAGCTCGTGACTGGGAA
AACCTTGGCGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCGCTTTCGCCAGTTGGCGTAATA
CGGAAGAGGCGCGCAGGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT
GATGCGGATTTTCTCCTTACGATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACGCTCAAAGCAACCAT
AGTACGCGCTCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGAGCGTGACCGC
TACATTTGCCAGCGCTTAGCGCGGCTCCTTTGCTTCTTCTCCTTCTCCTTCTCGCCACGTTT
CGCGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACTTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCAAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA
GACGGTTTTTTCGCCCTTTGAGCTTGGAGTCCAGCTTCTTAAATAGTGAGCTCTTGTTCACAACT
GGAAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTTCGCGATTTCCG
CTATTTGTTAAAAAATGAGCTGATTTTAAACAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAATATTAAAC
GTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCGATAGTTAAGCCAACCTC
CGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCGCACACCGCGCAACACCGCTGACGCGCC
CTGACCGGCTTGTCTGCTCCCGGCTCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCTCGGGAGCTGCC
ATGTGTGAGAGGTTTTACCGCTCATCAGCAAAACGCGCGAGGCGATTTCTTGAAGACGAAGG
GCCTCGTGATACGCTATTTTATAGTTAAATGTCTATGATAATAATGGTTTCTTAGACCTCAGG
TGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAT
ATGATTCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATA
TGAGTATTCAACATTTTCGCTGTGCGCTTATTTCCCTTTTTTTCGGCATTTTTCGCTTCTGTTT
TGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGT
TACATCGAAGTGGATC

【図 27A-1】

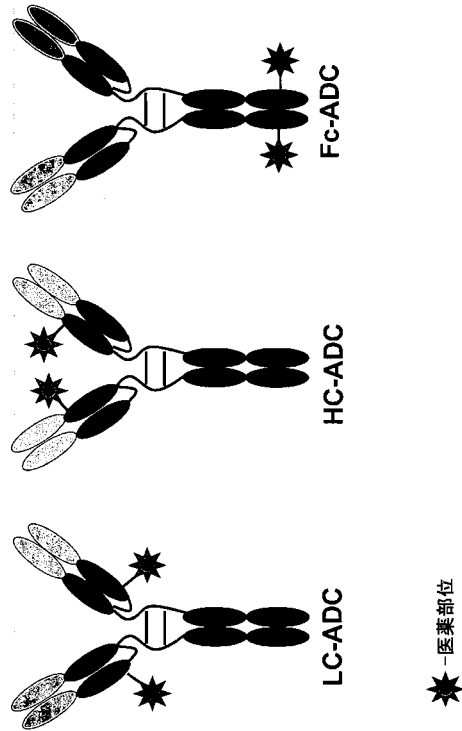
pRK.LPG4.ヒHC

ATTTCGAGCTCGCCGACATTTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA
GTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAATAGCCCGGCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCGCCCATGAGCTCAATAATGACGATATGTTCCCATAGTAACGCAATAGG
GACTTTTCCATTTGACGTCATAGGTTGGAGTATTTACGTTAACTGGCCACTTGGCAGTACATCAA
GTGTATCATATGCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGTTAAATGGCCCGCTGGCATTT
ATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTTATAGTCACTGCG
TATTACCATGGTGTAGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGCG
GGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAGAAATCAACGGG
ACTTTCCAAATGTGCTAAACATCTCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGGTGATCGGTG
CGAGGCTCATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACGCTCAGTCTGGAGACGCCATCCACGCG
TGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCTCCGCGCGCGGGAAACGTTGCAATG
GAACGCGGATTTCCCGTGCCAAAGAGTGACGTAAGTACCGCTATAGAGTCTATAGGCGCCACCC
CTTGGCTTCGTTAGAAGCGCGCTACAAATTAATACATAACCTTATGTATCATACATACAGATTT
AGGTGACACTATAGAATAACATCCATTTGCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCA
CTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCAATGATATCTCTTTTCTAG
TAGCAACTGCAACTGGAGCGTACGCTGAAGTTCAAGTGTGGAGTCTGGCGGTGGCTGGTGCA
GCCAGGGGCTCACTCGGTTTGTCTGTGCAAGTTTCTGGTACTTCCATCTCCGATATAGTACG
TGGAGTGTGATCGGTGAGCGCGCGGTGAAGGCTTGGAGTGGTGTGATCGATTAGTACTCTG
GAGAGACTAAGTATAACCTAGCGTCAAGGGCGGTATCACTATTAAGTCTGGCAGATTTCCAAAA
CACATTTCTACTGTCAGATGAACAGCTCGCTGCTGAGGACACTGCGCTTATTTATTGTGCTCGA
GSGACGCTATTTCCGTCACCTGGCACTTCGCGCTGTGGGTCAAGAACCTTGGTCAACGCTCT
CCTCGGCTCTCACCAAGGGCCCATCGGCTTCCCGCTGGACCTCTCTCCAAGAGCACTCTGG
GGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGCTGATCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGG
AACTCAGGCGCCCTGACAGCGCGTGCACACTTCCCGCTGCTCTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAATGTGCTCTAGCAGCTTGGGCAACCGACCTTACATCTGCAA
GCTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAAGAAGATTGAGCCCAATCTTTGACAAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCCGACGCTGAACTCTTGGGGGACGCTGAGTCTTCTCTTCC
CCCAAGAACCCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCTCTGAGGTACATCTCGTGGTGGAGGA
CGTGAGCCACGAAGACCTCGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCAATA
GCCAAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCAGTCAACGGGTGTGACGCTCTCCAGCG
TCTTGCACACGAGCTGGCTGAATGGCAAGGATGAAGTGAAGTCTTCCAAACAGCCCTCCC
AGCCCCCATTCGAGAAAAACATCTCCAAGCGCAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGATACCT
CTGCCCTTCCCGGAAGAGTAGCAAGAACCAAGTCAAGTCAAGTCTGCTGGTGGTCAAGGCT
TCTATCCAGAGCATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGCGAGAACCACTACAAAGAC
CGCGCTTCCCGTGTGAGCTCCGACGCGCTCTTCTTCTCTCAGCAAGACTCAGCGTCCGAGGACG
ACGAGGTGGCAGCAGGGGACGCTTCTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAACCAACT
ACAGCATGCAAGGCTCTCCTGCTCTCCGGGTAAATGAGTGGAGCGGCGCTAGATGCGACTGCG
AGAAGCTTGGCGCGCTTGGCCCACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTGCAAAATAAGCAAT
AGCATACAAATTTTCAAAATAAGCATTTTTTTCAGTCACTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACT
TCATCAATGTATTTATCATGTCTGGATCGATCGGGAATTAATTCGGCGCAGCAGCATGCGGCTG
AAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAGCGGGAAGAACCACTCTGTGGAA
TGTTGTGTCAGTTAGGTTGTGAAAGTCCCAAGGCTCCCGAGCGCAGCAAGATTCGAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACAGGTTGGAAAGTCCCGAGCTCCCGAGCTCCCGAGCGCAGGATATGC
AAAGCATGCACTCAATTAGTCAGCAACCAATAGTCCCGCCCTACCTCGCCCATTCGCGCCCT

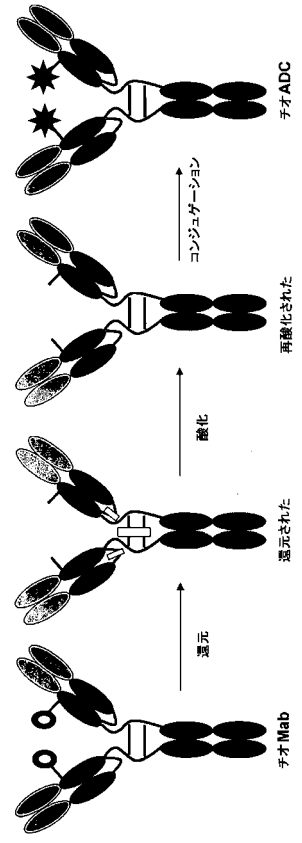
【図 27B】

TCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCAATGATGAGCACTTT
TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTTATCCGCTGATGACCGCGGGCAAGAGCACTCGGTGCG
CGCATACACTATTCTCAGAACTGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAAAGCATCTTACGG
ATGCGATGACAGTAAGAGAATTTATGCAAGTCTGCGCATTAACCATGAGTGATAAAGTCTCGGCGCAA
CTTACTCTTGACAAAGCATCGAGGAGCGAAGGAGCTAACCCGTTTTTTTGCAACAACTGGGGAT
CATGTAACTCGCTTGTGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTG
ACACCAAGATGCGCAGCAGCAATGGCAACAACTTTCGCCCAACTATTAACTGGCGAACTACTTAC
TCTAGCTTCCCGGCAACAAATTAATAGATGGATGGAGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCTTCCGCGTGGCTGGTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCGGTTGAGGCTGGGTCTC
GCGGTATCATTTGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCTGAGTTATCTACAGCAG
GGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAATAAGACAGATCGCTGAGATAGTGCCTCACTGATTT
AAGCATTTGGTAAGTCTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTTAGATTGATTAAAACTTCATT
TTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTTGTATATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAG
TGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGGATTCCT
TTTTTTCTGGCGTAACTGTGCTGTGCAAAACAAAAACACCGCTACAGCGGTGGTTTGTGTT
TGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCCAAGGTAACCTTTCAGCAGGACGCGACATACCA
AAATAGTCTCTTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCCACTTCAAGAACTCTGTAGCAACCGCT
ACATAGCTCGCTCTGCTAATCTGTTACAGGTGCTGCTGCGAGTGGCGATAAGTCTGTCTTAA
CGGGTTGAGCTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGCTCGGCTGAAACGGGGGTTCT
GTGCACAGCGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTTACCGCAACTGAGATACCTACAGCGTGGAGCAT
TGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGATACCGGTAAAGCGGAGGCTCG
GAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTGTGCG
GTTTCGCCACTCTGACTTGAAGCTCGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCTTATGG
AAAAACGCGCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTGCGCTTTTGTGCTCTTTGCTGCTCATATG
CTTTCTCGGCTTATCCCTGATTTCTGTGATAACGATTAACCGCTTTGAGTGAAGTCTGATAC
CGCTCGCGCGAGCGCAACGACGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGGCCA
ATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGCTTGGCGGCTTCAITTAATCAACCTGACACAGAGGTTTC
CGACTGGAAAGCGCGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCTCATTTAGGCAACC
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGCTCGTATTTGTGTGGAAATTTGTGAGCGGATAACAATTT
CACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGAATTA

【図 28】



【図 29】



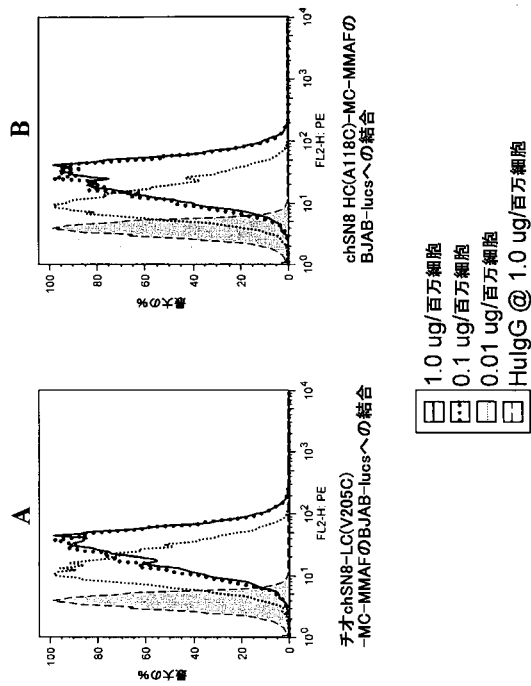
【図 30】

抗-CD79b V285C ch5N8 シスチン 改変 経路 チオMab
チオ-ch5N8-LC-V285C (LC)
DIVLTQSPASISLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGSFLNWKQKPGPKLFTYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNH
PYVEDDAATYYCQGSNEDPLTFGAGTELEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSITYSLSLTLSKADYENKHKVYVACEVTHQGLSPPTKSNRGE (配列番号: 58)
B. 重鎖配列
チオ-ch5N8-LC-V285C (HC)
EVQLQSGAEIHWGASVKISCKATGYTSSVNIHWKQKPGHLEWIGETLPGGGDTNRYEIPKSKATFTADTSNTAY
KQLSSLSIEDSAVYCTRPVYVDYDGSFLNWKQKPGPKLFTYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNH
CALISCUHPTAVLQSSGLYSLSVTVPSSTLCTQYICNNHPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGPSV
FLTPPKPTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYVGVVHMAKTKPREYQYNTVYVSVLVTLHQLWLNKREYK
CHVSNKALPAREKTISSKAKGQPREPQVITLPPSRDEMTKQDSLTGLUKGYPSDIAVRWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRDQQGVFSCSVNHEALHMHYTTQKSLSESG (配列番号: 57)

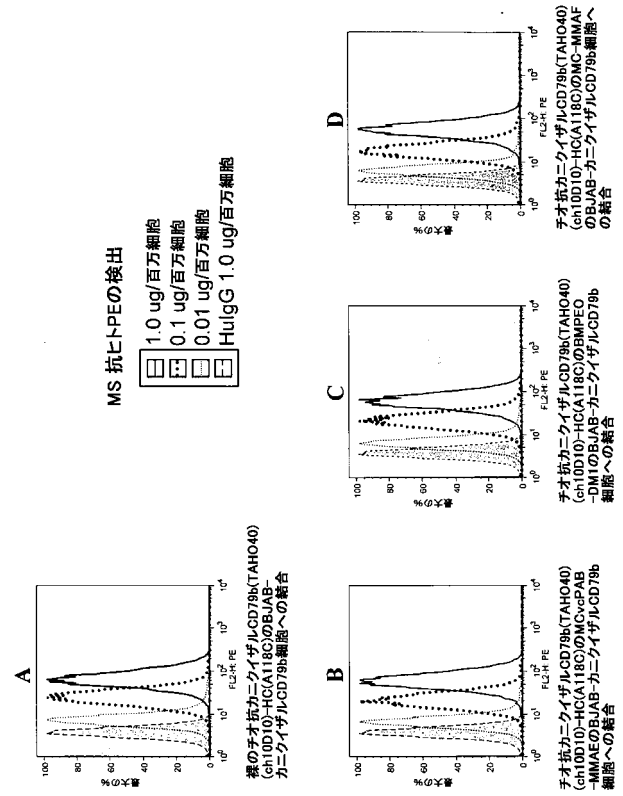
【図 31】

抗-CD79b A118C ch5N8 シスチン 改変 経路 チオMab
チオ-ch5N8-HC-A118C (LC)
DIVLTQSPASISLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGSFLNWKQKPGPKLFTYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNH
PYVEDDAATYYCQGSNEDPLTFGAGTELEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSITYSLSLTLSKADYENKHKVYVACEVTHQGLSPPTKSNRGE (配列番号: 60)
B. 重鎖配列
チオ-ch5N8-HC-A118C (HC)
EVQLQSGAEIHWGASVKISCKATGYTSSVNIHWKQKPGHLEWIGETLPGGGDTNRYEIPKSKATFTADTSNTAY
KQLSSLSIEDSAVYCTRPVYVDYDGSFLNWKQKPGPKLFTYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNH
CALISCUHPTAVLQSSGLYSLSVTVPSSTLCTQYICNNHPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGPSV
FLTPPKPTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYVGVVHMAKTKPREYQYNTVYVSVLVTLHQLWLNKREYK
CHVSNKALPAREKTISSKAKGQPREPQVITLPPSRDEMTKQDSLTGLUKGYPSDIAVRWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRDQQGVFSCSVNHEALHMHYTTQKSLSESG (配列番号: 59)

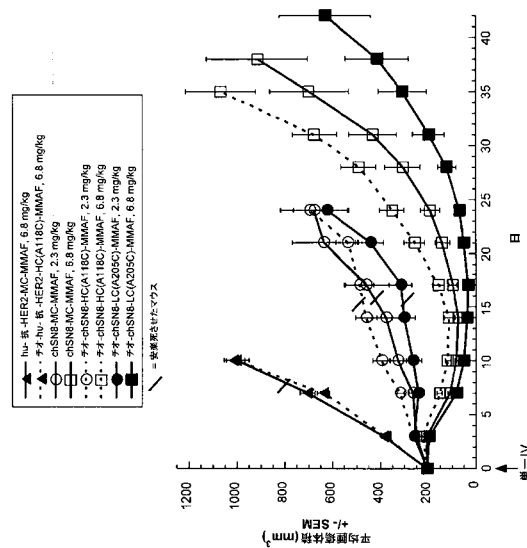
【図 3 2】



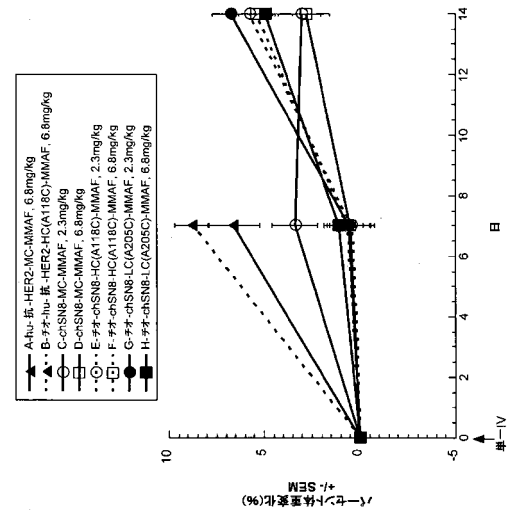
【図 3 3】



【図 3 4 A】



【図 3 4 B】



【図 35】

抗-カニクイザル CD79b (TAH040) ch10010 A118C シスチン 改良 重鎖 チャオMAb

A. 軽鎖配列

チオ-抗-カニクイザル CD79b (TAH040) (ch10010)-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPPSLAIVSLGORATISCRASESVDSYKTFMHHQKPGQPKLLIYRVSNLESGIPARFSGSGSRDPTLTIN
 PVEADDAVYYCQSNEDPFTFGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQSVTEQDSKDSYSLSSLTITLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:62)

B. 重鎖配列

チオ-抗-カニクイザル CD79b (TAH040) (ch10010)-HC-A118C (HC)

YVQLQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYSTSDYAMWIRQPGNKLMMGNIMYSGTTPNPSLKSISITRDTSKNQFF
 LQLNSVTSDTATYYCSRMDFWQGGTTLTVSSSGTKGSPVFPPLAPSKSKTSSTGTAALGCLVQDYPPEVTVSNNSGALTS
 GVHTFAVLQSSGLSLSVSVVPSLSLGTQYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPCPAPPELLGGFVSFLFPP
 KFKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVNHEALHNHYTQKSLSLSEF (配列番号:61)

【図 36】

抗-カニクイザル CD79b (TAH040) ch10010 V205C シスチン 改良 重鎖 チャオMAb

A. 軽鎖配列

チオ-抗-カニクイザル CD79b (TAH040) (ch10010)-HC-V205C (LC)

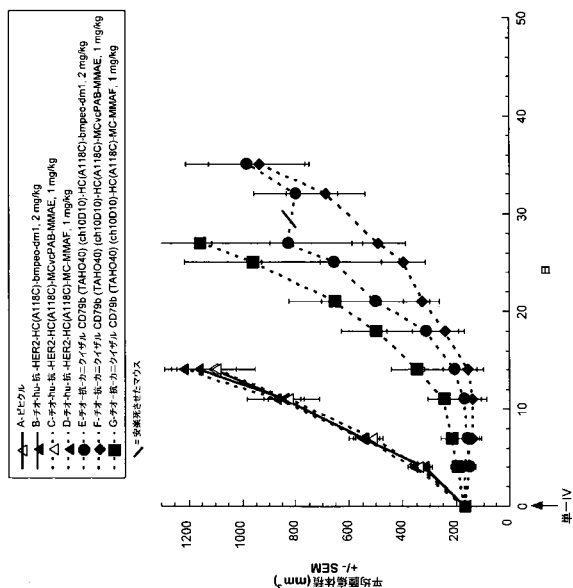
DIVLTQSPPSLAIVSLGORATISCRASESVDSYKTFMHHQKPGQPKLLIYRVSNLESGIPARFSGSGSRDPTLTIN
 PVEADDAVYYCQSNEDPFTFGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQSVTEQDSKDSYSLSSLTITLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:96)

B. 重鎖配列

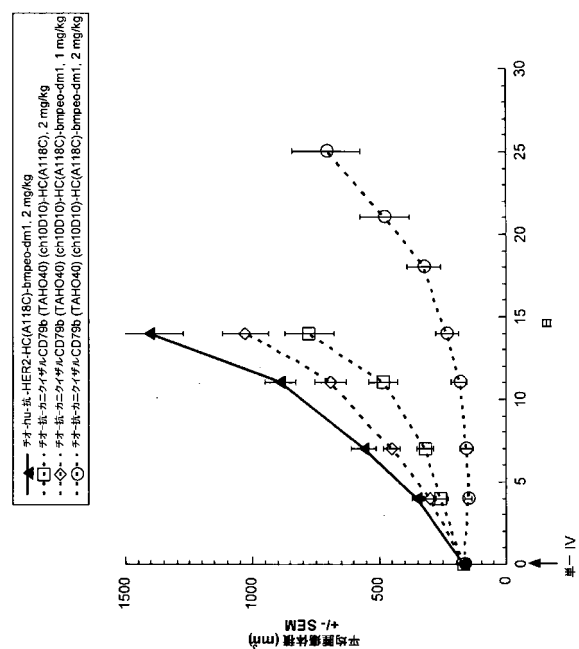
チオ-抗-カニクイザル CD79b (TAH040) (ch10010)-HC-V205C (HC)

YVQLQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYSTSDYAMWIRQPGNKLMMGNIMYSGTTPNPSLKSISITRDTSKNQFF
 LQLNSVTSDTATYYCSRMDFWQGGTTLTVSSSGTKGSPVFPPLAPSKSKTSSTGTAALGCLVQDYPPEVTVSNNSGALTS
 GVHTFAVLQSSGLSLSVSVVPSLSLGTQYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPCPAPPELLGGFVSFLFPP
 KFKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNSTYRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVNHEALHNHYTQKSLSLSEF (配列番号:95)

【図 37】



【図 38】



【配列表】

2011515069000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/030851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K16/28 C07K16/46 A61P35/00 C12N5/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/207142 A1 (CROWLEY CRAIG [US] ET AL) 6 September 2007 (2007-09-06)	1-347, 420-427
Y	the whole document	348-419
X	WO 2005/049075 A (GENENTECH INC [US]; CROWLEY CRAIG [US]; DESAUVAGE FREDERIC J [US]; EAT) 2 June 2005 (2005-06-02)	1-347, 420-427
Y	the whole document	348-419
X	WO 2005/117986 A (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15)	1-347, 420-427
Y	the whole document	348-419
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2009

Date of mailing of the international search report

04/09/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/030851

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POLSON ANDREW G ET AL: "Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 2, 15 July 2007 (2007-07-15), pages 616-623, XP002503252 ISSN: 0006-4971 [retrieved on 2007-03-16]	1-347, 420-427
Y	the whole document	348-419
Y	US 2007/092940 A1 (EIGENBROT CHARLES W [US] ET AL EIGENBROT CHARLES W [US] ET AL) 26 April 2007 (2007-04-26) cited in the application the whole document	348-361, 364-419
Y	DENNIS MARK S ET AL: "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35035-35043, XP002441763 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	362-363
Y	US 2004/001827 A1 (DENNIS MARK S [US]) 1 January 2004 (2004-01-01) cited in the application examples 2,4	362-363
Y	WO 01/45746 A (GENENTECH INC [US]; DELANO WARREN L [US]; DENNIS MARK S [US]; LOWMAN H) 28 June 2001 (2001-06-28) cited in the application example 6	362-363
E	WO 2009/012268 A (GENENTECH INC [US]; CHEN YVONNE [US]; DENNIS MARK [US]; DORNAN DAVID []) 22 January 2009 (2009-01-22) pages 218-251; claims; sequences	1-427
E	WO 2009/012256 A (GENENTECH INC [US]; CHEN YVONNE [US]; DENNIS MARK [US]; ELKINS KRISTI) 22 January 2009 (2009-01-22) pages 198-211; claims; sequences	1-427

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/030851**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-427(partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009 /030851

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-62, 66, 68-86, 90, 92-109, 113, 115-122, 126, 128-131, 135, 137-185, 189, 191-203, 207, 209-333, 337, 348-373, 379-411, 426(partially)

An isolated nucleic acid encoding the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2); the corresponding polypeptide, i.e. human CD79a/TAH04; an antibody that binds said polypeptide; related products, e.g. drug-conjugates, and methods, e.g. the medical treatment of tumor cells expressing said polypeptide.

2. claims: 63-64, 87-88, 110-111, 123-124, 132-133, 186-187, 204-205, 334-335, 339-344, 412-415, 421, 424(completely); 1-62, 66-86, 90-109, 113-122, 126-131, 135-185, 189-203, 207-333, 337-338, 348-411, 420, 423, 426(partially)

An isolated nucleic acid encoding the amino acid sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO: 4); the corresponding polypeptide, i.e. human CD79b/TAH05; an antibody that binds said polypeptide; related products and methods, e.g. the medical treatment of tumor cells expressing said polypeptide.

3. claims: 1-62, 68-86, 92-109, 115-122, 128-131, 137-185, 191-203, 209-333, 348-373, 379-411, 426(partially)

An isolated nucleic acid encoding the amino acid sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO: 6); the corresponding polypeptide, i.e. cynomolgus CD79a/TAH039; an antibody that binds said polypeptide; related products and methods, e.g. the medical treatment of tumor cells expressing said polypeptide.

4. claims: 65, 89, 112, 125, 134, 188, 206, 336, 345-347, 416-419, 422, 425, 427(completely); 1-62, 66-86, 90-109, 113-122, 126-131, 135-185, 189-203, 207-333, 337-338, 348-411, 420, 423, 426(partially)

An isolated nucleic acid encoding the amino acid sequence shown in Figure 8 (SEQ ID NO: 8); the corresponding polypeptide, i.e. cynomolgus CD79b/TAH040; an antibody that binds said polypeptide; related products and methods, e.g. the medical treatment of tumor cells expressing said polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/030851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007207142 A1	06-09-2007	NONE	
WO 2005049075 A	02-06-2005	AU 2004291141 A1 CA 2546285 A1 EP 1689432 A2 JP 2007516242 T NZ 547558 A	02-06-2005 02-06-2005 16-08-2006 21-06-2007 26-06-2009
WO 2005117986 A	15-12-2005	AU 2005249490 A1 BR PI0510883 A CA 2567520 A1 EP 1753463 A2 JP 2008501029 T KR 20070037575 A	15-12-2005 26-12-2007 15-12-2005 21-02-2007 17-01-2008 05-04-2007
US 2007092940 A1	26-04-2007	US 2009175865 A1	09-07-2009
US 2004001827 A1	01-01-2004	US 2005287153 A1 US 2007020264 A1	29-12-2005 25-01-2007
WO 0145746 A	28-06-2001	AT 337403 T AT 422369 T AU 784285 B2 AU 2006202341 A1 AU 2009201933 A1 CA 2390691 A1 DE 60030323 T2 EP 1240337 A2 ES 2270893 T3 JP 2003518075 T JP 2007289187 A JP 2007289200 A US 2004253247 A1 US 2007160534 A1	15-09-2006 15-02-2009 02-03-2006 29-06-2006 04-06-2009 28-06-2001 11-10-2007 18-09-2002 16-04-2007 03-06-2003 08-11-2007 08-11-2007 16-12-2004 12-07-2007
WO 2009012268 A	22-01-2009	US 2009028856 A1	29-01-2009
WO 2009012256 A	22-01-2009	PE 04812009 A1 US 2009068202 A1	18-05-2009 12-03-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	C 0 7 K 2/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K, E, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. サランラップ

- (72)発明者 デソーヴェージ, フレデリック, ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, シューティング スター アイランド 1 8 7
- (72)発明者 イートン, ダン, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 0 1, サン ラファエル, インヴァネス ドライブ 4 5
- (72)発明者 エベンズ, アレン, ジュニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, アローヤ アヴェニュー 1 9 3 2
- (72)発明者 エルキンス, クリスティ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サン フランシスコ, メイプル アヴェニュー 5 2 4
- (72)発明者 ホンゴ, ジョーアン, エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 1, レッドウッド シティ, ショウ コート 3 1
- (72)発明者 ジュニチュラ, ジャガス, レッディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, トゥペロ ストリート 3 4 3

9 1

- (72)発明者 ポルソン, アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, バークレイ ウェイ
2 8 1
- (72)発明者 ロス, サラジェーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2, サン フランシスコ, フォーティーセブンス
アヴェニュー 1 5 5 5
- (72)発明者 スミス, ヴィクトリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリンゲーム, ドゥワイト ロード 1 9
- (72)発明者 バンドレン, リチャード, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, ヘイン ロード 1 0 1 5
- (72)発明者 ジェン, ビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 0, マウンテン ヴュー, モンテレナ コート
1 5 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA54 CA02 CA20 DA02 DA06 DA12 EA04
GA11
4B063 QA19 QA20 QQ03 QQ08 QR56 QS33 QX02
4B064 AG27 BJ12 CA02 CA06 CA10 CA19 DA05 DA14
4B065 AA26X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA11 AA13 AA17 AA19 BA44 CA59
MA01 NA14 ZB212 ZB262 ZB272
4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 AA27 BB01 CC23 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA02 MA05 NA14 ZB21 ZB26
ZB27
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA01 NA14 ZB21 ZB26 ZB27
4H045 AA11 BA09 BA41 BA70 BA71 BA72 CA42 DA50 DA76 DA86
EA29 EA51 EA54 FA74