(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6545643号
(P6545643)

(45)発行日　令和1年7月17日(2019.7.17)　(24)登録日　令和1年6月28日(2019.6.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	ZNA
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	

請求項の数 71　外国語出願　(全 265 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-140234(P2016-140234)
(22)出願日　平成28年7月15日(2016.7.15)
(62)分割の表示　特願2014-14789(P2014-14789)の分割
原出願日　平成21年1月14日(2009.1.14)
(65)公開番号　特開2017-19793(P2017-19793A)
(43)公開日　平成29年1月26日(2017.1.26)
審査請求日　平成28年8月12日(2016.8.12)
(31)優先権主張番号　61/025,137
(32)優先日　平成20年1月31日(2008.1.31)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/032,790
(32)優先日　平成20年2月29日(2008.2.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　１
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　チェン，　イボンヌ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０１，　サン　マテオ，　８番　アヴェニュー　３２０番　２２２
(72)発明者　デニス，　マーク
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０７０，　サン　カルロス，　プリマス　アヴェニュー　１２０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＣＤ７９ｂ抗体及びイムノコンジュゲートとその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

一又は複数の改変されたシステインを含むシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、重鎖及び軽鎖を含み、軽鎖が配列番号：１６９の配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、且つ重鎖が配列番号：１７０の配列を含む重鎖可変ドメインを含む、システイン改変抗体。

【請求項２】

一又は複数の改変されたシステインを含むシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、重鎖及び軽鎖を含み、軽鎖が配列番号：１８８の配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、且つ重鎖が配列番号：１８９の配列を含む重鎖可変ドメインを含む、システイン改変抗体。

【請求項３】

一又は複数の改変されたシステインを含むシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、重鎖及び軽鎖を含み、軽鎖が配列番号：２２６の配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、且つ重鎖が配列番号：２２７の配列を含む重鎖可変ドメインを含む、システイン改変抗体。

【請求項４】

軽鎖が一又は複数の改変システインを含む、請求項１から３の何れか一項に記載のシステイン改変抗体。

【請求項５】

一又は複数の改変システインが、カバット番号付け表現法に従うところの軽鎖の１１０、１１４、１２１、１２７、１６８及び２０５から選択される一又は複数の位置にある、請求項４に記載のシステイン改変抗体。

【請求項６】
軽鎖が、カバット番号付け表現法に従うところの軽鎖の位置２０５にある改変システインを含む、請求項４又は５に記載のシステイン改変抗体。
【請求項７】
重鎖が一又は複数の改変システインを含む、請求項１から６の何れか一項に記載のシステイン改変抗体。
【請求項８】
一又は複数の改変システインが、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ある、請求項７に記載のシステイン改変抗体。
【請求項９】
重鎖が、ＥＵ番号付け表現法に従うところの重鎖の位置１１８にある改変システインを含む、請求項７又は８に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１０】
重鎖が、ＥＵ番号付け表現法に従うところの重鎖の位置４００にある改変システインを含む、請求項７から９の何れか一項に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１１】
軽鎖が配列番号：２２９の配列を含み、且つ重鎖が配列番号：２２８の配列を含む、請求項１に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１２】
軽鎖が配列番号：２３１の配列を含み、且つ重鎖が配列番号：２３０の配列を含む、請求項２に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１３】
抗体がモノクローナル抗体又は二重特異性抗体である、請求項１から１２の何れか一項に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１４】
一又は複数の改変システインを介して細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項１から１３の何れか一項に記載のシステイン改変抗体を含む、イムノコンジュゲート。
【請求項１５】
細胞障害性剤が、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１４に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項１６】
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１から１３の何れか一項に記載のシステイン改変抗体を含む、イムノコンジュゲート。
【請求項１７】
アルブミン結合ペプチドに融合される、請求項１から１３の何れか一項に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１８】
アルブミン結合ペプチドが配列番号：２４６－２５０から選択される、請求項１７に記載のシステイン改変抗体。
【請求項１９】
式Ａｂ－(Ｌ－Ｄ)ｐを含むイムノコンジュゲートであって、
(ａ) Ａｂが請求項１から１３の何れか一項に記載のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であり、
(ｂ) Ｄは薬剤部分であり、
(ｃ) Ｌは一又は複数の改変システインを介してＡｂをＤに連結するリンカー部分であり、及び
(ｄ) ｐは１から８の範囲にある
イムノコンジュゲート。
【請求項２０】

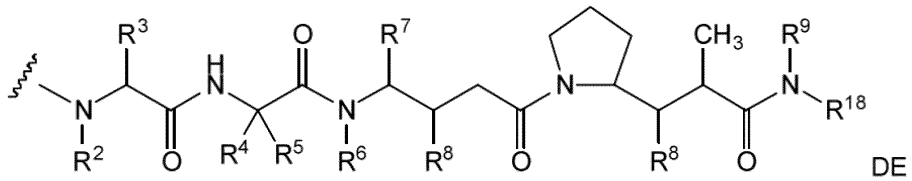
Ｌが、６-マレイミドカプロイル(ＭＣ)、マレイミドプロパノイル(ＭＰ)、バリン-シトルリン(ｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｌａ-ｐｈｅ)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボニル(ＰＡＢ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(ＳＰＰ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(ＳＭＣＣ)、４-(２-ピリジルジチオ)ブチル酸-Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＰＤＢ）、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)の一又は複数から選択されるリンカーを含む、請求項１９に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２１】

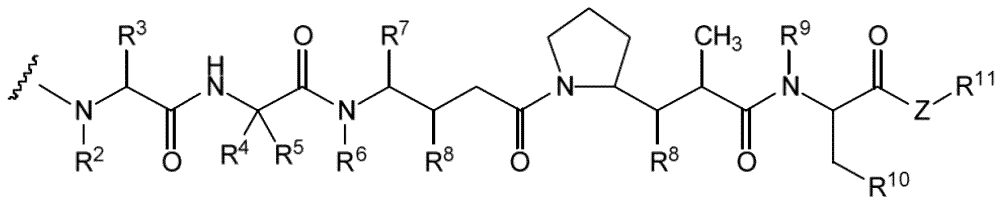
Ｄが、メイタンシノイド、アウリスタチン又はドラスタチンである、請求項１９又は２０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２２】

Ｄがアウリスタチンであり、式ＤＥ又はＤＦを含み、



DE



DF

ここで、R^2とR^6はそれぞれメチルであり、R^3とR^4はそれぞれイソプロピルであり、R^5はＨ又はメチルであり、R^7はｓｅｃ－ブチルであり、各R^8は、CH_3、Ｏ－CH_3、ＯＨ及びＨから独立して選択され、R^9はＨであり、R^{10}はアリールであり、Ｚは－Ｏ－又は－ＮＨ－であり、R^{11}はＨ、C_1－C_8アルキル又は－$(CH_2)_2$－Ｏ－$(CH_2)_2$－Ｏ－$(CH_2)_2$－Ｏ－CH_3であり、及びR^{18}は－$C(R^8)_2$－$C(R^8)_2$－アリールである、請求項２１に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２３】

ＤがＭＭＡＥ又はＭＭＡＦである、請求項１９又は２０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２４】

式Ａｂ－（Ｌ－ＭＭＡＥ）ｐを含み、ｐが２から５の範囲にある、請求項１９又は２０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２５】

式Ａｂ－（Ｌ－ＭＭＡＦ）ｐを含み、ｐが２から５の範囲にある、請求項１９又は２０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２６】

Ｌが、ｖａｌ－ｃｉｔ、ＭＣ、ＰＡＢ、及び／又はＭＣ－ＰＡＢを含む、請求項１９から２５の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

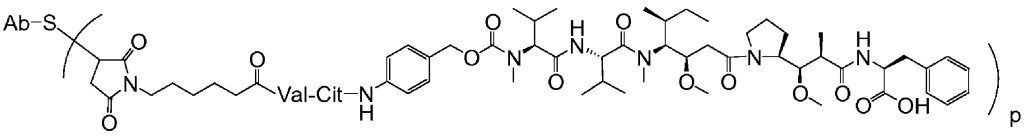
【請求項２７】

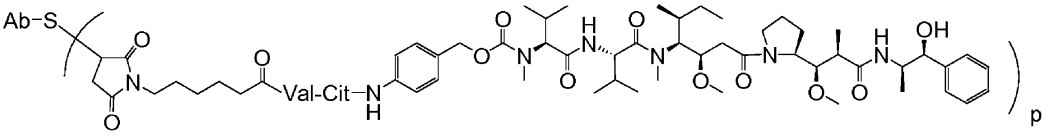
ＬがＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢである、請求項１９から２６の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

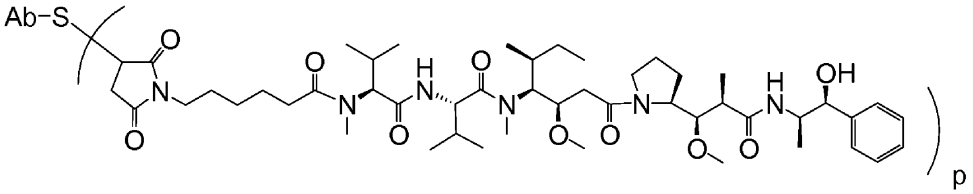
【請求項２８】

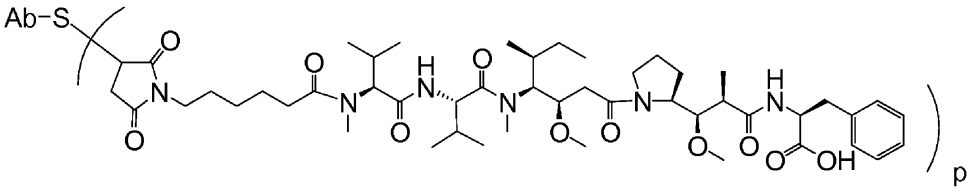
Ｄがメイタンシノイドである、請求項１９から２１の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項２９】
メイタンシノイドが、ＤＭ１、ＤＭ３及びＤＭ４から選択される、請求項２８に記載のイムノコンジュゲート。
【請求項３０】
以下からなる群から選択される構造を含むイムノコンジュゲートであって、

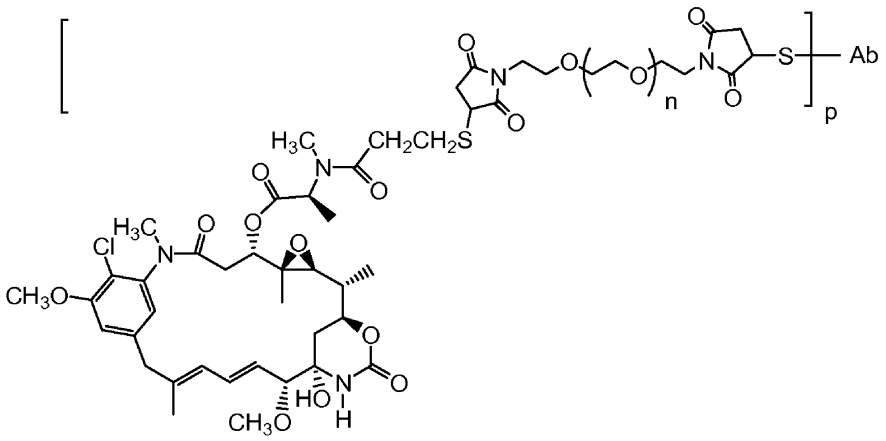








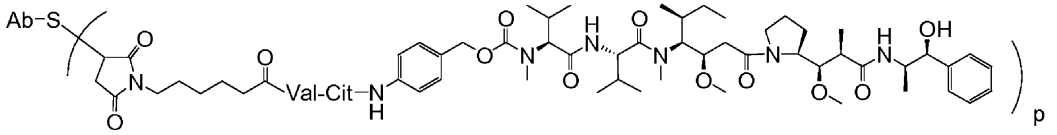
及び



ここで、Ｖａｌがバリンであり、Ｃｉｔがシトルリンであり、ｎが０、１又は２である、請求項１９又は２０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項３１】

以下の構造



を含む、請求項３０に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項３２】

ｐが、１、２、３又は４である、請求項１９から３１の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項３３】

ｐが、１又は２である、請求項１９から３２の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項３４】

請求項１４、１５及び１９から３３の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート、及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項３５】

ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖の阻害のための医薬の製造における、請求項１から１３の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項３６】

ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖の阻害のための医薬の製造における、請求項１４、１５及び１９から３３の何れか一項に記載のイムノコンジュゲートの使用。

【請求項３７】

医薬が有効量の他の治療剤をさらに含む、請求項３５又は３６に記載の使用。

【請求項３８】

増殖性疾患を治療するための医薬の製造における、請求項１から１３の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項３９】

増殖性疾患を治療するための医薬の製造における、請求項１４、１５及び１９から３３の何れか一項に記載のイムノコンジュゲートの使用。

【請求項４０】

増殖性疾患が癌である、請求項３８又は３９に記載の使用。
【請求項４１】
癌がＢ細胞増殖性疾患である、請求項４０に記載の使用。
【請求項４２】
Ｂ細胞増殖性疾患が、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、高悪性度ＮＨＬ、低悪性度リンパ腫、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、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選択される、請求項４１に記載の使用。
【請求項４３】
Ｂ細胞増殖性疾患が、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)である、請求項４２に記載の使用。
【請求項４４】
Ｂ細胞増殖性疾患が、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）である、請求項４２に記載の使用。
【請求項４５】
Ｂ細胞増殖性疾患が、再発性ＮＨＬ又は難治性ＮＨＬである、請求項４２に記載の使用。
【請求項４６】
Ｂ細胞増殖性疾患が、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）である、請求項４２に記載の使用。
【請求項４７】
医薬が有効量の他の治療剤をさらに含む、請求項３８から４６の何れか一項に記載の使用。
【請求項４８】
治療剤が、抗体、化学療法剤、細胞傷害性剤、抗血管新生剤、プロドラッグ、サイトカイン、及び増殖阻害性剤からなる群から選択される、請求項４７に記載の使用。
【請求項４９】
治療剤が、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストラゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベバシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブメシレート、ソラフェニブ、ラパチニブ、トラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、５‐フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、メルファラン、プレドニソン、及びドセタキセルからなる群から選択される、請求項４７に記載の使用。
【請求項５０】
治療剤が抗ＣＤ２０抗体である、請求項４７に記載の使用。
【請求項５１】
治療剤が抗ＣＤ２０抗体であり、増殖性疾患がＢ細胞増殖性疾患である、請求項４７に記載の使用。
【請求項５２】
治療剤が抗ＣＤ２０抗体であり、増殖性疾患がびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）である、請求項４７に記載の使用。
【請求項５３】
治療剤が抗ＣＤ２０抗体であり、増殖性疾患が濾胞性リンパ腫（ＦＬ）である、請求項４７に記載の使用。
【請求項５４】
抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブである、請求項５０から５３の何れか一項に記載の使用。
【請求項５５】
治療剤が化学療法剤である、請求項４８に記載の使用。

【請求項５６】
化学療法剤が、シクロフォスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニソンの一又は複数を含む、請求項５５に記載の使用。
【請求項５７】
化学療法剤が、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、及びプレドニソンを含む、請求項５５に記載の使用。
【請求項５８】
有効量の化学療法剤が医薬と組み合わせてさらに使用される、請求項５０に記載の使用。
【請求項５９】
化学療法剤が、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、及びプレドニソンを含む、請求項５８に記載の使用。
【請求項６０】
増殖性疾患が、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)である、請求項５９に記載の使用。
【請求項６１】
抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブである、請求項６０に記載の使用。
【請求項６２】
増殖性疾患がびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）である、請求項５９に記載の使用。
【請求項６３】
抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブである、請求項６２に記載の使用。
【請求項６４】
ＣＤ７９ｂタンパク質を含むことが疑われる生体試料中におけるＣＤ７９ｂタンパク質の存在のインビトロ決定方法であって、請求項１から１３の何れか一項に記載の抗体に該試料をインビトロでさらし、該試料におけるＣＤ７９ｂタンパク質への該抗体の結合を決定することを含み、このとき該試料中のＣＤ７９ｂタンパク質への該抗体の結合が該試料中の該タンパク質の存在を示す方法。
【請求項６５】
請求項１から１３の何れか一項に記載のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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)とを含むイムノコンジュゲートの製造方法であって、このとき該抗体が、該抗体の一又は複数の改変システインを介してリンカー部分(Ｌ)によりＤに付着されており、該イムノコンジュゲートが以下の式Ｉを含み、

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

ここで、ｐが１、２、３又は４であり、
(a) 抗体の一又は複数の改変システイン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、イムノコンジュゲートが形成される
工程を含むか、又は、
(c) 薬剤部分Ｄ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、そして、
(d) Ｄ－Ｌを抗体の一又は複数の改変システインと反応させ、これによって、イムノコンジュゲートが形成される
工程を含む、方法。
【請求項６６】
工程(a)又は工程(d)の前に、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)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６５に記載の方法。
【請求項６７】
工程(a)又は工程(d)の前に、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６６に記載の方法。

【請求項６８】
還元剤がＴＣＥＰ又はＤＴＴである、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
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６７又は６８に記載の方法。
【請求項７０】
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６９に記載の方法。
【請求項７１】
増殖性疾患を治療するための医薬であって、請求項１４、１５及び１９から３３の何れか一項に記載のイムノコンジュゲートを含む、医薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の説明）
米国特許法施行規則１．５３(ｂ)の下に出願された本非仮出願は、米国特許法第１１９条(ｅ)の下に、２００８年１月３１日に出願の米国仮出願番号第６１／０２５１３７号、２００８年２月２９日に出願の米国仮出願番号第６１／０３２７９０号及び２００８年５月２０日に出願の米国仮出願番号第６１／０５４７０９号の優先権を主張するものであり、これらは出典明記によって全体に援用される。
【０００２】
（技術分野）
本発明は、哺乳動物の造血系腫瘍の治療のために有用な組成物及び、同目的のための組成物の使用方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
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 et al., CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993))。癌は、正常な組織に由来し腫瘍塊を形成するように増殖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浸潤、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、正常細胞が増殖しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる浸潤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。
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などの血液の細胞成分が生成される過程である造血の間に生成される細胞を伴う癌は、造血系癌と称される。血液及びリンパ組織にみられ、免疫応答に重要であるリンパ球は、２つの主要な種類のリンパ球に分類される。それは、Ｂリンパ球(Ｂ細胞)及びＴリンパ球(Ｔ細胞)であり、それぞれ体液性及び細胞性の免疫を媒介する。
【０００４】
Ｂ細胞は骨髄内で成熟し、その細胞表面上に抗原結合抗体を発現する骨髄を放出する。ナイーブＢ細胞がその膜結合性抗体が特異的である抗原と初めて遭遇すると、細胞は速やかに分離し、その子孫はメモリーＢ細胞と「プラズマ細胞」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。メモリーＢ細胞は寿命が長く、元の親細胞と同じ特異性を有する膜結合性抗体を発現し続ける。プラズマ細胞は、膜結合性抗体を発現しない代わりに、分泌型抗体を産生する。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、未成熟なＴ細胞の増殖及び分化の環境を提供する胸腺で成熟する。Ｔ細胞が成熟する間、Ｔ細胞では、Ｔ細胞レセプターを産生する遺伝子再編成と、成熟Ｔ細胞の細胞表面の表現型の決定を助け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、即ちＴ細胞レセプター複合体と、コアレセプターの一つであるＣＤ４又はＣＤ８である。

【０００５】
癌治療のための有効な細胞標的を発見するために、研究者は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比べて、一又は複数のある種の癌細胞の表面に特異的に発現される、膜貫通型あるいは膜結合性のポリペプチドの同定を試みていた。多くは、このような膜結合性のポリペプチドは、非癌性細胞の表面上と比べて、癌細胞の表面上に豊富に発現されている。このような腫瘍関連の細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療による破壊のための特異的な癌細胞標的能を引き起こした。この点で、抗体ベースの治療は特定の案の治療に非常に有効であることが明らかであることは注目すべきことである。例えば、ハーセプチン(登録商標)及びリツキサン(登録商標)(いずれもGenentech Inc., South San Francisco, California)は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するため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、ヒト上皮性増殖因子レセプター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由来のヒト化モノクローナル抗体である。ＨＥＲ２タンパク質過剰発現は原発性乳癌の２５～３０％に観察される。リツキサン(登録商標)は、正常及び悪性のＢリンパ球の表面に見られるＣＤ２０抗原に向けられる遺伝学的な操作を施したキメラマウス／ヒトモノクローナル抗体である。両方の抗体は、ＣＨＯ細胞において組み換え製造される。

癌治療のための有効な細胞標的を発見するための他の試みでは、研究者は、(1) 一又は複数のある種の非癌性正常細胞と比べて、一又は複数のある種の癌細胞によって特異的に製造される非膜結合性ポリペプチド、(2) 一又は複数の正常な非癌性細胞よりも有意に高い発現レベルで癌細胞によって産生されるポリペプチド、又は(3) 癌性及び非癌性の状態(例えば正常前立腺及び前立腺腫瘍組織)の単一の(又は非常に限られた数の異なる)組織種のみに発現が特異的に限定されているポリペプチド、の同定を試みていた。このようなポリペプチドは、細胞内に位置し続けているか、又は癌細胞によって分泌されうる。さらに、このようなポリペプチドは、癌細胞自体によってではなく、むしろ癌細胞への増強作用又は増殖亢進作用を有するポリペプチドを産生する及び／又は分泌する細胞によって発現されうる。このような分泌されたポリペプチドは、正常細胞を上回る増殖利点を有する癌細胞を提供するタンパク質であることが多く、例えば血管形成因子、細胞接着因子、増殖因子などのものが含まれる。このような癌の治療のための有効な治療薬として役立てるために、前述の非細胞結合性ポリペプチドのアンタゴニストの同定が期待されるであろう。さらに、これらポリペプチドの発現パターンの同定は、哺乳動物の特定の癌の診断に有用であろう。

【０００６】
哺乳動物の癌治療において上記のような進歩があるにもかかわらず、哺乳動物の腫瘍の存在を検出することが可能な更なる治療薬及び、効果的に腫瘍細胞の増殖を阻害するための治療薬がそれぞれ求められている。したがって、癌性及び非癌性の状態の単一の(又は非常に限られた数の異なる)造血系組織のみに発現が特異的に限定されているポリペプチド、細胞膜結合性、分泌性ないしは細胞内のポリペプチドを同定すること、そして、哺乳動物の造血系癌の治療的処置及び／又は検出に有用な組成物を製造するためのこれらポリペプチド及びコード核酸の使用が、本発明の目的である。

ＣＤ７９は、ＣＤ７９ａ(Ｉｇα、ｍｂ-１)及びＣＤ７９ｂ(Ｉｇβ、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))。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(Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7(2001))。

【０００７】

ＣＤ７９ｂの発現があれば、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 & 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。

【０００８】

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セレクチン抗体(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)。

【０００９】

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。

【００１０】

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)。

【００１１】

システイン-改変抗体は、Ｆａｂ抗体断片(ｔｈｉｏＦａｂ)として設定され、完全長ＩｇＧモノクローナル(ｔｈｉｏＭａｂ)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－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。

【００１２】

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。

【発明の概要】

【００１３】

本発明は、抗ＣＤ７９ｂ抗体又はその機能的な断片、及び造血系腫瘍の治療における使用方法を提供する。

一態様では、本発明は、上記又は下記のいずれかのポリペプチドに結合する、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、抗体は、モノクローナル抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$、及びＦｖ断片を含む抗体断片、ダイアボディ、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、又はそのそれぞれの抗原エピトープに対する抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、場合によって、例えばアウリスタチン、メイタンシノイド、ドラスタチン類似体又はカリケアマイシンを含む毒素、抗生物質、放射性同位体、核酸溶解酵素などの増殖阻害剤ないし細胞障害剤にコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は、場合によって、ＣＨＯ細胞又は細菌で生産されてもよく、好ましくは、それらが結合する細胞の死を誘導してもよい。検出目的のために、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固形支持体等に付着されてもよい。

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する抗体の一価の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としての抗体の親和性)又は二価の形態での親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧ断片としての抗体の親和性)が、マウス抗体(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片又はＩｇＧ断片としてのマウス抗体の親和性)又はキメラ抗体(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片又はＩｇＧ断片としてのキメラ抗体の親和性)のそれぞれの一価の親和性又は二価の形態での親和性と実質的に同じであるか、よりも低いか、又はよりも高い、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示す軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、基本的にからなるものを提供する。

【００１４】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭ、０．２ｎＭ又は０．５ｎＭであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

一態様では、

(i) KASQSVDYDGDSFLN (配列番号：１３１)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１

(ii) AASNLES (配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２

(iii) QQSNEDPLT (配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３

(iv) GYTFSSYWIE (配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１

(v) GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、

(vi) TRRVPVYFDY (配列番号：１３６)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３

からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５又は６のＨＶＲを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体が提供される。

【００１５】

一態様では、少なくとも１の変異ＨＶＲを含み、この変異ＨＶＲが配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４、１３５又は１３６に示される配列の少なくとも１の残基の修飾を含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体が提供される。

一態様では、本発明は、図１５(配列番号：１６４－１６６)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供

する。
一態様では、本発明は、図１５(配列番号：１５６－１５８)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１６(配列番号：１８３－１８５)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１６(配列番号：１７５－１７７)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１７(配列番号：２０２－２０４)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１７(配列番号：１９４－１９６)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１８(配列番号：２２１－２２３)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。
一態様では、本発明は、図１８(配列番号：２１３－２１５)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。

【００１６】

一態様では、本発明は、配列番号：１７０、１８９、２０８又は２２７から選択される重鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。他の態様では、本発明は、配列番号：１６９、１８８、２０７又は２２６から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ７９ｂ抗体を含む。
一態様では、本発明は、配列番号：２５１－２９８から選択される配列と一又は複数の遊離システインアミノ酸とを含むシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合してもよい。システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、親抗ＣＤ７９ｂ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てもよい。

【００１７】

一態様では、本発明は、一又は複数の遊離システインアミノ酸を含有するシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合し、親抗ＣＤ７９ｂ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、このときの親抗体は、
(a) KASQSVDYDGDSFLN（配列番号：１３１)又はKASQSVDYEGDSFLN（配列番号：１３７)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１、
(b) AASNLES（配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
(c) QQSNEDPLT（配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
(d) GYTFSSYWIE（配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
(e) GEILPGGGDTNYNEIFKG（配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、
(f) TRRVPVYFDY（配列番号：１３６)又はTRRVPIRLDY（配列番号：１３８)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３
から選択される少なくとも１のＨＶＲ配列を含むものであるシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体を包含する。

【００１８】

システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、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、又はそのそれぞれの抗原エピトープに対する抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する抗体であってもよい。本発明の抗体は、場合によって、例えばアウリスタチン又はメイタンシノイドを含む毒素などの増殖阻害剤ないし細胞障害剤にコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は、場合によって、ＣＨＯ細胞又は細菌で生産されてもよく、好ましくは、それらが結合する細胞の成長ないしは増殖を阻害するか、又は細胞の死を誘導してもよい。診断のために、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固形支持体等に付着されてもよい。

一態様では、本発明は、本発明の抗体の製造方法を提供する。例えば、本発明は、ＣＤ７９ｂ抗体(本明細書で定義されるように、完全長及びその断片を含む)の製造方法であって、適切な宿主細胞において該抗体(又はその断片)をコードする本発明の組み換えベクターを発現させ、該抗体を回収することを含む方法を提供する。

【００１９】

一態様では、本発明は、本発明の抗体又は本発明の抗体－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である。

一態様では、本発明は、容器と、容器内に内包される組成物とを具備し、該組成物が一又は複数の本発明のＣＤ７９ｂ抗体を含むものである製造品を提供する。

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数のＣＤ７９ｂ抗体を含む組成物を含む第一容器と、バッファを含む第二容器とを具備するキットを提供する。

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ＣＤ７９ｂ抗体の使用を提供する。

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製造品の使用を提供する。

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。

【００２０】

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂ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。

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞を含む癌性の腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、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、ＣＤ７９ｂ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。

【００２１】

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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。
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。
一態様では、本発明は、Ｂ細胞増殖の阻害方法であって、ＣＤ７９ｂ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。
【００２２】
一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを含有することが疑われる試料においてＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂに対する該抗体の結合を決定することを含み、このとき該試料におけるＣＤ７９ｂ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。
一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂに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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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。
【００２３】
一態様では、本発明は、血液又は血清における可溶性ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂの増加を検出することを含む方法を提供する。
一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に本発明の抗体を結合させる方法であって、該細胞を本発明の抗体と接触させることを含む方法を提供する。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。

実施態様
１．　(a)
(i)　KASQSVDYDGDSFLN（配列番号：１３１)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１
(ii)　AASNLES（配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２
(iii) QQSNEDPLT（配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３
(iv)　GYTFSSYWIE（配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１
(v)　GEILPGGGDTNYNEIFKG（配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、
(vi)　TRRVPVYFDY（配列番号：１３６)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３からなる群から選択される少なくとも１のＨＶＲ配列と、
(b) 配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４、１３５又は１３６に示される配列の少なくとも１の残基の修飾を含む少なくとも１の変異ＨＶＲ
とを含む、抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２．　変異体ＨＶＲ－Ｈ３のＦ６がＩであり、Ｆ７がＲであり、Ｆ８がＬである、実施態様１に記載の抗体。
３．　変異体ＨＶＲ－Ｌ１のＡ９がＥ又はＳである、実施態様１又は２に記載の抗体。
４．　フレームワーク配列の少なくとも一部が、ヒトのコンセンサスフレームワーク配列である、実施態様１に記載の抗体。
５．　前記修飾が置換、挿入又は欠失である、実施態様１に記載の抗体。

６．　ＨＶＲ－Ｌ１変異体が、Ａ４(Ｋ)、Ａ９(Ｅ又はＳ)及びＡ１０(Ａ又はＳ)のいずれかに１の置換を含む、実施態様１に記載の抗体。
７．　ＨＶＲ－Ｌ２変異体が、Ｂ２(Ｓ又はＧ)、Ｂ３(Ｒ又はＧ)、Ｂ４(Ｋ、Ｒ、Ｙ、Ｉ、Ｈ又はＱ)、Ｂ５(Ｒ)、Ｂ６(Ｇ、Ｋ、Ａ、Ｒ、Ｓ又はＬ)及びＢ７(Ｒ、Ｎ、Ｔ又はＧ)のいずれか１又はいずれかの組合せに１～５(１、２、３、４又は５)の置換を含む、実施態様１に記載の抗体。
８．　ＨＶＲ－Ｌ３変異体が、Ｃ１(Ｎ又はＤ)、Ｃ２(Ｎ又はＰ)、Ｃ３(Ｄ又はＲ)、Ｃ５(Ｓ、Ｋ、Ａ、Ｑ、Ｄ、Ｌ又はＧ)、Ｃ６(Ａ、Ｅ又はＮ)、Ｃ７(Ａ)、Ｃ８(Ｒ)及びＣ９(Ｎ)のいずれか１又はいずれかの組合せに１～４(１、２、３又は４)の置換を含む、実施態様１に記載の抗体。
９．　ＨＶＲ－Ｈ１変異体が、Ｄ１(Ｐ)、Ｄ２(Ｆ)、Ｄ３(Ｐ、Ｓ、Ｙ、Ｇ又はＮ)、Ｄ４(Ｌ又はＶ)、Ｄ５(Ｔ、Ｒ、Ｎ、Ｋ、Ｃ、Ｇ又はＰ)、Ｄ６(Ｒ、Ｔ、Ｋ又はＧ)、Ｄ８(Ｆ)、Ｄ９(Ｖ又はＬ)及びＤ１０(Ｓ、Ｑ、Ｎ又はＤ)のいずれか１又はいずれかの組合せに１～７(１、２、３、４、５、６又は７)の置換を含む、実施態様１に記載の抗体。
１０．　ＨＶＲ－Ｈ３変異体が、Ｆ４(Ｒ又はＩ)、Ｆ６(Ｉ又はＦ)、Ｆ７(Ｋ、Ｃ、Ｒ、Ｖ又はＦ)、Ｆ８(Ｌ)及びＦ９(Ｓ)のいずれか１又はいずれかの組合せに１～３(１、２又は３)の置換を含む、実施態様１に記載の抗体。
１１．　配列番号：１３５の配列を有するＨＶＲ－Ｈ２を含む、実施態様１に記載の抗体。
１２．　変異体ＨＶＲ－Ｈ３のＦ６がＩである、実施態様１に記載の抗体。
１３．　変異体ＨＶＲ－Ｈ３のＦ７がＲである、実施態様１に記載の抗体。
１４．　変異体ＨＶＲ－Ｈ３のＦ８がＬである、実施態様１に記載の抗体。
１５．　変異体ＨＶＲ－Ｌ１のＡ９がＥである、実施態様１に記載の抗体。
１６．　変異体ＨＶＲ－Ｌ１のＡ９がＳである、実施態様１に記載の抗体。
１７．　ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性が、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含むマウス抗体の一価性親和性と実質的に同じであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
１８．　ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性が、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含むマウス抗体又はキメラ抗体の一価性親和性の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０倍であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
１９．　ヒトＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性が、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含むマウス抗体又はキメラ抗体の一価性親和性の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５又は６０分の１であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２０．　マウス抗体が１９９３年７月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生産される、実施態様１７から１９のいずれか一に記載のヒト化抗体。
２１．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が二価の形態のマウス抗体の親和性と実質的に同じであり、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含む、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２２．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が、二価の形態のマウス抗体又はキメラ抗体の親和性の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０倍であり、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含む、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２３．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が、二価の形態のマウス抗体又はキメラ抗体の親和性の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５又は６０分の１であり、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(

配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖可変配列を含む、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２４．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．４ｎＭである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２５．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．４ｎＭ±０．０４である、実施態様２４に記載のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２６．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．２ｎＭである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２７．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．２ｎＭ±０．０２である、実施態様２６に記載のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２８．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．５ｎＭである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
２９．　ヒトＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性が０．５ｎＭ±０．１である、実施態様２８に記載のヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
３０．　結合親和性がＫｄ値として表される、実施態様１７から２９のいずれか一に記載の抗体。
３１．　結合親和性がＢｉａｃｏｒｅ又はラジオイムノアッセイによって測定される、実施態様１７から２９のいずれか一に記載の抗体。
３２．　ヒトκサブグループ１コンセンサスフレームワーク配列を含む、実施態様１から３のいずれか一に記載の抗体。
３３．　重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む、実施態様１から３のいずれか一に記載の抗体。
３４．　フレームワーク配列が位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む、実施態様３３に記載の抗体。
３５．　前記置換がＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及び／又はＬ７８Ａである、実施態様３４に記載の抗体。
３６．　フレームワーク配列が位置４８、６７、６９、７１、７３及び／又は７８に置換を含む、実施態様３５に記載の抗体。
３７．　前記置換がＶ４８Ｉ、Ｆ６７Ａ、Ｉ６９Ｆ、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及び／又はＬ７８Ａである、実施態様３６に記載の抗体。
３８．　フレームワーク配列が位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む、実施態様３３に記載の抗体。
３９．　前記置換がＶ４８Ｉ、Ｆ６７Ａ、Ｉ６９Ｆ、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、Ｋ７５Ｓ、Ｌ７８Ａ及び／又はＬ８０Ｍである、実施態様３８に記載の抗体。
４０．　フレームワーク配列が位置４に置換を含む、実施態様３２に記載の抗体。
４１．　前記置換がＭ４Ｌである、実施態様４０に記載の抗体。
４２．　フレームワーク配列が位置４７に置換を含む、実施態様３２に記載の抗体。
４３．　前記置換がＬ４７Ｆである、実施態様４２に記載の抗体。
４４．　フレームワーク配列が位置４及び／又は位置４７に置換を含む、実施態様３２に記載の抗体。
４５．　前記置換がＭ４Ｌ及び／又はＬ４７Ｆである、実施態様４４に記載の抗体。
４６．　細胞障害性剤にコンジュゲートされている場合に腫瘍細胞増殖を阻害する、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体。
４７．　ヒト化抗体及びキメラ抗体が一価性又は二価性である、実施態様１から４６のいずれか一に記載の抗体。
４８．　ヒト化抗体及びキメラ抗体がＦｃ領域に結合された単一のＦａｂ領域を含む、実施態様１から４７のいずれか一に記載の抗体。
４９．　図１５(配列番号：１６４－１６６)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗体。
５０．　可変ドメインが図１５(配列番号：１６０－１６３)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む、実施態様４９に記載の抗体

。
５１．　抗体が、図１５(配列番号：１６７及び／又は１６８)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む、実施態様４９又は５０に記載の抗体。
５２．　図１５(配列番号：１５６－１５８)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体。
５３．　可変ドメインが図１５(配列番号：１５２－１５５)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む、実施態様５２に記載の抗体。
５４．　抗体が、図１５(配列番号：１５９)に示されるＣＬ１配列を含む、実施態様５２又は５３に記載の抗体。
５５．　図１５(配列番号：１７０)に示される配列を含むポリペプチド。
５６．　図１５(配列番号：１６９)に示される配列を含むポリペプチド。
５７．　(ａ) 実施態様４９から５１のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様５２から５４のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体を発現する細胞を培養する、そして、(ｂ) 前記の培養された細胞から抗体を単離する
という工程によって作製される抗体。
５８．　実施態様４９から５１のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様５２から５４のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体。
５９．　抗体が一価性であり、Ｆｃ領域を含む、実施態様５８に記載の抗体。
６０．　図１６(配列番号：１８３－１８５)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体。
６１．　可変ドメインが図１６(配列番号：１７９－１８２)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む、実施態様６０に記載の抗体。
６２．　抗体が、図１６(配列番号：１８６及び／又は１８７)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む、実施態様６０又は６１に記載の抗体。
６３．　図１６(配列番号：１７５－１７７)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体。
６４．　可変ドメインが図１６(配列番号：１７１－１７４)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む、実施態様６３に記載の抗体。
６５．　抗体が、図１６(配列番号：１７８)に示されるＣＬ１配列を含む、実施態様６３又は６４に記載の抗体。
６６．　図１６(配列番号：１８９)に示される配列を含むポリペプチド。
６７．　図１６(配列番号：１８８)に示される配列を含むポリペプチド。
６８．　(ａ) 実施態様６０から６２のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様６３から６５のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体を発現する細胞を培養する、そして、(ｂ) 前記の培養された細胞から抗体を単離する
という工程によって作製される抗体。
６９．　実施態様６０から６２のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様６３から６５のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体。
７０．　抗体が一価性であり、Ｆｃ領域を含む、実施態様６９に記載の抗体。
７１．　図１７(配列番号：２０２－２０４)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体。
７２．　可変ドメインが図１７(配列番号：１９８-２０１)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む、実施態様７１に記載の抗体。
７３．　抗体が、図１７(配列番号：２０５及び／又は２０６)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む、実施態様７１又は７２に記載の抗体。
７４．　図１７(配列番号：１９４－１９６)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体。

７５．　可変ドメインが図１７(配列番号：１９０－１９３)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む、実施態様７４に記載の抗体。
７６．　抗体が、図１７(配列番号：１９７)に示されるＣＬ１配列を含む、実施態様７４又は７５に記載の抗体。
７７．　図８Ａ－Ｂ(配列番号：２０８)に示される配列を含むポリペプチド。
７８．　図７Ａ－Ｂ(配列番号：２０７)に示される配列を含むポリペプチド。
７９．　(ａ) 実施態様７１から７３のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様７４から７６のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体を発現する細胞を培養する、そして、(ｂ) 前記の培養された細胞から抗体を単離する
という工程によって作製される抗体。
８０．　実施態様７１から７３のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様７４から７６のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体。
８１．　抗体が一価性であり、Ｆｃ領域を含む、実施態様８０に記載の抗体。
８２．　図１８(配列番号：２２１－２２３)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体。
８３．　可変ドメインが図１８(配列番号：２１７－２２０)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む、実施態様８２に記載の抗体。
８４．　抗体が、図１８(配列番号：２２４及び／又は２２５)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む、実施態様８２又は８３に記載の抗体。
８５．　図１８(配列番号：２１３－２１５)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体。
８６．　可変ドメインが図１８(配列番号：２０９－２１２)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む、実施態様８５に記載の抗体。
８７．　抗体が、図１８(配列番号：２１６)に示されるＣＬ１配列を含む、実施態様８５又は８６に記載の抗体。
８８．　図１８(配列番号：２２７)に示される配列を含むポリペプチド。
８９．　図１８(配列番号：２２６)に示される配列を含むポリペプチド。
９０．　(ａ) 実施態様８２から８４のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様８５から８７のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体を発現する細胞を培養する、そして、(ｂ) 前記の培養された細胞から抗体を単離する
という工程によって作製される抗体。
９１．　実施態様８２から８４のいずれか一の重鎖可変ドメインと、実施態様８５から８７のいずれか一の軽鎖可変ドメインとを含む抗体。
９２．　抗体が一価性であり、Ｆｃ領域を含む、実施態様９１に記載の抗体。
９３．　配列番号：１６９から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様：１に記載の抗体。
９４．　配列番号：１７０から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
９５．　配列番号：１８８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
９６．　配列番号：１８９から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
９７．　配列番号：２０７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
９８．　配列番号：２０８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
９９．　配列番号：２２６から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配

列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１００．　配列番号：２２７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１０１．　配列番号：１４３、１４４、１４５及び１４６から選択される１、２、３又は４のフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１０２．　配列番号：１３９、１４０、１４１及び１４２から選択される１、２、３又は４のフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１０３．　配列番号：１４３、１４４、１４５及び１４６から選択されるアミノ酸に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３又は４のフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１０４．　配列番号：１３９、１４０、１４１及び１４２から選択されるアミノ酸に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３又は４のフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１に記載の抗体。
１０５．　配列番号：１７０から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様９３に記載の抗体。
１０６．　配列番号：１６９から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様９４の抗体。
１０７．　配列番号：１８９から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様９５に記載の抗体。
１０８．　配列番号：１８８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様９６に記載の抗体。
１０９．　配列番号：２０８から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様９７に記載の抗体。
１１０．　配列番号：２０７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様９８に記載の抗体。
１１１．　配列番号：２２７から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む、実施態様９９に記載の抗体。
１１２．　配列番号：２２６から選択されるアミノ酸配列に少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、実施態様１００に記載の抗体。
１１３．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１７０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。
１１４．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１６９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。
１１５．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１７０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：１６９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とを含む抗体。
１１６．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１８９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。
１１７．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１８８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。
１１８．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１８９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：１８８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とを含む抗体。
１１９．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２０８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。
１２０．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２０７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。
１２１．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２０８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：２０７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とを含む抗体。
１２２．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２２７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。
１２３．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２２６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。
１２４．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：２２７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：２２６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とを含む抗体。
１２５．　実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
１２６．　実施態様１２５に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
１２７．　実施態様１２６に記載のベクターを含む宿主細胞。
１２８．　抗ＣＤ７９ｂ抗体の製造方法であって、(ａ) 抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で真核細胞及びＣＨＯ細胞を含む群から選択される宿主細胞を培養し、そして(ｂ) 抗体を単離する方法。
１２９．　配列番号：2のアミノ酸２９－３９及び配列番号：１６のアミノ酸１－１１のＣＤ７９ｂの領域内のエピトープに結合する、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体。
１３０．　ＣＤ７９ｂが細胞の表面上に発現される、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体。
１３１．　細胞がＢ細胞である、実施態様１３０に記載の抗体。
１３２．　Ｂ細胞がＢ細胞増殖性疾患と関係している、実施態様１３１に記載の抗体。
１３３．　Ｂ細胞増殖性疾患が癌である、実施態様１３２に記載の抗体。
１３４．　Ｂ細胞増殖性疾患が、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選択される、実施態様１３３に記載の抗体。
１３５．　抗体がモノクローナル抗体である、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体。
１３６．　抗体がＦａｂ、Ｆａｂ’-ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又は(Ｆａｂ’)2の断片から選択される抗体断片である、実施態様１３５に記載の抗体。
１３７．　抗体がヒト化される、実施態様１３５に記載の抗体。
１３８．　１９９３年7月２０日に寄託されたＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣから選択された抗体；配列番号：１７０の重鎖可変ドメインと配列番号：１６９の軽鎖可変ドメインとを含む抗体；配列番号：１８９の重鎖可変ドメインと配列番号：１８８の軽鎖可変ドメインとを含む抗体；配列番号：２０８の重鎖可変ドメインと配列番号：２０７の軽鎖可変ドメインとを含む抗体；そして、配列番号：２２７の重鎖可変ドメインと配列番号：２２６の軽鎖可変ドメインとを含む抗体と同じエピトープに結合する、実施態様１、6-１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体。
１３９．　細胞障害性剤に共有結合的に付着している、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。
１４０．　細胞障害性剤が、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溶解性酵素から選択される、実施態様１３９に記載のイムノコンジュゲート。

１４１．　式Ａｂ－(Ｌ－Ｄ)ｐを有し、(ａ) Ａｂが実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体であり、
(ｂ) Ｌはリンカーであり、
(ｃ) Ｄは薬剤部分である、
実施態様１４０に記載のイムノコンジュゲート。
１４２．　Ｌが、６-マレイミドカプロイル(ＭＣ)、マレイミドプロパノイル(ＭＰ)、バリン-シトルリン(ｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｌａ-ｐｈｅ)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボニル(ＰＡＢ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(ＳＰＰ)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(ＳＭＣＣ)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(ＳＩＡＢ)から選択される、実施態様１４１に記載のイムノコンジュゲート。
１４３．　Ｄがアウリスタチン及びドラスタチンから選択される、実施態様１４１に記載のイムノコンジュゲート。
１４４．　実施態様１４１に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容可能な担体とを含有する医薬組成物。
１４５．　ＣＤ７９ｂを発現する細胞の増殖の阻害方法であって、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体と該細胞を接触させることを含み、このことにより該細胞の増殖が阻害される方法。
１４６．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１４５に記載の方法。
１４７．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１４５に記載の方法。
１４８．　癌を有する被検体の治療方法であって、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体の有効量を被検体に投与することを含む方法。
１４９．　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選択される、実施態様１４８に記載の方法。
１５０．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１４８に記載の方法。
１５１．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１４８に記載の方法。
１５２．　被検体の増殖性疾患の治療方法であって、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体の有効量を被検体に投与することを含む方法。
１５３．　前記増殖性疾患が癌である、実施態様１５２に記載の方法。
１５４．　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選択される、実施態様１５３に記載の方法。
１５５．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１５２の方法。
１５６．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１５２の方法。

１５７．　細胞の増殖の阻害方法であって、該細胞の増殖がＣＤ７９ｂの増殖促進効果に少なくともある程度依存しており、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体の有効量と該細胞を接触させることを含み、このことにより該細胞の増殖が阻害される方法。
１５８．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１５７に記載の方法。
１５９．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１５７に記載の方法。
１６０．　哺乳動物の腫瘍の治療的な処置方法であって、該腫瘍の増殖がＣＤ７９ｂの増殖促進効果に少なくともある程度依存しており、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体の有効量と該細胞を接触させることを含む方法。
１６１．　前記腫瘍が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度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と関係している、実施態様１６０に記載の方法。
１６２．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１６０に記載の方法。
１６３．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１６０に記載の方法。
１６４．　ＣＤ７９ｂへのイムノコンジュゲートの結合のために許容される条件下において細胞を実施態様１４２に記載のイムノコンジュゲートにさらすことを含む、Ｂ細胞増殖の阻害方法。
１６５．　Ｂ細胞増殖が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(ＮＨＬ)、高悪性度ＮＨＬ、再発性高悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度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、実施態様１６４に記載の方法。
１６６．　Ｂ細胞が異種移植片である、実施態様１６４に記載の方法。
１６７．　曝露がインビトロで起こる、実施態様１６４に記載の方法。
１６８．　曝露がインビボで起こる、実施態様１６４に記載の方法。
１６９．　ＣＤ７９ｂを含むことが疑われる生体試料中におけるＣＤ７９ｂの存在の決定方法であって、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体に該試料をさらし、該試料におけるＣＤ７９ｂへの該抗体の結合を決定することを含み、このとき該試料中のＣＤ７９ｂへの該抗体の結合が該試料中の該タンパク質の存在を表す方法。
１７０．　生体試料が、Ｂ細胞増殖性疾患を有すると思われる患者からのものである、実施態様１６９に記載の方法。
１７１．　Ｂ細胞増殖性疾患が、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選択される、実施態様１７０に記載の方法。
１７２．　実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体を、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に結合させる方法であって、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体を該細胞と接触させることを含む方法。
１７３．　前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１７２に記載

の方法。
１７４．　前記抗体が増殖阻害性剤にコンジュゲートされている、実施態様１７２に記載の方法。
１７５．　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、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ものであり、このとき親抗体が実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体である、システイン改変抗体。
１７６．　一又は複数の遊離システインアミノ酸が０．６～１．０の範囲のチオ反応値を有する、実施態様１７５に記載の抗体。
１７７．　ｔｈｉｏ 反応試薬との反応性が親抗体よりも高い、実施態様１７５に記載のシステイン改変抗体。
１７８．　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、実施態様１７５に記載のシステイン改変抗体。
１７９．　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、実施態様１７５に記載のシステイン改変抗体。
１８０．　抗体が、細胞障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、実施態様１７５に記載のシステイン改変抗体。
１８１．　細胞障害性剤が、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、実施態様１８０に記載のシステイン改変抗体。
１８２．　抗体がキャプチャ標識、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、実施態様１７５に記載のシステイン改変抗体。
１８３．　抗体がビオチンキャプチャ標識に共有結合的に付着されている、実施態様１８２に記載のシステイン改変抗体。
１８４．　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、実施態様１８２に記載のシステイン改変抗体。
１８５．　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類似体から選択される、実施態様１８４に記載のシステイン改変抗体。
１８６．　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、実施態様１８２に記載のシステイン改変抗体。
１８７．　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、実施態様１８２に記載のシステイン改変抗体。
１８８．　キレートリガンドがＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡ及びＴＥＴＡから選択される、実施態様１８７に記載のシステイン改変抗体。
１８９．　アルブミン結合ペプチドを含む、実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体。
１９０．　アルブミン結合ペプチドが配列番号：２４６－２５０から選択される、実施態様１８８に記載の抗体。
１９１．　親抗体のカバット番号付け表現法に従うところの軽鎖の１５、１１０、１１４、１２１、１２７、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５、２３、８４及び１１２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含み、このとき親抗体が実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１及び２５８のいずれか一に記載の抗体である、システイン改変抗体。

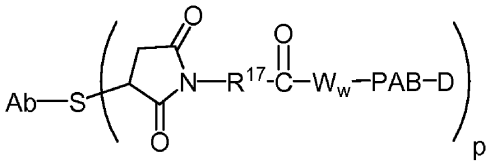
１９２．　システインが軽鎖の位置２０５にある、実施態様１９１に記載の抗体。
１９３．　システインが重鎖の位置１１８にある、実施態様１９１に記載の抗体。
１９４．　システインが重鎖の位置４００にある、実施態様１９１に記載の抗体。
１９５．　抗体がモノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体から選択される、実施態様１９１に記載の抗体。
１９６．　抗体断片である、実施態様１９１に記載の抗体。
１９７．　抗体断片がＦａｂ断片である、実施態様１９６に記載の抗体。
１９８．　キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体から選択される、実施態様１９１に記載の抗体。
１９９．　細菌において製造される、実施態様１９１に記載の抗体。
２００．　ＣＨＯ細胞において製造される、実施態様１９１に記載の抗体。
２０１．　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、該試料を実施態様１８７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。
２０２．　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、実施態様２０１に記載の方法。
２０３．　前記細胞がＢ細胞である、実施態様２０１に記載の方法。
２０４．　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、実施態様２０１に記載の方法。
２０５．　実施態様１９１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。
２０６．　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、実施態様１９１に記載の抗体。
２０７．　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、

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

ここで、ｐが１、２、３又は４である、実施態様２０６に記載の抗体－薬剤コンジュゲート。
２０８．　ｐが２である、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート。
２０９．　Ｌが以下の式を有し、

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

そこで：
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ユニットであり、
ａが０又は１であり、
各々のＷが独立したアミノ酸ユニットであり、
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ユニットであり、そして、ｙが０、１又は２である、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート。
２１０．　以下の式を有し、

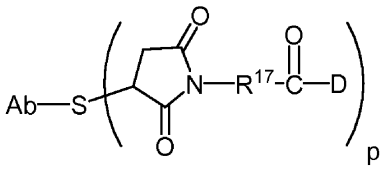


ここで、ＰＡＢがパラ-アミノベンジルカルバモイルであり、そして、Ｒ１７が、(ＣＨ２)-ｒ、Ｃ３－Ｃ８カルボシクリル、Ｏ-(ＣＨ２)ｒ、アリーレン、(ＣＨ２)ｒ-アリーレン、-アリーレン-(ＣＨ２)ｒ-、(ＣＨ２)ｒ-(Ｃ３－Ｃ８-カルボシクリル)、(Ｃ３－Ｃ８カルボシクリル)-(ＣＨ２)ｒ、Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクリル、(ＣＨ２)ｒ-(Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクリル)、(Ｃ３－Ｃ８ヘテロシクリル)-(ＣＨ２)ｒ-、-(ＣＨ２)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２)ｒ-、-(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-、-(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-ＣＨ２-、-(ＣＨ２)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-、-(ＣＨ２)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-ＣＨ２-、-(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-、-(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒ-ＣＨ２-、及び-(ＣＨ２ＣＨ２Ｏ)ｒＣ(Ｏ)ＮＲｂ(ＣＨ２)ｒ-から選択される二価のラジカルであり、このときＲｂがＨ、Ｃ１－Ｃ６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、実施態様２０９に記載の抗体－薬剤コンジュゲート化合物。

２１１．　Ｗｗがバリン-シトルリンである、実施態様２０９に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

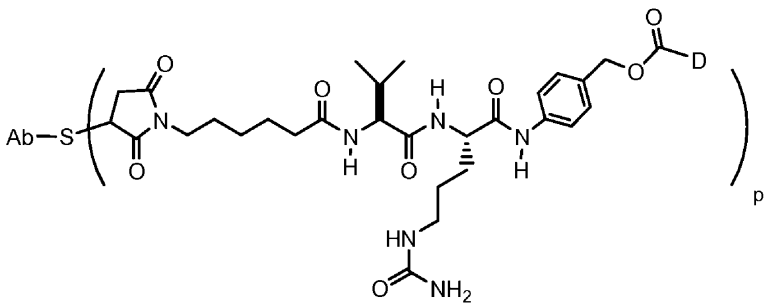
２１２．　Ｒ１７が(ＣＨ２)５又は(ＣＨ２)２である、実施態様２０９に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

２１３．　以下の式を有する、実施態様２０９に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



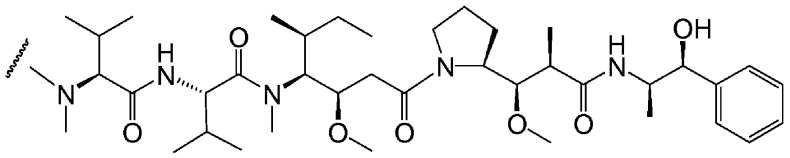
２１４．　Ｒ１７が(ＣＨ２)５又は(ＣＨ２)２である、実施態様２１３に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

２１５．　以下の式を有する、実施態様２０９に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



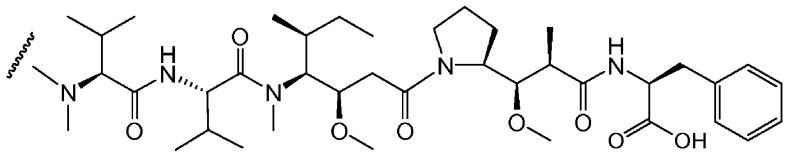
２１６．　ＬがＳＭＣＣ、ＳＰＰ、ＳＰＤＢ又はＢＭＰＥＯである、実施態様２０７に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

２１７．　ＤがＭＭＡＥであり、以下の構造を有し、



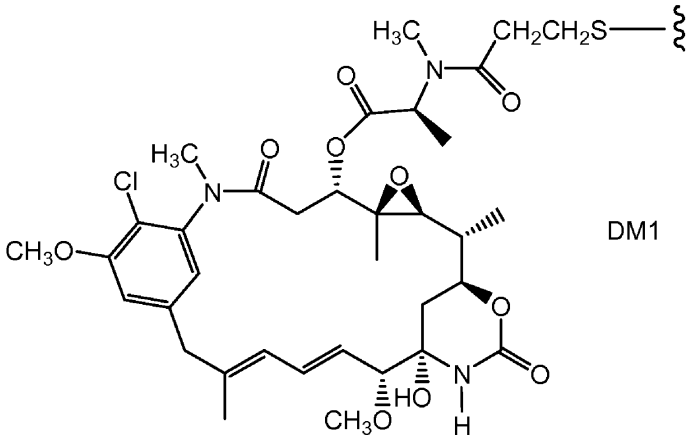
ここで、波形の線がリンカーＬへの付着部位を示す、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート化合物。

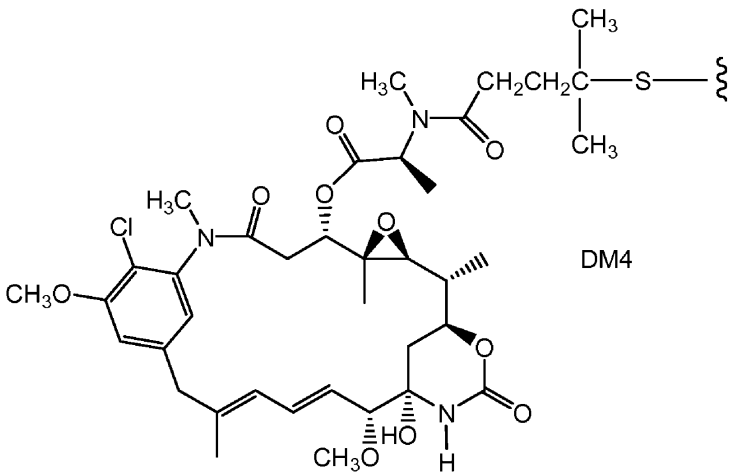
２１８．　ＤがＭＭＡＦであり、以下の構造を有し、



ここで、波形の線がリンカーＬへの付着部位を示す、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート化合物。

２１９．　ＤがＤＭ１又はＤＭ４であり、以下の構造を有し、





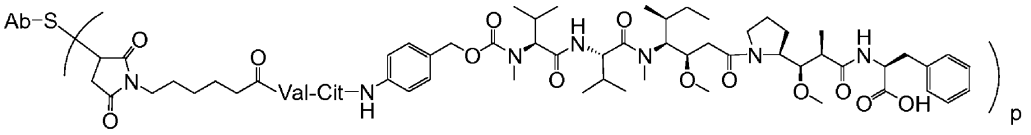
ここで、波形の線がリンカーＬへの付着部位を示す、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート化合物。

２２０．　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、実施態様２０６に記載の抗体-薬剤コンジュゲート

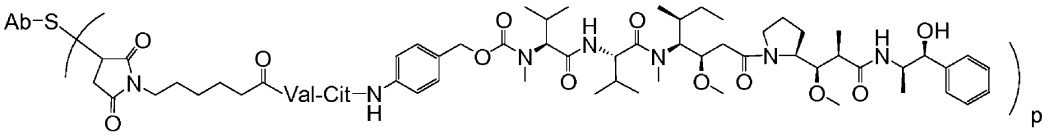
化合物。

２２１．　抗体断片がＦａｂ断片である、実施態様２０６に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

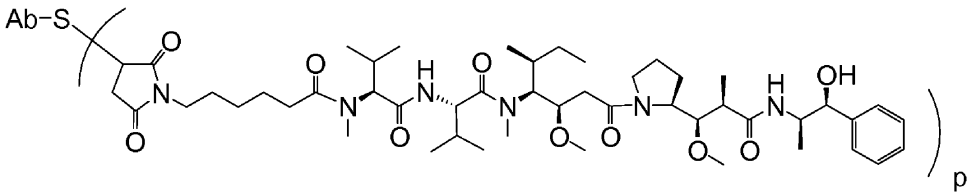
２２２．　以下の構造：



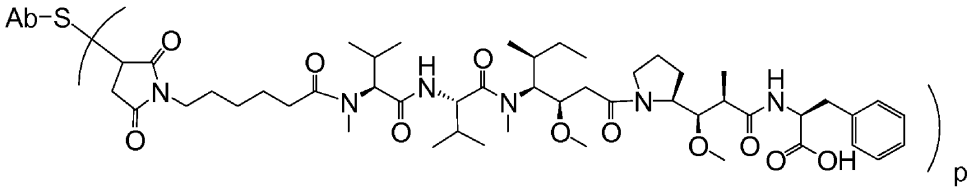
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



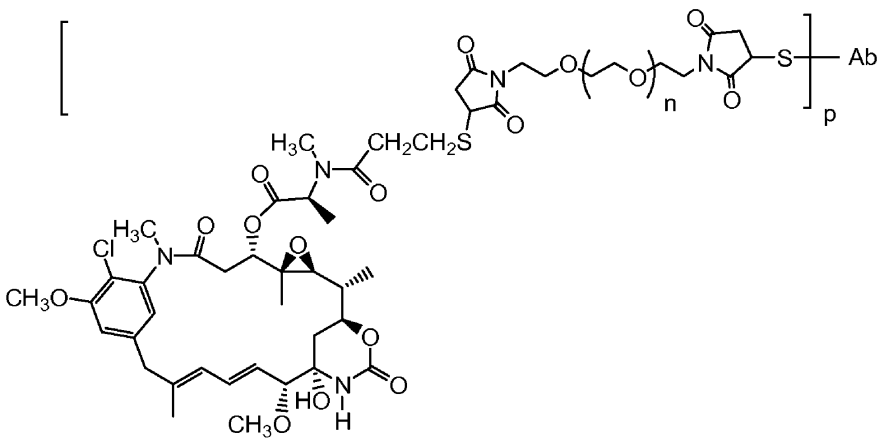
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



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が実施態様１９１に記載の抗体である、抗体－薬剤コンジュゲート。
２２３．　アウリスタチンがＭＭＡＥ又はＭＭＡＦである、実施態様２０６に記載の抗体薬剤コンジュゲート。
２２４．　ＬがＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ又はＭＣである、実施態様２０７に記載の抗体－薬剤コンジュゲート。
２２５．　Ｂ細胞を検出するためのアッセイであり、
(a) 細胞を実施態様２０６に記載の抗体－薬剤コンジュゲート化合物にさらし、そして、
(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。
２２６．　実施態様２０６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。
２２７．　実施態様２０６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。
２２８．　実施態様２２７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。
２２９．　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、実施態様２２８に記載の方法。
２３０．　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障害性剤が投与される、実施態様２２８に記載の方法。
２３１．　実施態様２２７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
とを具備する製造品。
２３２．　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、実施態

様２３１に記載の製造品。
２３３．　実施態様１９１に記載の抗ＣＤ７９ｂ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)とを含む抗体薬剤コンジュゲート化合物の製造方法であって、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に付着しており、該化合物が以下の式Ｉを有し、
Ａｂ－(Ｌ－Ｄ)ｐ　　Ｉ
ここで、ｐが４１、２、３又は４であるものであり、
(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、
(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、そして、
(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。
２３４．　さらに、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞において抗体を発現させる工程を含む、実施態様２３３に記載の方法。
２３５．　さらに、発現された抗体を還元剤にて処理する工程を含む、実施態様２３３に記載の方法。
２３６．　還元剤がＴＣＥＰ及びＤＴＴから選択される、実施態様２３５に記載の方法。
２３７．　さらに、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含む、実施態様２３５に記載の方法。
２３８．　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、実施態様２３７に記載の方法。
２３９．　配列番号：３０４又は２２８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９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４０．　配列番号：３０３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配列と、配列番号：２２８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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４１．　配列番号：３０６又は２３０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９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４２．　配列番号：３０５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配列と、配列番号：２３０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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４３．　配列番号：３０８又は２３２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９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４４．　配列番号：３０７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配列と、配列番号：２３２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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４５．　配列番号：６又は２３６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９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４６．　配列番号：４又は２３５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９０％の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４７．　配列番号：４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配列と、配列番号：２３６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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４８．　配列番号：２３５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配列と、配列番号：６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配

列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２４９．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：３０１から選択される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。
２５０．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：３０２から選択される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。
２５１．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：３０１から選択される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：３０２から選択される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とを含む抗体。
２５２．　配列番号：２４３又は２４４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９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２５３．　配列番号：２４１又は３００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９０％の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２５４．　配列番号：２４１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配列と、配列番号：２４４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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２５５．　配列番号：３００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配列と、配列番号：２４３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配列とを含む、実施態様１９１に記載の抗体。
２５６．　実施態様１、６－１０、５８、６９、８０、９１、１１５、１１８、１２１、１２４、２５１又は２５８のいずれか一に記載の抗体を含有する組成物。
２５７．　組成物が担体を含有する、実施態様２５６に記載の組成物。
２５８．　ＣＤ７９ｂに結合する抗体であって、配列番号：１４から選択される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：１０から選択される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とを含む抗体。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】ＰＲＯ３６２４９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：１)を示し、配列番号：１は本明細書中では「ＤＮＡ２２５７８６」として称されるクローンである(本明細書中では「ＣＤ７９ｂ」とも称される)。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に示す配列番号：１のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：２)を示す。
【図３】キメラＣＤ７９ｂマウス抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)　ＩｇＧ1の軽鎖のヌクレオチド配列(配列番号：３)を示す(ＭＡ７９ｂはマウスモノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体である)。ヌクレオチド配列はｃｈＭＡ７９ｂ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４】図３に示す配列番号：３のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：４)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５】キメラマウス抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)ＩｇＧ１の重鎖のヌクレオチド配列(配列番号：５)を示す(ＭＡ７９ｂはマウスモノクローナル抗ＣＤ７９ｂ抗体である)。ヌクレオチド配列はｃｈＭＡ７９ｂ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６】図５に示す配列番号：５のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：６)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７Ａ－Ｂ】以下の可変軽鎖の配列のアラインメントを示す。ＶＬ－ＦＲ１、ＶＬ－ＦＲ２、ＶＬ－ＦＲ３、ＶＬ－ＦＲ４を有する軽鎖ヒトκＩコンセンサス配列(「ｈｕＫＩ

」と表示；配列番号：９)(それぞれ配列番号：１３９－１４２)、マウス抗ＣＤ７９ｂ抗体(「ＭＡ７９ｂ」と表示；配列番号：１０)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(「ｈｕＭＡ７９ｂグラフト」と表示；配列番号：１１)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７」と表示；配列番号：１６９)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１８(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８」と表示；配列番号：１８８)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８」と表示；配列番号：２０７)及びＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体３２(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２」と表示；配列番号：２２６)。位置はカバットに従って番号付けし、ＭＡ７９ｂから可変軽鎖κＩコンセンサスフレームワークへの移植された高頻度可変領域(ＨＶＲ)を囲みで表す。

【図８Ａ－Ｂ】以下の可変重鎖の配列のアラインメントを示す。ＶＨ－ＦＲ１、ＶＨ－ＦＲ２、ＶＨ－ＦＲ３及びＶＨ－ＦＲ４を有する重鎖ヒトサブグループIIIコンセンサス配列(「ｈｕｍIII」と表示；配列番号：１３)(配列番号：１４３－１４６)、マウス抗ＣＤ７９ｂ抗体(「ＭＡ７９ｂ」と表示；配列番号：１４)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(「ｈｕＭＡ７９ｂグラフト」と表示；配列番号：１５)(７１Ａ、７３Ｔ及び７８Ａを含む)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７」と表示；配列番号：１７０)(７１Ａ、７３Ｔ及び７８Ａを含む)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１８(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８」と表示；配列番号：１８９)(７１Ａ、７３Ｔ及び７８Ａを含む)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８」と表示；配列番号：２０８)(７１Ａ、７３Ｔ及び７８Ａを含む)、及びＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体３２(「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２」と表示；配列番号：２２７)(７１Ａ、７３Ｔ及び７８Ａを含む)。位置はカバットに従って番号付けし、ＭＡ７９ｂから可変重鎖サブグループIIIコンセンサスフレームワークへの移植された高頻度可変領域(ＨＶＲ)を囲みで表す。

【図９】選択されたＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(配列番号：１７－２１)の様々なＨＶＲ配列を示し、各変異体は、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体の単一のＨＶＲ(ＨＶＲ-Ｌ１(配列番号：１３１)；ＨＶＲ-Ｌ２(配列番号：１３２)；ＨＶＲ-Ｌ３(配列番号：１３３))内に単一のアミノ酸変化を有する。示した単一のアミノ酸変化を除いて可変軽鎖及び可変重鎖の配列は、ｈｕＭＡ７９ｂグラフトと同じであり、示していない。ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体のＨＶＲ-Ｈ１(配列番号：１３４)、ＨＶＲ-Ｈ２(配列番号：１３５)又はＨＶＲ-Ｈ３(配列番号：１３６)には変化は観察されなかった。

【図１０】ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２－２(本明細書中では「Ｌ２」とも称される)及びｈｕＭＡ７９ｂ　Ｈ３－１０(本明細書中では「Ｈ３」とも称される)を含む、選択されたＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体の様々なＨＶＲ配列(配列番号：２２－１０６)を示し、各変異体は、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体の単一のＨＶＲ領域(ＨＶＲ-Ｌ２(配列番号：１３２)；ＨＶＲ-Ｌ３(配列番号：１３３)；ＨＶＲ-Ｈ１(配列番号：１３４)；ＨＶＲ-Ｈ３(配列番号：１３６)の一部が配列番号：１０７として図１０に示される)内に複数のアミノ酸変化を有する。示したアミノ酸変化を除いて可変軽鎖及び可変重鎖の配列は、ｈｕＭＡ７９ｂグラフトと同じであり、示していない。ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体のＨＶＲ-Ｌ１(配列番号：１３１)又はＨＶＲ-Ｈ２(配列番号：１３５)には変化は観察されなかった。

【図１１】マウスＣＤ７９ｂ抗体(「ＭＡ７９ｂ」と表示)と、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(「ｈｕＭＡ７９ｂグラフト」と表示)と、ヒトＣＤ７９ｂの細胞外ドメイン(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$)、Ｆｃに融合させたヒトＣＤ７９ｂの細胞外ドメイン(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$－Ｆｃ)及びＭＡ７９ｂ及びｃｈＭＡ７９ｂのためのエピトープを含有する１６アミノ酸ペプチド(配列番号：１６)を含む所定の抗原に対する、ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２-２(５２Ｒ、５３Ｋ、５５Ｇ、５６Ｒ；配列番号：２２)、ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｈ３-１０（９８Ｉ、９９Ｒ、１００Ｌ；配列番号：９４)、ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｈ１-６（２８Ｐ、３０Ｔ、３１Ｒ、３５Ｎ；配列番号：５７)及びｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２/Ｈ３（下記のＬ２-２及び

Ｈ3-１０変異)を含むＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体とを含む、選択された抗ＣＤ７９ｂ抗体のＢｉａｃｏｒｅ分析を示す。
【図１２】ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(「ｈｕＭＡ７９ｂグラフト」と表示)と、ヒトＣＤ７９ｂの細胞外ドメイン(ｈｕＣＤ７９ｂ-ｅｃｄ抗原)に対する、MA79ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(第一列の１－３４又は第一列の「すべてのフレームワーク」と表示)を含む、選択された抗ＣＤ７９ｂ抗体のＢｉａｃｏｒｅ分析を示す。ＭＡ79ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体には、潜在的に重要なマウスフレームワーク残基が存在する「すべてのフレームワーク」変異体と、表される可変軽鎖及び可変重鎖内のＨＶＲ変異の有無にかかわらず、フレームワーク突然変異の組合せを有する変異体(１－３４と表示)が含まれる。ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７(本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７」と称される)は第一列の１７と表示され、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１８(本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８」と称される)は第一列の１８と表示され、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８」と称される)は第一列の２８と表示され、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体３２(本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２」と称される)は第一列の３２と表示される。二価の結合倍数は、特定のＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＫｄ(「$Kd_{変異体}$」と表示)／キメラＭＡ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)のＫｄ(「$Kd_{キメラ}$」と表示)として表され、「二価の結合倍数」と表示した列の値は$Kd_{変異体}$／$Kd_{キメラ}$を表す。検出されない結合は「ＮＤＢ」として図に表される。
【図１３Ａ－Ｂ】以下のように配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す(可変重鎖(ＶＨ)コンセンサスフレームワーク)。ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１０８)、ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１０９－１１１)、ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１１２)、ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１１３－１１５)、ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１１６)、ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１１７－１１９)、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１２０)、ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１２１－１２２)、ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１２３)、及びヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１２４－２６)。
【図１４】以下のように配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す(可変軽鎖(ＶＬ)コンセンサスフレームワーク)。ヒトＶＬκサブグループIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２７)、ヒトＶＬκサブグループIIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２８)、ヒトκサブグループIIIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２９)、及びヒトκサブグループIVコンセンサスフレームワーク(配列番号：１３０)。
【図１５】本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７)のアミノ酸配列を示す(Ａ：軽鎖、Ｂ：重鎖)。図１５Ａ(軽鎖)及び１５Ｂ(重鎖)は、本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７)の一実施態様のフレームワーク(ＦＲ)、高頻度変異領域(ＨＶＲ)、第一定常ドメイン(ＣＬ又はＣＨ１)及びＦｃ領域(Ｆｃ)のアミノ酸配列を示す(配列番号：１５２－１５９(図１５Ａ)及び配列番号：１６０－１６８(図１５Ｂ))。ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列(可変及び定常領域)が示され(それぞれ配列番号：３０３(図１５Ａ)及び３０４(図１５Ｂ))、定常ドメインを下線で示す。可変ドメインのアミノ酸配列が示される(配列番号：１６９(軽鎖について図１５Ａ)及び配列番号：１７０(重鎖について図１５Ｂ))。
【図１６】本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８)のアミノ酸配列を示す(Ａ：軽鎖、Ｂ：重鎖)。図１６Ａ(軽鎖)及び１６Ｂ(重鎖)は、本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８)の一

実施態様のフレームワーク(ＦＲ)、高頻度変異領域(ＨＶＲ)、第一定常ドメイン(ＣＬ又はＣＨ１)及びＦｃ領域(Ｆｃ)のアミノ酸配列を示す(配列番号：１７１－１７８(図１６Ａ)及び配列番号：１７９－１８７(図１６Ｂ))。ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列(可変及び定常領域)が示され(それぞれ配列番号：３０５(図１６Ａ)及び３０６(図１６Ｂ))、定常ドメインを下線で示す。可変ドメインのアミノ酸配列が示される(配列番号：１８８(軽鎖について図１６Ａ)及び配列番号：１８９(重鎖について図１６Ｂ))。

【図１７】本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８)のアミノ酸配列を示す(Ａ：軽鎖、Ｂ：重鎖)。図１７Ａ(軽鎖)及び１７Ｂ(重鎖)は、本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８)の一実施態様のフレームワーク(ＦＲ)、高頻度変異領域(ＨＶＲ)、第一定常ドメイン(ＣＬ又はＣＨ１)及びＦｃ領域(Ｆｃ)のアミノ酸配列を示す(配列番号：１９０－１９７(図１７Ａ)及び配列番号：１９８－２０６(図１７Ｂ))。ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列(可変及び定常領域)が示され(それぞれ配列番号：３０７(図１７Ａ)及び３０８(図１７Ｂ))、定常ドメインを下線で示す。可変ドメインのアミノ酸配列が示される(配列番号：２０７(軽鎖について図１７Ａ)及び配列番号：２０８(重鎖について図１７Ｂ))。

【図１８】本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２)のアミノ酸配列を示す(Ａ：軽鎖、Ｂ：重鎖)。図１８Ａ(軽鎖)及び１８Ｂ(重鎖)は、本発明の抗体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２)の一実施態様のフレームワーク(ＦＲ)、高頻度変異領域(ＨＶＲ)、第一定常ドメイン(ＣＬ又はＣＨ１)及びＦｃ領域(Ｆｃ)のアミノ酸配列を示す(配列番号：２０９－２１６(図１８Ａ)及び配列番号：２１７－２２５(図１８Ｂ))。ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列(可変及び定常領域)が示され(それぞれ配列番号：３０９(図１８Ａ)及び３１０(図１８Ｂ))、定常ドメインを下線で示す。可変ドメインのアミノ酸配列が示される(配列番号：２２６(軽鎖について図１８Ａ)及び配列番号：２２７(重鎖について図１８Ｂ))。

【図１９】ヒト(配列番号：２)、カニクイザル(ｃｙｎｏ)(配列番号：７)及びマウス(配列番号：８)からのＣＤ７９ｂのアミノ酸配列のアラインメントを示す。ヒト及びｃｙｎｏ-ＣＤ７９ｂは８５％のアミノ酸同一性を有する。シグナル配列、試験ペプチド(実施例１に記載のＭＡ７９ｂ、ｃｈＭＡ７９ｂ及び抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体に対する１１のアミノ酸エピトープ；ARSEDRYRNPK (配列番号：１２))、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(ＩＴＡＭ)ドメインを示す。囲みで示す領域は、ＣＤ７９ｂのスプライス変異体には存在しないＣＤ７９ｂの領域である(実施例１に記載)。

【図２０】ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ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マウスへの抗ＣＤ７９ｂ抗体((ａ) ｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ２．９(表９)、(ｂ) ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ２．４(表９))の投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。コントロールは、ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-ＳＭＣＣ-ＤＭ１(抗ＨＥＲ２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)を含んだ。

【図２１Ａ】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、これは、ヒトＢ細胞腫瘍を有するＳＣＩＤマウスへの抗ＣＤ７９ｂ抗体((ａ) ｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ３．６(表１０)、(ｂ) ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ３．４(表１０)、(ｃ) ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ３．３又は３．４(表１０)、(ｄ) ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ３．４(表１０)、(ｅ) ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ２．９(表１０))の投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。コントロールは、ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)-ＳＭＣＣ-ＤＭ１(抗ＨＥＲ２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)を含んだ。

【図２１Ｂ】Ｇｒａｎｔａ－５１９異種移植片試験(図２１Ａ及び表１０)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７日間は有意な変化がなかったこ

とを示す。「ｈｕ」はヒト化抗体を指し、「ｃｈ」はキメラ抗体を指す。
【図２２】システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を描写する。ここでは、軽鎖(ＬＣ-ＡＤＣ)；重鎖(ＨＣ-ＡＤＣ)；及びＦｃ領域(Ｆｃ-ＡＤＣ)内の改変システイン基に薬剤成分が付着されている。
【図２３】(i) 還元剤ＴＣＥＰ(トリス(２-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド)による、システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ＴｈｉｏＭａｂ)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) ｄｈＡＡ(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－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ＣＤ７９ｂ薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)を形成させる、という工程を示す。
【図２４】ヒト化システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＨＣ-Ａ１１８Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２２９)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２２８)を示す。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。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。「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２５】ヒト化システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ-Ａ１１８Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２３１)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２３０)を示す。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。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。「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２６】ヒト化システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ-Ａ１１８Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２３３)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２３２)を示す。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。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。「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２７】システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ-ＬＣ-Ｖ２０５Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２３５)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２３４)を示す。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２０９)はシステインに変えられている。薬剤成分は、軽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。「Ｔｈｉｏ」はシステイン改変抗体を指す。
【図２８】システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ-ＨＣ-Ａ１１８Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２３７)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２３６)を示す。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。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。「Ｔｈｉｏ」はシステイン改変抗体を指す。
【図２９】ＦＡＣＳプロット。これは、ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ細胞の表面に発現され

るＣＤ７９ｂに対する本発明の抗ＣＤ７９ｂ ｔｈｉｏＭＡｂ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) ｔｈｉｏＭＡｂ変異体及び(Ｂ) ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ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３０】ＦＡＣＳプロット。これは、ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ細胞の表面に発現されるＣＤ７９ｂに対する本発明の抗ＣＤ７９ｂ ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)の結合が、(Ａ)ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８のネイキッド(コンジュゲートされていない)ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ変異体、及び示される異なる薬剤コンジュゲート((Ｂ) ＭＭＡＦ、(Ｃ) ＭＭＡＥ及び(Ｄ) ＤＭ１)を有するｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８のコンジュゲートされたＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ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し、「ｈｕ」はヒト化抗体を指す。

【図３１】ＦＡＣＳプロット。これは、ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ細胞の表面に発現されるＣＤ７９ｂに対する本発明の抗ＣＤ７９ｂ ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)の結合が、(Ａ)ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８のネイキッド(コンジュゲートされていない)ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ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ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８のコンジュゲートされたＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ変異体と同程度であることを示す。ＭＳ抗ヒト－ＰＥにより検出した。「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３２】ＦＡＣＳプロット。これは、ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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 ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)の結合が、(Ａ)抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)のネイキッド(コンジュゲートされていない)ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ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(ｃｈ１０Ｄ１０)のコンジュゲートされたＨＣ（Ａ１１８Ｃ）ｔｈｉｏＭＡｂ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３３Ａ】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る。これは、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。ｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１１)又はｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ－ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．８(表１１)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ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｃｈＭＡ７９ｂ－ＭＣ－ＭＭＡＦを含んだ。

【図３３Ｂ】Ｇｒａｎｔａ－５１９異種移植片試験(図３３Ａ及び表１１)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３４Ａ】ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ(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る。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(ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１又はＭＣ-ＭＭＡＦ)にコンジュゲートさせた抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．８７(表１２)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１２)、又はｔ

ｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８－HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９５(表１２)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-BMPEO-DM１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MCｖｃＰＡＢ-MMＡＥ)、ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８コントロール(ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-ＳMCＣ-DM１及びｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-HC(Ａ１１８Ｃ))及び抗ＣＤ２２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ)を含んだ。

【図３４Ｂ】ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ異種移植片試験(図３４Ａ及び表１２)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７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３５Ａ】ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２(びまん性大細胞型リンパ腫)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る。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(ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＢＭＰＥＯ-DM１又はMC-MMＡＦ)にコンジュゲートさせた抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８－HC(Ａ１１８Ｃ)-MCｖｃＰＡＢ-MMＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．８７(表１３)、ｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８－HC(Ａ１１８Ｃ)-BMPEO-DM１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１３)、又はｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８－HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９５(表１３)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-BMPEO-DM１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MCｖｃＰＡＢ-MMＡＥ)、ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８コントロール(ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-ＳMCＣ-DM１及びｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-HC(Ａ１１８Ｃ))及び抗ＣＤ２２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ)を含んだ。

【図３５Ｂ】ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２異種移植片試験(図３５Ａ及び表１３)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７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３６】ＤＯＨＨ２(濾胞性リンパ腫)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る。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 ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-BMPEO-DM１(薬剤負荷はおよそ１．８５(表１４))、ｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８－MC－MMＡＦ(薬剤負荷はおよそ１．９５(表１４))又はｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ－HC(Ａ１１８Ｃ)-MCｖｃＰＡＢ-MMＡＥ(薬剤負荷はおよそ１．８７(表１４))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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-BMPEO-DM１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－HC(Ａ１１８Ｃ)-MCｖｃＰＡＢ-MMＡＥ)、ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８コントロール(ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-ＳMCＣ-DM１及びｔｈｉｏ ｈｕMA７９ｂ.ｖ２８-HC(Ａ１１８Ｃ))及び抗ＣＤ２２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-HC(Ａ１１８Ｃ)-MC－MMＡＦ)を含んだ。「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３７】ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ(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る。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(ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＢＭＰＥＯ-DM１又はMC-MMＡＦ)にコンジュゲートさせた、及び／又は異なる用量で投与した抗ＣＤ７９ｂ

ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１５)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１５)、又はｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１５)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、ベヒクル(バッファ単独)、抗ＨＥＲ２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ))及び抗ＣＤ２２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ)を含んだ。「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３８Ａ】Ｇｒａｎｔａ－６１９(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る。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又はＭＣ-ＭＭＡＦ)にコンジュゲートさせた、及び／又は示すような異なる用量で投与した抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１６)、又はｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９５(表１６)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ)を含んだ。

【図３８Ｂ】Ｇｒａｎｔａ－５１９異種移植片試験(図３８Ａ及び表１６)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３９】ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２(びまん性大細胞型リンパ腫)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る。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、及び／又は示すような異なる用量で投与した抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１７)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１７)又はｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１７)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、ベヒクル(バッファ単独)及び抗ＨＥＲ２コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)を含んだ。「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４０】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る。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又はＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)にコンジュゲートさせた、及び／又は示すような異なる用量で投与した抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１８)又はｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．８７(表１８)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ

(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)を含んだ。「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４１Ａ－Ｃ】(１)コントロールｔｈｉｏ ｈｕ 抗ｇＤ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、２．０のＭＭＡＥ／Ａｂ負荷、(２)コントロールｔｈｉｏ ｈｕ 抗ｇＤ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、２．１のＭＭＡＦ／Ａｂ負荷、(３)コントロールｔｈｉｏ ｈｕ 抗ｇＤ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、２．１のＤＭ１／Ａｂ負荷、(４)ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、１．９１のＭＭＡＦ／Ａｂ負荷、(５)ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、１．８のＤＭ１／Ａｂ負荷、及び(６)ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、２．０のＭＭＡＥ／Ａｂ負荷を含む、１ｍｌにつき異なる濃度０．００１～１００００ｎｇのＴＤＣにて処置した、(Ａ)ＢＪＡＢ、(Ｂ)Ｇｒａｎｔａ－５１９又は(Ｃ)ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２腫瘍細胞による、インビトロ細胞増殖アッセイ結果のプロットを示す。「Ｔｈｉｏ」はシステイン改変抗体を指し、「ｈｕ」はヒト化抗体を指す。「ｇＤ」は糖タンパク質Ｄを指す。

【図４２】ＰＲＯ２８３６２７ ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：２３８)を示す。ここでは、配列番号：２３５は「ＤＮＡ５４８４５５」(本明細書中では「ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ」とも称される)と称されるクローンである。ヌクレオチド配列はカニクイザル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４３】図４２に示される配列番号：２３５のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：２３９)を示す。

【図４４】抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈ１０Ｄ１０)の軽鎖のヌクレオチド配列(配列番号：２４０)を示す。ヌクレオチド配列は、抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈ１０Ｄ１０)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４５】図４４に示される配列番号：２４０のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：２４１)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(配列番号：３０２)は下線を付していない領域である。

【図４６】抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈ１０Ｄ１０)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ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈ１０Ｄ１０)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４７】図４６に示される配列番号：２４２のコード配列から得られるアミノ酸配列(配列番号：２４３)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(配列番号：３０１)は下線を付していない領域である。

【図４８】システイン改変抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(Ｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ-ＨＣ-Ａ１１８Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：２４５)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２４４)を示す。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。「ｔｈｉｏ 」はシステイン改変抗体を指す。

【図４９】システイン改変抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体(Ｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ-ＬＣ-Ｖ２０５Ｃ)の(Ａ)軽鎖配列(配列番号：３００)及び(Ｂ)重鎖配列(配列番号：２９９)を示す。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２０９)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。「ｔｈｉｏ 」はシステイン改変抗体を指す。

【図５０】ＢＪＡＢ－ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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る。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 ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表１９)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１９)、又はｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１９)、ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８(表１９)、ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、薬剤負荷はおよそ１．９(表１９)又はｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、薬剤負荷はおよそ１．８６(表１９)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ)を含んだ。「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５１】ＢＪＡＢ－ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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る。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ＣＤ７９ｂ ＴＤＣの投与が腫瘍増殖を有意に阻害したことを示す。ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８５(表２０)又はｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、薬剤負荷はおよそ１．８(表２０)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(ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１)及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８コントロール(ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)及び抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)コントロール(ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ))を含む。「ｔｈｉｏ 」はシステイン改変抗体を指し、「ｈｕ」はヒト化抗体を指す。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本発明は、哺乳動物の造血系腫瘍の治療に有用な組成物を同定するための、方法、組成物、キット及び製造品、そして同目的のための組成物の使用方法を提供する。

これらの方法、組成物、キット及び製造品の詳細は本明細書中に示される。

【００２６】

Ｉ． 一般的な技術

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

【００２７】

ＩＩ．定義

本出願を理解するために、以下の定義を適用し、必要な場合はいつでも、単数で使用した用語には複数形も含まれ、その逆もそうである。以下に示すいずれかの定義が出典明記によって本明細書中に援用されるいずれかの文献と矛盾する場合、以下の定義を調節してもよい。

【００２８】

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、Ｂｔｉｇ、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。

【００２９】

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、ＣＤ７９ｂ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「ＤＮＡ５４８４５５」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ＣＤ７９ｂポリペプチド」は、天然由来の対応するＣＤ７９ｂポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このような天然配列ＣＤ７９ｂポリペプチドは、自然から単離されてもよいし、又は組み換え手段又は合成手段によって生産されてもよい。「天然配列ＣＤ７９ｂポリペプチド」なる用語は、特に、特定のＣＤ７９ｂポリペプチドの自然に生じる切断形態又は分泌形態(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を包含する。本発明の特定の実施態様では、本明細書において開示される天然配列ＣＤ７９ｂ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の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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【００３０】
「ＭＡ７９ｂ」又は「マウスＣＤ７９ｂ抗体」又は「マウス抗ＣＤ７９ｂ抗体」は、特に、マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体が配列番号：１０(図７Ａ-Ｂ)の軽鎖可変ドメインと配列番号：１４(図８Ａ-Ｂ)の重鎖可変ドメインとを含む、マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体を指すために用いられる。マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体は、Ｂｉｏｍｅｄａ(抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体；Foster City, CA)、ＢＤｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ(抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体；San Diego, CA)又はＡｎｃｅｌｌ(抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体；Bayport, MN)のような商業的な供与源から購入されてもよいし、又は１９９３年７月２０日にアメリカ培養細胞保存機関(ＡＴＣＣ)に寄託番号ＨＢ１１４１３で寄託されたハイブリドーマクローン３Ａ２-２Ｅ７ＡＴＣＣから生成されてもよい。

【００３１】
「ｃｈＭＡ７９ｂ」又は「キメラＭＡ７９ｂ抗体」は、特に、キメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体が配列番号：４(図４)の軽鎖を含むキメラ抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体(２００６年８月３日に出願の米国特許出願第１１／４６２３３６号に既に記載される)を指すために本明細書中で用いられる。配列番号：４の軽鎖は、配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)の可変ドメインとヒトＩｇＧ１の軽鎖定常ドメインを更に含む。キメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体は、配列番号：６(図６)の重鎖を更に含む。配列番号：６の重鎖は、配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の可変ドメインとヒトＩｇＧ１の重鎖定常ドメインを更に含む。

【００３２】
「抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ」又は「抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ」は、ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(図４３の配列番号：２３９)に結合する抗体(２００６年８月３日に出願の米国特許出願第１１／４６２３３６号に既に記載される)を指すために本明細書中で用いられる。「抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)」又は「ｃｈ１０Ｄ１０」は、ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(図４３の配列番号：２３９)に結合するキメラ抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(２００６年８月３日に出願の米国特許出願第１１／４６２３３６号に既に記載される)を指すために本明細書中で用いられる。抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)又はｃｈ１０Ｄ１０は、配列番号：２４１(図４５)の軽鎖を含むキメラ抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ抗体である。抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)又はｃｈ１０Ｄ１０は、配列番号：２４３(図４７)の重鎖を更に含む。

【００３３】
「ＭＡ７９ｂ－グラフト」又は「ＭＡ７９ｂ－グラフト『ヒト化』抗体」又は「ｈｕＭＡ７９ｂグラフト」は、特に、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及びＬ７８Ａを有するヒトサブグループIIIコンセンサスＶＨ(ｈｕIII)及びアクセプターヒトコンセンサスＶＬκI(ｈｕKI)に、マウス抗ＣＤ７９ｂ抗体(ＭＡ７９ｂ)からの高頻度可変領域を移植することによって生成されるグラフトを指すために本明細書中で用いられる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992))(実施例１Ａ及び図７(配列番号：１１)及び８(配列番号：１５)を参照)。

【００３４】
本明細書で用いるアミノ酸残基／位置の「修飾」とは、開始アミノ酸配列と比較した場合の初性のアミノ酸配列の変化であって、該アミノ酸残基／位置を伴う配列変異から生じる変化を意味する。例えば、典型的な修飾には、ある残基の(又は該位置での)他のアミノ酸への弛緩(例えば保存的置換又は非保存的置換)、該残基／位置に近接する一又は複数(一般的には５ないし３より少ない)のアミノ酸の挿入、及び該残基／位置の欠損などがある。「アミノ酸置換」又はその変異とは、予定される(開始)アミノ酸配列中に存在するアミノ酸残基の異なるアミノ酸残基への置換を意味する。一般的に及び好ましくは、前記修飾によって、開始(又は「野生型」)アミノ酸配列を含有してなるポリペプチドと比較して、変異体ポリペプチドの少なくとも一の物理生化学的な活性に変異が生じる。例えばある抗体の場合、変更された物理生化学的活性は結合親和性、結合能及び／又は標的分子に対する結合効果でありうる。

【００３５】

「抗体」なる用語は、最も広義に使用され、例えば、単一抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、完全長又はインタクトなモノクローナル抗体を含む)、多エピトープ性特異性を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体組成物、ポリクローナル抗体、多価抗体、少なくとも２つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体(例えば所望の生物学的活性を表す限りの二重特異性抗体)、単鎖抗ＣＤ７９ｂ抗体、及び抗ＣＤ７９ｂ抗体の断片(以下を参照)、例えば所望の生物学的活性又は免疫学的活性を表す限りＦａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$及びＦｖ断片、ダイアボディ(diabodies)、単一ドメイン抗体(ｓｄＡｂ)、を具体的に包含する。「イムノグロブリン」(Ｉｇ)なる用語は、本明細書において抗体と交換可能で使われる。抗体はヒト、ヒト化及び／また親和性成熟したものであってもよい。

【００３６】

「抗ＣＤ７９ｂ抗体」又は「ＣＤ７９ｂに結合する抗体」なる用語は、抗体がＣＤ７９ｂをターゲティングする際の診断用及び／又は治療用薬剤として有用である程度十分な親和性を有してＣＤ７９ｂを結合することができる抗体を指す。好ましくは、関連していない非ＣＤ７９ｂタンパク質への抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)によって測定されるように、ＣＤ７９ｂへの抗体の結合のおよそ１０％未満である。ある実施態様では、ＣＤ７９ｂに結合する抗体は、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下、又は０．１ｎＭ以下の解離定数(Ｋｄ)を有する。ある実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、異なる種からのＣＤ７９ｂの中で保存されるＣＤ７９ｂのエピトープに結合する。

【００３７】

「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てもよい。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充分な程度まで、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。

【００３８】

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(C_H)が、μ及びεアイソタイプに対しては４つのC_Hドメインが続く可変ドメイン(V_H)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(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をＮ末端に有する。V_LはV_Hと整列し、C_Lは重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)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。V_LとV_H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。

【００３９】
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(C_H)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。ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ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、ＣＨ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：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２が発現する。

【００４０】
抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖の可変ドメインは「ＶＨ」と称されうる。軽鎖の可変ドメインは「ＶＬ」と称されうる。これらのドメインは一般に、抗体の最も可変部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部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(ＦＲ)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ＦＲ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ＦＲ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(ＡＤＣＣ)における抗体の寄与を示す。

【００４１】
「インタクトな」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_H1、C_H2及びC_H3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、インタクトな抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

本明細書の目的のための「ネイキッド抗体」は、細胞障害性部分又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体である。

「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、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、及びＦｖ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。

【００４２】
抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Ｆｃ」断片を産生する。Ｆａｂ断片は全長Ｌ鎖とＨ鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)からなる。各Ｆａｂ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$F(ab')_2$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Ｆａｂ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。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むC_H1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Ｆａｂ断片と相違する。Ｆａｂ'-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Ｆａｂ'を表す。Ｆ(ａｂ')$_2$抗体断片は、通常はＦａｂ'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。

Ｆｃ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、Ｆｃ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Ｆｃレセプター(ＦｃＲ)によって認識される部位である。

【００４３】

「Ｆｖ」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。単鎖Ｆｖ(ｓｃＦｖ)種では、一重鎖と一軽鎖の可変ドメインはフレキシブルなペプチドリンカーによって共有結合され、軽鎖と重鎖は二本鎖Ｆｖ種のものと類似の「二量体」構造で結びつきうる。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Ｆｖ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。

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

【００４４】

「ダイアボディ」なる用語は、２つの抗原結合部位を有する抗体断片であって、この断片は同じポリペプチド鎖(ＶＨ－ＶＬ)内に軽鎖可変ドメイン(ＶＬ)に連結した重鎖可変ドメイン(ＶＨ)を含むものを指す。小さい抗体断片は、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、V_HとV_Lドメインとの間に、短いリンカー(約５～１０残基)を持つｓＦｖ断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される。ダイアボディは二価でも二重特異性であってもよい。二重特異性ダイアボディは２つの「交差」ｓＦｖ断片のヘテロダイマーであり、そこでは２つの抗体のV_H及びV_L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；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により十分に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまた、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003)において記述される。

本明細書中で用いられる「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる可能性がある自然に生じる突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に対する。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 et al., 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ＤＮＡ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 et al., Nature, 352:624-628 (1991)、及びMarks et al., 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。

【００４５】
本明細書中のモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に相同な又は同一な重鎖及び／又は軽鎖の一部を含むものであり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に相同な又は同一なものである(米国特許第４８１６５６７号；及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。ここで対象とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば、旧世界サル、サルなど)由来の可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。
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。また、以下の総説及びここで引用する文献も参照のこと。Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol., 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994)。
【００４６】
本明細書中で用いられる「ｔｈｉｏ」抗体はシステイン改変抗体を指し、本明細書中で用いられる「ｈｕ」抗体はヒト化抗体を指す。
「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するもの、及び／又はここで開示されたヒト抗体を製造するための何れかの技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む、当該分野で知られている様々な技術を使用して生産することが可能である。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。また、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)；Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)において記述される方法は、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用できる。また、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照のこと。抗原刺激に応答して抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無効になっているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによってヒト抗体を調製することができる(例として、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ^{TM}技術に関する米国特許第６０７５１８１号及び同第６１５０５８４号を参照)。また、例えば、ヒトのＢ細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体に関するLi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)も参照のこと。
【００４７】
本明細書中で使用される「高頻度可変領域」、「ＨＶＲ」又は「ＨＶ」なる用語は、配列が高頻度に変化する、及び／又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は６つの高頻度可変領域、つまり、ＶＨに３つ(Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３)、及びＶＬに３つ(Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３)を含む。多数の高頻度可変領域の描写が使

用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(ＣＤＲ)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。カバット番号付け法を用いて番号付けされるChothia ＣＤＲ－Ｈ１ループの末端は、ループの長さに応じてＨ３２とＨ３４との間で変化する。(これは、カバット番号付けスキームはＨ３５ＡとＨ３５Ｂに挿入があるからであり、)３５Ａも３５Ｂもない場合、ループは３２で終わり、３５Ａのみがある場合、ループは３３で終わり、３５Ａ及び３５Ｂがある場合には、ループは３４で終わる)。ＡｂＭ高頻度可変領域は、カバットＣＤＲとChothia構造的ループとの間の妥協を表し、Oxford MolecularのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	ＡｂＭ	Chothia	接触	
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B	(カバット番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Chothia番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101	

【００４８】

高頻度可変領域は、次のような「伸展した高頻度可変領域」を含んでもよい、即ち、ＶＬの２４－３６又は２４－３４(Ｌ１)、４６－５６又は５０－５６(Ｌ２)及び８９－９７(Ｌ３)と、ＶＨの２６－３５Ｂ(Ｈ１)、５０－６５、４７－６５又は４９－６５(Ｈ２)及び９３－１０２、９４－１０２、又は９５－１０２(Ｈ３)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。

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

【００４９】

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

カバット番号付けシステムは一般に、可変ドメイン内の残基を指す場合に用いられる(軽鎖のおよそ残基１－１０７及び重鎖の残基１－１１３)(例えばKabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。「ＥＵ番号付けシステム」又は「ＥＵインデックス」は一般に、イムノグロブリン重鎖定常領域を指す場合に用いられる(例えば上掲のKabat et al.において報告されたＥＵインデックス)。「カバットにおけるＥＵインデックス」はヒトＩｇＧ１ ＥＵ抗体の残基番号付けを指す。本明細書中で特に明記しない限り、抗体の可変ドメイン内の残基番号の参照は、カバット番号付けシステムによって番号付けする残基を意味する。本明細書中で特に明記しない限り、抗体の定常ドメイン内の残基番号

の参照は、ＥＵ番号付けシステムによって番号付けする残基を意味する(例えば、米国特許仮出願第６０／６４０３２３号のＥＵ番号付けに関する図を参照のこと)。

【００５０】

「親和性成熟した」抗体は、その一又は複数のＨＶＲに一又は複数の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks等は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、ＶＨドメインとＶＬドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。ＨＶＲ及び／又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813 (1994)；Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)；Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson et al., J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995)；及びHawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に開示されている。

【００５１】

「遮断(ブロッキング)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低減するものである。好適な遮断抗体又はアンタゴニスト抗体は、実質的又は完全に、抗原の生物学的活性を阻害する。

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

「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ホモログ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ものである。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原に「特異的に結合」する(すなわち、約１×１０$^{-7}$Ｍ以下、好ましくは約１×１０$^{-8}$Ｍ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)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ホモログ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、典型的にはヒト化又はヒト抗体である。

【００５２】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の１：１相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、解離定数(Ｋｄ)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的実施態様を記載する。

結合親和性を指すための本明細書中で用いられる「それ以上」は、分子とその結合パートナーとの間の結合がより強いことを指す。本明細書中で用いられる「それ以上」は、より小さい数値のＫｄ値によって表される結合の強さを指す。例えば、「０．６ｎＭ以下」の抗体に対する親和性を有する抗体は、０．６ｎＭ未満、すなわち０．５９ｎＭ、０．５８ｎＭ、０．５７ｎＭなど又は０．６ｎＭ未満の任意の値である。

【００５３】

一実施態様では、本発明の「Ｋｄ」又は「Ｋｄ値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(^{125}Ｉ)-標識抗原にてＦａｂを均衡化して、抗Ｆａｂ抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する、以下のアッセイで示されるような、所望の抗体のＦａｂ型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(ＲＩＡ)で測定される(Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881)。アッセイの条件を決めるために、ミクロタイ

タープレート(Dynex)を５μｇ／ｍｌの捕獲抗Ｆａｂ抗体(Cappel Labs)を含む５０ｍＭ炭酸ナトリウム(ｐＨ９．６)にて一晩コートして、その後２％(w/v)のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳにて室温(およそ２３℃)で２～５時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、１００ｐＭ又は２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を段階希釈した所望のＦａｂと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ-１２の評価と一致する)。ついで所望のＦａｂを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えば６５時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳにて８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcountγ計測器(Packard)にて１０分間計測する。最大結合の２０％か又はそれ以下濃度のＦａｂを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

他の実施態様によると、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってＫｄ又はＫｄ値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びN-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をk_{off}/k_{on}比として算出した。例として、Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophometer)(Aviv Instruments)又は撹拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「k_{on}」は、上記のような、BIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。

【００５４】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる用語は、当業者が２つの数値(例えば、本発明の抗体に関連するもの、及び参照／比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばＫｄ値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び／又は統計学的有意差がないと認められるほど、２つの数値が有意に類似していることを意味する。前記２つの値間の差異は、参照／比較抗体についての値の好ましくは約５０％以下、好ましくは約４０％以下、好ましくは約３０％以下、好ましくは約２０％以下、及び／又は好ましくは約１０％以下である。

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が２つの数値(一般に、本発明の抗体に関連するもの、及び参照／比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばＫｄ値、ＨＡＭＡ応答)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、２つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記

２つの値間の差異は、参照／比較抗体の値の、好ましくは約１０％より大きく、好ましくは約２０％より大きく、好ましくは約３０％より大きく、好ましくは約４０％より大きく、及び／又は好ましくは約５０％より大きい。

「抗原」は、抗体が選択的に結合しうる予め決められた抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン又は他の天然に生じるないしは合成される化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが望ましい。

【００５５】

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるＶＬ又はＶＨフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。既存のアミノ酸変化の数が好ましくは５以下、好ましくは４以下、又は３以下である場合、既存のアミノ酸変化が存在する。既存のアミノ酸変化がＶＨ中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置７１Ｈ、７３Ｈ及び７８Ｈの内の３つ、２つ又は１つのみ起こり、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔ及び／又は７８Ａであってよい。一実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【００５６】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、ＶＬについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループκIである。一実施態様では、ＶＨについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

【００５７】

「ＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、上掲のKabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。一実施態様では、ＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳ(配列番号：１４３)-Ｈ１-ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ(配列番号：１４４)-Ｈ２－ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ(配列番号：１４５)-Ｈ３-ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ(配列番号：１４６)。

「ＶＬサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖κサブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。一実施態様では、ＶＬサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ(配列番号：１３９)-Ｌ１-ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ(配列番号：１４０)-Ｌ２－ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ(配列番号：１４１)-Ｌ３－ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ(配列番号：１４２)。

【００５８】

「修飾されていないヒトフレームワーク」は、アクセプターヒトフレームワークと同じアミノ酸配列を有するヒトフレームワーク、例えばアクセプターヒトフレームワーク内にヒトから非ヒトへのアミノ酸置換を欠いているものである。

本明細書中における「変更した高頻度可変領域」は、一又は複数(例えば１～およそ１６)のアミノ酸置換をそこに含む高頻度可変領域である。

本明細書中における「修飾していない高頻度可変領域」は、元の非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有する高頻度可変領域、すなわち、一又は複数のアミノ酸置換を欠いているものである。

【００５９】

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的に「結合する」抗体は、当該抗原を発現する細胞又は組織を標的とするうえで、有用な診断薬となるのに十分な親和性を持って抗原に結合するものであり、他のタンパク質に対し有意な交差反応をしない。このような実施態様では、「非標的」タンパク質への抗体の結合の範囲は、蛍光標識細胞分取(ＦＡＣＳ)分析又は放射性免疫沈降法(ＲＩＡ)によって決定した場合、特定の標的タンパク質への抗体の結合の約１０％未満である。標的分子への抗体の結合に関して、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「(に対する)特異的結合」、「に特異的に結合する」又は「に特異的である」という表現は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特定の結合は、例えば、コントロール分子と比較したある分子の結合を決定することにより測定することができ、この場合コントロール分子は結合活性を有さない同じ構造の分子である。例えば、特異的結合は、標的と類似のコントロール分子との競合、例えば、標識しない標的の過多により定量することができる。この場合、標識した標的のプローブに対する結合が、標識していない標的の過多により競合的に阻害されると、特異的結合が示唆される。本明細書中で用い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「を特異的に結合する」又は「に特異的に結合する」又は「に特異的である」という用語は、例えば、少なくともおよそ10^{-4}M、あるいは少なくともおよそ10^{-5}M、あるいは少なくともおよそ10^{-6}M、あるいは少なくともおよそ10^{-7}M、あるいは少なくともおよそ10^{-8}M、あるいは少なくともおよそ10^{-9}M、あるいは少なくともおよそ10^{-10}M、あるいは少なくともおよそ10^{-11}M、あるいは少なくともおよそ10^{-12}M以上の標的に対してＫｄを有する分子によって表されうる。一実施態様では、「特異的な結合」なる用語は、１の分子が、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに対し、他のポリペプチド又はポリペプチドのエピトープに殆ど結合することなく結合するような結合を意味する。

【００６０】

「ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する」抗体又は「増殖阻害」抗体とは、適切なＣＤ７９ｂポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の、測定可能な増殖抑制を導くものである。ＣＤ７９ｂポリペプチドは癌細胞の表面上に発現される膜貫通型ポリペプチドでもよいし、癌細胞によって製造されて分泌されるポリペプチドであってもよい。好適な増殖阻害抗ＣＤ７９ｂ抗体は、適切なコントロールと比較して、２０％を超える、好ましくは約２０％～約５０％、更に好ましくは５０％を超える(例えば約５０％～約１００％)ＣＤ７９ｂ発現腫瘍細胞の増殖を阻害し、このコントロールは典型的に試験される抗体によって処置されていない腫瘍細胞である。一実施態様では、増殖の抑制は、細胞培養液中で約０．１～３０μｇ／ｍｌ又は約０．５ｎＭ～２００ｎＭの抗体濃度において測定することができ、増殖阻害は、腫瘍細胞を抗体に曝してから１～１０日後に測定する。インビボでの腫瘍細胞の増殖阻害は、後述の実験的実施例に記載したような様々な方法で定量することができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体を体重１ｋｇ当たり約１μg～約１００ｍｇで投与した結果、当該抗体の初回投与から約５日～３ヶ月、好ましくは約５～３０日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞の増殖が低減した場合、抗体はインビボにおいて増殖阻害性である。

【００６１】

「アポトーシスを誘発する」抗体とは、アネキシンＶの結合、ＤＮＡの断片化、細胞の縮み、小胞体の拡張、細胞断片化、及び／又は膜小胞の形成(アポトーシス性本体と呼ばれる)により決定される、プログラムされた細胞死を誘発するものである。細胞は通常、ＣＤ７９ｂポリペプチドを過剰発現する細胞である。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、血小板又は赤血球などの造血性細胞である。様々な方法を使用して、アポトーシスに関連する細胞イベントを評価すること

ができる。例えば、ホスファチジルセリン(ＰＳ)の転位置をアネキシン結合により測定することができ、ＤＮＡ断片化をＤＮＡラダーリングにより評価することができ、核／染色質凝縮及びＤＮＡ断片化を、低二倍体性細胞の増加により評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘発する抗体は、アネキシン結合アッセイにおいて、処理しない細胞に対し、約２～５０倍、好ましくは約５～５０倍、及び最も好ましくは約１０～５０倍のアネキシン結合を誘発するものである。

「細胞死を誘発する」抗体は、生存可能な細胞を生存不能にするものである。このような細胞はＣＤ７９ｂポリペプチドを発現するものであり、ＣＤ７９ｂポリペプチドを特異的に発現又は過剰発現する細胞種である。細胞は特定の細胞種の癌性細胞ないしは正常細胞であってもよい。ＣＤ７９ｂ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か、癌細胞によって産生及び分泌されるポリペプチドであり得る。細胞は癌細胞、例えばＢ細胞又はＴ細胞であってもよい。インビトロでの細胞死を補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で決定し、よって抗体依存性細胞障害(ＡＤＣＣ)又は補体依存性細胞障害(ＣＤＣ)によって誘発された細胞死を区別することができる。つまり、細胞死のアッセイは、熱で不活性化した血清を用いて(即ち、補体の不在下において)、免疫エフェクター細胞の不在下で、実行することができる。抗体が細胞死を誘発することができるか否かを決定するために、処理しない細胞と比較して、ヨウ化プロピジウム(ＰＩ)、トリパンブルー(Moore等, Cytotechnology 17:1-11 (1995)参照)、又は７ＡＡＤの取り込みによって評価される膜完全性の欠損が評価されうる。好ましい細胞死誘発抗体は、ＢＴ４７４細胞におけるＰＩ取り込みアッセイにおいてＰＩ取り込みを誘発するものである。

【００６２】

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。

【００６３】

本明細書中の「Ｆｃ領域」なる用語は、天然配列Ｆｃ領域及び変異体Ｆｃ領域を含む、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域はＣｙｓ２２６の位置又はＰｒｏ２３０からの位置のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Ｆｃ領域のＣ末端リジン(ＥＵ番号付けシステムによれば残基４４７)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのＫ４４７残基が除去された抗体群、Ｋ４４７残基が除去されていない抗体群、及びＫ４４７残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。

「機能的なＦｃ領域」は、天然配列のＦｃ領域が有するエフェクター機能を保持する。典型的なエフェクター機能は、Ｃ１ｑ結合；補体媒介障害活性(ＣＤＣ)、Ｆｃレセプター結合、抗体依存性細胞障害活性(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；ＢＣＲ)の低減下などである。このようなエフェクターの機能は、一般に、Ｆｃ領域が結合領域(例えば、抗体の可変領域)に結合するのに必要とされており、本明細書中の定義に開示されるような様々はアッセイを用いることで評価することが可能である。

【００６４】

「天然配列のＦｃ領域」は、天然に見出されるＦｃ領域と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列ヒトＦｃ領域には、天然配列ヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域(非Ａ-及びＡ-アロタイプ)；天然配列ヒトＩｇＧ２Ｆｃ領域；天然配列ヒトＩｇＧ３Ｆｃ領域；及び、天然配列ヒトＩｇＧ４Ｆｃ領域、同様に、自然に生じるこれらの変異体が含まれる。

「変異体Ｆｃ領域」は、少なくとも１つのアミノ酸修飾、好ましくは一又は複数のアミノ酸置換により、天然配列Ｆｃ領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。好ま

しくは、変異体Ｆｃ領域には、天然配列のＦｃ領域もしくは親ペプチドのＦｃ領域と比較した場合、少なくとも１つのアミノ酸置換が存在する。例えば、天然配列のＦｃ領域又は親鎖のＦｃ領域において、およそ１からおよそ１０、好ましくは、およそ１からおよそ５のアミノ酸の置換が存在する。ここで言う変異体Ｆｃ領域は、好ましくは少なくともおよそ８０％以上の相同性を天然配列のＦｃ領域及び/又は親ペプチドのＦｃ領域との間に有するか、より好ましくはおよそ９０％以上の相同性を、最も好ましくは少なくともおよそ９５％の相同性を有するものであろう。

【００６５】

「抗体依存性細胞障害活性」又は「ＡＤＣＣ」は、特定の細胞障害性細胞(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(ＦｃＲ)に結合した分泌型Ｉｇが細胞障害性エフェクター細胞を抗原保持標的細胞に特異的に結合させ、続いて標的細胞を細胞障害性によって標的細胞を殺傷する細胞障害性の形態を指す。抗体は細胞障害性細胞「に対するものであり」、必ず細胞の殺傷に必要である。ＡＤＣＣを媒介する一次細胞であるＮＫ細胞は、ＦｃγＲIIIのみを発現する一方、単球はＦｃγＲI、ＦｃγＲII及びＦｃγＲIIIを発現する。造血性細胞でのＦｃＲの発現は、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。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するためには、米国特許第５５００３６２号又は第５８２１３３７号に記載されているようなインビトロＡＤＣＣアッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(ＰＢＭＣ)及びナチュラルキラー細胞(ＮＫ)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子のＡＤＣＣ活性は、例えばClynes等 .PNAS(USA), 95:652-656(1998)に開示されたような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

【００６６】

「Ｆｃレセプター」もしくは「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合するレセプターを指す。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、ＦｃγＲI、ＦｃγＲII及びＦｃγＲIIIサブクラスを含み、それらの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされたものも含まれる。ＦｃγＲIIレセプターには、ＦｃγＲIIA(「活性型レセプター」)、ＦｃγＲIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主として細胞質領域は異なるが、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、細胞質領域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、細胞質領域にチロシン依存性免疫受容体阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ；ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997))。ＦｃＲに関しては、 Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)；Capel 等, Immunomethods 4:25-34 (1994)；de Haas 等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に総説されている。他のＦｃＲ、ここでは、将来的に同定されるものも含めて、「ＦｃＲ」という言葉によって包含される。また、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受容体「ＦｃＲｎ」も含まれる(Guyer 等, J. Immunol. 117:587 (1976)及び Kim 等, J. Immunol.24:249 (1994))。

【００６７】

インビボのヒトＦｃＲｎへの結合やヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウス又は形質移入されたヒト細胞株において、又は、変異Ｆｃ領域を有するポリペプチドが投与される霊長類においてアッセイされてもよい。国際公開２０００／４２０７２(Presta)は、ＦｃＲへの結合が改善された又は低減された抗体変異体を記載している。また、例としてShields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。

【００６８】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又はそれ以上のＦｃＲｓを発現し、エフェクターとしての機能を発揮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発揮することが望ましい。ＡＤＣＣを媒介する細胞の例として、抹消血単核細胞(ＰＢＭＣ)、ナチュラルキラー(ＮＫ)細胞、単球、細胞障害性Ｔ細胞、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の材料(例えば、血液)から単離してもよい。

【００６９】

「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。古典的な補体経路の活性化は、補体活性化経路は補体系(Ｃｌｑ)の第１補体が、同族抗原と結合した(好適なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されるようなＣＤＣアッセイが行われてもよい。変化したＦｃ領域アミノ酸配列を有し(変異Ｆｃ領域を有するポリペプチド)、Ｃ１ｑ結合能が増加しているないしは減少しているポリペプチド変異体は、例えば米国特許第６１９４５５１号Ｂ１及び国際公開１９９９／５１６４２に記載されている。また、例としてIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【００７０】

「Ｆｃ領域を含む抗体」なる用語は、Ｆｃ領域を含む抗体を指す。Ｆｃ領域のＣ末端リジン(ＥＵ番号付けシステムに従うと残基４４７)は、例えば、ポリペプチドの精製中又はポリペプチドをコードする核酸を組み換え操作することによって除去してもよい。したがって、本発明のＦｃ領域を有する抗体を含有する組成物は、Ｋ４４７を有する抗体、すべてのＫ４４７が除去された抗体、又はＫ４４７残基を有する抗体とＫ４４７残基を有さない抗体の混合を含みうる。

【００７１】

ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂポリペプチドの形態を意味する。通常、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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アミノ酸を超えない可能性が高い。場合によっては、従って、ＣＤ７９ｂ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を超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。

【００７２】

ここに開示するＣＤ７９ｂ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。

【００７３】

「ＣＤ７９ｂポリペプチド変異体」とはＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂポリペプチド配列の任意の他の断片(例えば、完全長ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂポリペプチドを意味する。このようなＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂポリペプチドが含まれる。通常、ＣＤ７９ｂポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ変異体ポリペプチドは、天然ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【００７４】

ここで同定したペプチド又はポリペプチド配列、すなわちＣＤ７９ｂポリペプチド配列に関する「パーセント(％)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のペプチド又はポリペプチド配列、すなわちＣＤ７９ｂポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ(ＤＮＡＳＴＡＲ)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエ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、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。

【００７５】

アミノ酸配列比較にＡＬＩＧＮ-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１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-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の長さと等しくない場合、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等しくないと認識されるであろう。

【００７６】

「ＣＤ７９ｂ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＣＤ７９ｂ変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、ＣＤ７９ｂポリペプチド、好ましくは活性ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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８０％の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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％、又は９９％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。

【００７７】

通常、ＣＤ７９ｂ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、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、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。

【００７８】

ここで同定されるＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエ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。

【００７９】

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の長さと等しくない場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性と等しくないことは理解されるであろう。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。

【００８０】

他の実施態様では、ＣＤ７９ｂ変異体ポリヌクレオチドとは、ＣＤ７９ｂポリペプチドをコ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ＣＤ７９ｂ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。ＣＤ７９ｂ変異体ポリペプチドは、ＣＤ７９ｂ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。

ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。ＡＴＣＣ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、(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)ＡＴＣＣに寄託されたベクター中に挿入されているｃＤＮＡのＴＡＴポリペプチドコード部分を意味する(開始コドンと終止コドンは図中で太字と下線で示す)。

【００８１】

ここに開示される種々のＣＤ７９ｂ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充分なほど、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ＳＤＳ-ＰＡＧＥ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、ＣＤ７９ｂ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。

【００８２】

「単離された」ＣＤ７９ｂ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プチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

「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ＤＮＡ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。

【００８３】

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ＤＮＡ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ＤＮＡに作用可能に結合している；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ＤＮＡ配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接してい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、従来の手法に従って、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。

【００８４】

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。

【００８５】

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度を用いる、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分間の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。

「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。

【００８６】

「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ＣＤ７９ｂポリペプチド又は抗ＣＤ７９ｂ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充分に短い。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ＣＤ７９ｂの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【００８７】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そして天然ＣＤ７９ｂ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、天然ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【００８８】

「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。

【００８９】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」

であり、これは付加的なＤＮＡセグメントが結合されうる円形の二本鎖ＤＮＡループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なＤＮＡセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「組み換えベクター」)と呼ぶ。一般に、組換えＤＮＡ技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【００９０】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、ＤＮＡ及びＲＮＡが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び／又はそれらの類似体(アナログ)、又はＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に標識とコンジュゲートによるなどしてさらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ｐｌｙ-Ｌ-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。５'及び３'末端のＯＨはホスホリル化可能であり、又は１～２０の炭素原子を有する有機キャップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば２'-Ｏ-メチル-、２'-Ｏ-アリル、２'-フルオロ又は２'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがＰ(Ｏ)Ｓ(「チオアート」)、Ｐ(Ｓ)Ｓ(「ジチオアート」)、「(Ｏ)ＮＲ$_2$(「アミダート」)、Ｐ(Ｏ)Ｒ、Ｐ(Ｏ)ＯＲ'、ＣＯ又はＣＨ$_2$(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのＲ及びＲ'は独立して、Ｈ又は、エーテル(-Ｏ-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(１-２０Ｃ)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、ＲＮＡ及びＤＮＡを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

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

【００９１】

「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。

【００９２】

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されて、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。

【００９３】

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、びまん性大細胞型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、バーキットリンパ腫、前駆体(周辺性)大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／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。

【００９４】

「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)及びマントル細胞リンパ腫が含まれる。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」なる用語は、ある程度の異常な細胞増殖と関係している疾患を指す。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性かにかかわらず、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を指す。

【００９５】

本明細書中の「自己免疫性疾患」は、個体の自己組織ないしは臓器又は同時分離したものに対する及びそれらから生じる疾患又は症状、又はその徴候又は結果として生じるその症状である。これら多くの自己免疫性及び炎症性疾患において、多くの臨床用及び研究用のマーカーが存在してもよく、限定するものではないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体蓄積、副腎皮質ステロイド又は免疫抑制性治療の利点、及び、影響を受けた組織中のリンパ系細胞の凝集塊が含まれうる。Ｂ細胞が媒介する自己免疫性疾患に関して何か一つの理論に限定されるものではないが、Ｂ細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状及びＴ細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、及び病巣への異所性新リンパ形成を含む、多くの機構的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病原性効果を示すことが考えられる。各々のこれらの経路は、自己免疫性疾患の病状の程度の違いに寄与しうる。

【００９６】

「自己免疫性疾患」は、臓器特異的疾患(すなわち、免疫応答が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸及び肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などといった臓器系に対して特異的である)又は、複数の臓器系に影響しうる全身性疾患(例えば全身性エリテマトーデス(ＳＬＥ)、関節リウマチ、多発性筋炎など)でありうる。好ましい前記疾患には、自己免疫性リウマチ学疾患(例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、ＳＬＥ及びループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎／皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、及び乾癬の関節炎など)、自己免疫性胃腸及び肝臓疾患(例えば、炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病)、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、及び小児脂肪便病など)、血管炎(例えば、チャング-シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び顕微鏡的多発血管炎を含むＡＮＣＡ-ネガティブ血管炎及びＡＮＣＡ-関連血管炎)、自己免疫性神経学的疾患(例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び自己免疫性多発性神経炎など)、腎臓疾患(例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、及びベルガー病など)、自己免疫性皮膚科疾患(例えば、乾癬、蕁麻疹、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、及び皮膚紅斑性狼瘡など)、血液系疾患(例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、及び自己免疫溶血性貧血など)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例えば、内耳疾患及び聴力障害など)、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植及び自己免疫性内分泌系疾患(例えば、インスリン依存型糖尿病(ＩＤＤＭ)などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病及び自己免疫性甲状腺疾患(例えばグレーブス病及び甲状腺炎)など)が含まれる。より好ましい前記疾患には、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、ＩＤＤＭ、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎が含まれる。

【００９７】

場合によって上記のものを包含する、本明細書中で定義されるような他の自己免疫性疾患の具体的な例には、限定されるものではないが、関節炎(急性及び慢性の関節リウマチ、例として、若年発症関節リウマチ及び段階、例として、関節リウマチ関節滑膜炎、痛風又は痛風性関節炎、急性の免疫学的な関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、II型コラーゲン誘導性の関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティル病、椎骨関節炎、骨関節炎、慢性関節炎プログレディエンテ、変形性関節炎、慢性多発性関節炎プリマリア、反応性関節炎、閉経期の関節炎、エストロゲン-枯渇関節炎、及び強直性脊椎炎／リウマチ様脊椎炎)、自己免疫性リンパ系増殖性疾患、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例としてプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬、アトピー、例としてアトピー性疾患、例えば花粉症及びジョブ症候群、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、原発性刺激物接触皮膚炎、及びアトピー性皮膚炎、Ｘ連鎖過剰ＩｇＭ症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例として慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹、例として慢性自己

免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、全身性硬化症などの硬化症、多発性硬化症(ＭＳ)、例として脊髄-視神経ＭＳ、原発性進行性ＭＳ(ＰＰＭＳ)、及び再発性寛解型ＭＳ(ＲＲＭＳ)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、皮膚硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎(ＮＭＯ)、炎症性腸疾患(ＩＢＤ)(例えば、クローン病、自己免疫媒介性胃腸疾患、胃腸炎症、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸炎潰瘍、顕微鏡的大腸炎、膠原性大腸炎、多発性大腸炎、壊死性全腸炎、及び経壁性大腸炎、及び自己免疫性炎症性腸疾患)、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例として、成人又は急性の呼吸窮迫症候群(ＡＲＤＳ)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、移植片対宿主病、遺伝性血管性浮腫などの血管性浮腫、髄膜炎の脳神経損傷、妊娠ヘルペス、妊娠性類天疱瘡、陰嚢掻痒、自己免疫性早期卵巣機能不全、自己免疫性症状による急性聴力損失、ＩｇＥ媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び／又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(ＧＮ)、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性ＧＮ、免疫性ＧＮ、膜性ＧＮ(膜性ネフロパシ)、特発性膜性ＧＮ又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性ＧＮ(ＭＰＧＮ)(タイプＩ及びタイプＩＩを含む)、急速進行性ＧＮ(ＲＰＧＮ)、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、亀頭炎、例として形質細胞限局性亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、薄板状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、妊娠前角化症、膿皮症壊疽、アレルギー性状態及び応答、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、まれなアレルギー性疾患、例として肥満細胞症、アレルギー性応答、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、異常発汗剤湿疹及び小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、妊娠中の胎児のＡＢＯ式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、ループス、例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、ジスコイドループス、円板状エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス(ＳＬＥ)、脱毛症ループス、ＳＬＥ、例えば皮膚ＳＬＥ又は亜急性の皮膚ＳＬＥ、新生児期ループス症候群(ＮＬＥ)及び紅斑性狼瘡汎発、若年性開始型(Ｉ型)真正糖尿病、例として小児ＩＤＤＭ、成人発症型真正糖尿病(ＩＩ型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシ、糖尿病性大腸炎、糖尿病性大動脈疾患、サイトカイン及びＴリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎(例として、リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞(高安)動脈炎などの大脈管脈管炎、川崎病及び結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎などの中脈管脈管炎、免疫血管炎、ＣＮＳ血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、フィブリノイドを壊死させる血管炎及び全身性壊死性血管炎などの壊死性血管炎、ＡＮＣＡネガティブ血管炎、及びチャーグ-ストラウス症候群(ＣＳＳ)などのＡＮＣＡ関連の血管炎、ヴェゲナー肉芽腫、及び顕微鏡的多発性血管炎)、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイアモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(ＡＩＨＡ)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全(ＰＲＣＡ)、第VIII因子欠損症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症、例として汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、ＣＮＳ炎症性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、天疱瘡又は類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、瘢

痕性(粘液膜)類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、新生物関連天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡粘液-膜天疱瘡、及び紅斑性天疱瘡、後天性表皮水疱症、眼炎症、好ましくはアレルギー性眼性炎症、例えばアレルギー性結膜、直鎖状ＩｇＡ水疱性疾患、自己免疫誘導性結膜炎、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、自己免疫性状態による熱性損傷、子癇前症、免疫複合体疾患、例として、免疫複合体腎炎、抗体が媒介する腎炎、神経炎症性疾患、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばＩｇＭ多発性神経炎又はＩｇＭ媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、例えば血栓性血小板減少性紫斑病(ＴＴＰ)、輸血後紫斑病(ＰＴＰ)、ヘパリン誘発性血小板減少及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のＩＴＰを含む特発性血小板減少性紫斑病(ＩＴＰ)、強膜炎、例えば特発性のセラト強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼疾患(眼障害又は甲状腺関連の眼障害)、自己免疫多腺性症候群などの多腺性症候群、例えばタイプI(又は、多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランバート-イートン筋無力症症候群又はイートン―ランバート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(ＥＡＥ)、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(ＯＭＳ)及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、間質性肺炎、例えばリンパ系間隙間質性肺炎(ＬＩＰ)、閉塞性細気管支炎(非移植)対ＮＳＩＰ、ギラン‐バレー症候群、ベルガー病(ＩｇＡネフロパシ)、特発性ＩｇＡネフロパシ、線状ＩｇＡ皮膚病、急性発熱性好中性皮膚病、角層下膿疱症、一過性棘融解皮膚病、肝硬変、例として原発性胆管萎縮症及び肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアックないしはコエリアック病、脂肪便症(グルテン腸疾患)、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、例として混合性クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(ＡＬＳ；筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease))、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患(ＡＩＥＤ)、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性ないしは再発する多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、コーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎などの角膜炎、ベル麻痺、スウィート病／症候群、自己免疫性酒さ、帯状ヘルペス関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルＢ細胞リンパ球増多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナルガーモパチィ(monoclonal garnmopathy of undetermined significance)、ＭＧＵＳ)が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びＣＮＳのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性又は分節性又は限局性分節性糸球体硬化症(ＦＳＧＳ)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として、自己免疫脱髄性病及び慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、ＣＲＥＳＴ症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、例えば、抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎及び繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例としてリーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、間質性肺線維形成、繊維化縦隔炎、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅

斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic faciitis)、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎(急性又は慢性)又はＦｕｃｈの毛様体炎)、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(ＨＩＶ)感染、ＳＣＩＤ、後天性免疫不全症候群(ＡＩＤＳ)、エコーウィルス感染、敗血症(全身性炎症反応症候群(ＳＩＲＳ))、内毒血症、膵炎、thyroxicosis、パルボウィルス感染、風疹ウィルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例として、春季カタル、乾性角結膜炎及び流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、移植臓器再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道／肺性疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、(大脳血管性不足)、例として動脈硬化脳症及び動脈硬化症網膜症、アスペルミオジェネース(aspermiogenese)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過
敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、眼炎symphatica(交感性眼炎)、新生児眼炎、視神経炎、精巣炎肉芽腫症、膵炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、Ｑｕｅｒｖａｉｎ甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びＴリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膵島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群、例えば多腺性症候群Ｉ型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症(ＡＯＩＨ)、拡張型心筋症、例えば後天性表皮水疱症(ＥＢＡ)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清陰性脊椎関節炎疹、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット‐アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、例えば慢性関節リウマチ、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋又は他の組織の再灌流損傷、リンパ腫気管気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシ、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。このような疾患は、ＣＤ７９ｂなどのＢ細胞表面マーカーに結合する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、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。

【００９８】
「治療すること」又は「処置」又は「寛解」は、治療的処置及び予防的ないし防止的手段を指し、この目的は標的とした病態又は疾患を予防又は衰退(減少)させることである。処置が必要なものには、疾患を既に有しているもの、並びに疾患にかかりやすいもの又は予防されるべき疾患があるものが含まれる。本発明の方法に従って抗ＣＤ７９ｂ抗体の治療的有効量を投与した後、被検体又は哺乳動物のＣＤ７９ｂポリペプチド発現癌がうまく「治療」されれば、患者は、癌細胞数の減少又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；癌の軟組織及び骨への播種を含む、周辺臓器への癌細胞浸潤の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；ある程度の腫瘍成長の阻害；及び／又は特定の癌が関与する一又はそれ以上の症状のある程度の除去；罹患率及び死亡率の減少、及び生活の質の改善の一又は複数の観察可能な減少及び／又は測定可能な減少又は欠失を示す。抗ＣＤ７９ｂ抗体が増殖を予防しうる、及び／又は既存の癌細胞を殺しうる限り、細胞分裂停止性及び／又は細胞障害性であってよい。また、これらの兆候又は症状の減少は患者が感じてもよい。
疾患の有効な処置及び改善を評価するための上記パラメーターは、医師によく知られる慣例的な手法によって容易に測定可能である。癌療法では、例えば、疾患進行の時間(ＴＴＰ)を評価し、及び／又は応答速度(ＲＲ)を決定することによって有効性が測定されてもよい。ステージテストや骨スキャン、及び骨への拡がりを測定するためのカルシウムレベルや他の酵素に関する試験によって、転移を決定してもよい。また、ＣＴスキャンは、領域内の骨盤及びリンパ節への拡がりを探すためになされる。胸部Ｘ線及び公知の方法による肝酵素レベルの測定値は、それぞれ、肺及び肝臓への転移を探すために用いられる。疾患をモニターするための他の慣例方法には、経直腸超音波検査法(ＴＲＵＳ)及び経直腸針生検(ＴＲＮＢ)が含まれる。
【００９９】
限局性である膀胱癌では、疾患の経過を決定するための方法には、膀胱鏡検査による泌尿器細胞学的評価、尿内の血液の存在のモニタリング、超音波検査又は静脈内腎盂像による尿路上皮性管の視覚化、コンピューター断層装置(ＣＴ)及び磁気共鳴画像(ＭＲＩ)が含まれる。遠隔転移の存在は、腹部のＣＴ、胸部Ｘ線又は骨格の放射性核種撮像によって評価されてもよい。
【０１００】
「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。
【０１０１】
癌の症状の治療、緩和のための「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。
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。

【０１０２】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体が接着又は付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ー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ー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(ＣＤ７９ｂ抗体など)の輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した２層構造に配列される。

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。

【０１０３】

「個体」、「被検体」又は「患者」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。

「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。

【０１０４】

本明細書中で開示される抗体の「有効量」は、具体的に言及する目的を実行するために十分な量である。「有効量」は経験的に、慣例方法で、定まった目的との関係で、決定されてよい。

「治療上の有効量」なる用語は、被検体又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するために効果的な抗体又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、薬剤の治療上の有効量は、癌細胞の数を減少；腫瘍サイズを低減；周辺臓器への癌細胞浸潤の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；ある程度の腫瘍成長の阻害；及び／又は癌が関与する一又はそれ以上の症状のある程度の軽減をしうる。「治療すること」の本明細書中の定義を参照のこと。薬剤が増殖を予防しうる、及び／又は既存の癌細胞を殺しうる限り、細胞分裂停止性及び／又は細胞障害性であってよい「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を指す。典型的には必ずではないが、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有効量よりも少ないであろう。

【０１０５】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の「増殖阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞増殖を阻害するための抗ＣＤ７９ｂ抗体の「増殖阻害量」は、経験的又は慣例的な方法によって決定されてよい。

抗ＣＤ７９ｂ抗体の「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の破壊を引き起こすことができる量である。腫瘍性細胞増殖を阻害するための抗ＣＤ７９ｂ抗体の「細胞障害性量」は、経験的又は慣例的な方法によって決定され

てよい。

【０１０６】

「ＣＤ７９ｂ発現細胞」は、細胞表面上のあるいは分泌された様式の内在性の又は形質移入されたＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する細胞である。「ＣＤ７９ｂ発現癌」は、細胞表面上に存在するＣＤ７９ｂポリペプチドを有するか、又は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを生産して分泌する細胞を含む癌である。「ＣＤ７９ｂ発現癌」は場合によって、細胞表面上のＣＤ７９ｂポリペプチドを十分なレベル産生するので、抗ＣＤ７９ｂ抗体が結合して、癌に関する治療効果を有することができる。他の実施態様では、「ＣＤ７９ｂ発現癌」は場合によって、ＣＤ７９ｂポリペプチドの十分なレベルを生産して、分泌するので、抗ＣＤ７９ｂ抗体アンタゴニストは結合して、癌に関する治療効果を有することができる。後者の場合、アンタゴニストは、腫瘍細胞によって分泌されたＣＤ７９ｂポリペプチドの製造や分泌を低減、阻害又は予防するアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。ＣＤ７９ｂポリペプチドを「過剰に発現する」癌は、同じ組織種の非癌性細胞と比較して、その細胞表面上に有意に高いレベルのＣＤ７９ｂポリペプチドを有するか、製造して分泌するものである。この過剰発現は、遺伝子増幅又は増加した転写ないし翻訳によって引き起こされてもよい。ＣＤ７９ｂポリペプチドの過剰発現は、細胞の表面上に存在するか又は細胞によって分泌されるＣＤ７９ｂタンパク質のレベルの増加を評価することによる検出又は予後のアッセイで決定されてもよい(例えば、ＣＤ７９ｂポリペプチドをコードする単離された核酸からの組み換えＤＮＡ技術を用いて調製されうる単離されたＣＤ７９ｂポリペプチドに対して調製される抗ＣＤ７９ｂ抗体を用いた免疫組織化学アッセイ、ＦＡＣＳ分析などによって)。あるいは又はさらに、例えば、ＣＤ７９ｂコード化核酸又はその相補鎖に対応する核酸ベースの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；(ＦＩＳＨ；１９９８年１０月公開の国際公開９８／４５４７９を参照)、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(ＰＣＲ)技術、例えばリアルタイム定量ＰＣＲ(ＲＴ-ＰＣＲ)を介して、細胞のＣＤ７９ｂポリペプチドコード化核酸又はｍＲＮＡのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースのアッセイを用いて、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、ＣＤ７９ｂ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)。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。

【０１０７】

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、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３、又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ(ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む)、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭ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」抗体を作製するために、抗体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。

【０１０８】
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、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}及びＬｕの放射性同位体)、化学療法剤、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、又は他の挿入剤(intercalating agent)、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。
【０１０９】
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(alkyating agent)、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(ＴＡＲＣＥＶＡ(登録商標), Genentech/OSI Pharm.)、ドセタキセル(ＴＡＸＯＴＥＲＥ(登録商標), Sanofi-Aventis)、５－ＦＵ(フルオロウラシル、５‐フルオロウラシル、ＣＡＳ番号５１-２１-８)、ゲムシタビン(ＧＥＭＺＡＲ(登録商標), Lilly)、ＰＤ-０３２５９０１(ＣＡＳ番号３９１２１０-１０-９, Pfizer)、シスプラチン(シス-ジアミン、ジクロロ白金(ＩＩ)、ＣＡＳ番号１５６６３-２７-１)、カルボプラチン(ＣＡＳ番号４１５７５-９４-４)、パクリタキセル(ＴＡＸＯＬ(登録商標), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、トラスツズマブ(ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ(登録商標), Genentech)、テモゾロミド(４-メチル-５-オキソ-２,３,４,６,８-ペントアザ二環式[４.３.０]ノナ-２,７,９-トリエン-９-カルボキシアミド、ＣＡＳ番号８５６２２-９３-１, ＴＥＭＯＤＡＲ(登録商標), ＴＥＭＯＤＡＬ(登録商標), Schering Plough)、タモキシフェン((Ｚ)-２-[４-(１,２-ジフェニルブト-１-エニル)フェノキシ]-Ｎ,Ｎ-ジメチル-エタンアミド, ＮＯＬＶＡＤＥＸ(登録商標), ＩＳＴＵＢＡＬ(登録商標), ＶＡＬＯＤＥＸ(登録商標))、及びドキソルビシン(ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ(登録商標))、Ａｋｔｉ-１／２、ＨＰＰＤ及びラパマイシンが含まれる。
【０１１０】
化学療法剤の他の例には、オキサリプラチン(ＥＬＯＸＡＴＩＮ(登録商標), Sanofi)、ボルテゾミブ(ＶＥＬＣＡＤＥ(登録商標), Millennium Pharm.)、スーテント(ＳＵＮＩＴＩＮＩＢ(登録商標), ＳＵ１１２４８, Pfizer)、レトロゾール(ＦＥＭＡＲＡ(登録商標), Novartis)、メシル酸イマチニブ(ＧＬＥＥＶＥＣ(登録商標), Novartis)、ＸＬ-５１８(Ｍｅｋインヒビター, Exelixis, 国際公開２００７／０４４５１５)、ＡＲＲＹ-８８６(Ｍｅｋインヒビター, ＡＺＤ６２４４, Array BioPharma, Astra Zeneca)、ＳＦ-１１２６(ＰＩ３Ｋインヒビター, Semafore Pharmaceuticals)、ＢＥＺ-２３５(ＰＩ３Ｋインヒビター, Novartis)、ＸＬ-１４７(ＰＩ３Ｋインヒビター, Exelixis)、ＰＴＫ７８７/ＺＫ ２２２５８４ (Novartis)、フルベストラント(ＦＡＳＬＯＤＥＸ(登録商標), Astra Zeneca)、リューコボリン(フォリン酸)、ラパマイシン(シロリムス, ＲＡＰＡＭＵＮＥ(登録商標), Wyeth)、ラパチニブ(ＴＹＫＥＲＢ(登録商標), ＧＳＫ５７２０１６, Glaxo Smith Kline)、ロナファーニブ(ＳＡＲＡＳＡＲ^{TM}, ＳＣＨ ６６３３６, Schering Plough)、ソラフェニブ(ＮＥＸＡＶＡＲ(登録商標), ＢＡＹ４３-９００６, Bayer Labs)、ゲフィチニブ(ＩＲＥＳＳＡ(登録商標), AstraZeneca)、イリノテカン(ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ(登録商標), ＣＰＴ-１１, Pfizer)、ティピファニブ(ＺＡＲＮＥＳＴＲＡ^{TM}, Johns

on & Johnson)、ＡＢＲＡＸＡＮＥ™ (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，Schaumberg，Il)、バンデタニブ(ｒＩＮＮ，ＺＤ６４７４，ＺＡＣＴＩＭＡ(登録商標)，AstraZeneca)、クロラムブシル、ＡＧ１４７８、ＡＧ１５７１(ＳＵ５２７１；Sugen)、テムシロリムス(ＴＯＲＩＳＥＬ(登録商標)，Wyeth)、パゾパニブ(GlaxoSmithKline)、カンフォスファミド(ＴＥＬＣＹＴＡ(登録商標)，Telik)、チオテパ、及びシクロフォスファミド(ＣＹＴＯＸＡＮ(登録商標)、ＮＥＯＳＡＲ(登録商標))；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphaoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(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)；ＣＣ-１０６５(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(duocarmycin)(合成類似体、ＫＷ－２１８９及びＣＢＩ－ＴＭ１を含む)； エレトロビン(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)、カリケアマイシンガンマ１Ｉ及びカリケアマイシンオメガＩ１、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(carabicin)、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－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキソルビシン、２-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、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)、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(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)；ビサントレン(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)；リゾキシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(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(trichothecenes)(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(「Ａｒａ-Ｃ」)；シクロホスファミド；チオテパ；６-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；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(ＶＰ-１６)；ミトキサントン；ビンクリスチン；ビノレルビン(ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ(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(ＸＥＬＯＤＡ(登録商標), Roche)；イバンドロナート(ibandronate)；ＣＰＴ-１１；トポイソメラーゼインヒビターＲＦＳ２０００；ジフルオロメチロールニチン(ＤＭＦＯ)；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。

【０１１１】

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(ＳＥＲＭ)など、例えばタモキシフェン(ＮＯＬＶＡＤＥＸ(登録商標)タモキシフェンを含む)、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)、ＬＹ１１７０１８、オナプリストーン(onapristone)、及びＦＡＲＥＳＴＯＮ(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、ＭＥＧＡＳＥ(登録商標)(メゲストロールアセテート)、ＡＲＯＭＡＳＩＮ(登録商標)(エキセメスタン, Pfizer)、ホルメスタイン(formestanie)、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ(登録商標)(ゾロゾール(vorozole))、ＦＥＭＡＲＡ(登録商標)(レトロゾール, Novartis)及びＡＲＩＭＩＤＥＸ(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ＭＥＫ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ＰＫＣ－α、Ｒａｆ及びＨ－Ｒａｓ、オブリメルセン(ＧＥＮＡＳＥＮＳＥ(登録商標), Genta Inc.)；(vii) リボザイム、例えばＶＥＧＦ発現インヒビター(例えばＡＮＧＩＯＺＹＭＥ(登録商標))及びＨＥＲ２発現インヒビ

ター；(viii) 遺伝子治療ワクチン、例えばＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ(登録商標)、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ(登録商標)及びＶＡＸＩＤ(登録商標)などのワクチン；ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ(登録商標)ｒＩＬ－２；ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ(登録商標)などのトポイソメラーゼ１インヒビター；ＡＢＡＲＥＬＩＸ(登録商標)ｒｍＲＨ；(ix) ベバシズマブ(ＡＶＡＳＴＩＮ(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。

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(Ｃａｍｐａｔｈ)、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標), Genentech)；セツキシマブ(ＥＲＢＩＴＵＸ(登録商標), Imclone)；パニツムマブ(ＶＥＣＴＩＢＩＸ(登録商標), Amgen)、リツキシマブ(ＲＩＴＵＸＡＮ(登録商標), Genentech/Biogen Idec)、ペルツズマブ(ＯＭＮＩＴＡＲＧ^{ＴＭ}, ２Ｃ４, Genentech)、トラスツズマブ(ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ(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(ＭＹＬＯＴＡＲＧ(登録商標), Wyeth)が含まれる。

【０１１２】

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ＣＤ７９ｂ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、増側阻害性剤は、Ｓ期のＣＤ７９ｂ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(dacarbazine)、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５－フルオロウラシル及び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。

【０１１３】

「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。

【０１１４】

「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；トロンボポエチン(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－１ａ、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。

【０１１５】

「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。

【０１１６】

「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。

【０１１７】

「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。

【０１１８】

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$_3$)$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$)、３－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ(ＣＨ$_3$)ＣＨ(ＣＨ$_3$)ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$)、４－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ(ＣＨ$_3$)ＣＨ$_2$ＣＨ(ＣＨ$_3$)2)、３－メチル－３－ペンチル（－Ｃ(ＣＨ$_3$)(ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$)$_2$)、２－メチル－３－ペンチル（－ＣＨ(ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$)ＣＨ(ＣＨ$_3$)$_2$)、２,３－ジメチル－２－ブチル（－Ｃ(ＣＨ$_3$)$_2$ＣＨ(ＣＨ$_3$)$_2$)、３,３－ジメチル－２－ブチル（－ＣＨ(ＣＨ$_3$)Ｃ(ＣＨ$_3$)$_3$、１－ヘプチル、１－オクチルなどが含まれる。

【０１１９】

「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、ｓｐ^{2}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てよく、「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$_2$ＣＨ＝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、ｓｐ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てよい。例には、エチニル(-Ｃ≡ＣＨ)、プロピニル(プロパルギル、－ＣＨ$_2$Ｃ≡ＣＨ)などを含むが、これらに限定されるものではない。

【０１２０】

「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(Ｃ$_3$－Ｃ$_{12}$)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(Ｃ$_6$－Ｃ$_{20}$)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。

【０１２１】

「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 Mo

dern 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。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－ジオキソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニルイミダゾリニル、イミダゾリジニル、３－アザビシクロ[３．１．０]ヘキサニル、３－アザビシクロ[４．１．０]ヘプタニル、アザビシクロ[２．２．２]ヘキサニル、３Ｈ－インド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－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。

【０１２２】

「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、イミドアゾピリジニル、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、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル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。

【０１２３】

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、チオフェン、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。

【０１２４】

「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(－CH_2－) １,２－エチル(－CH_2CH_2－)、１,３－プロピル(－$CH_2CH_2CH_2$－)、１,４－ブチル(－$CH_2CH_2CH_2CH_2$－)などが含まれる。

「C_1－C_{10}アルキレン」は、式 －$(CH_2)_{1-10}$－の直鎖 の飽和した炭化水素基である。C_1－C_{10}アルキレンの例には、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。

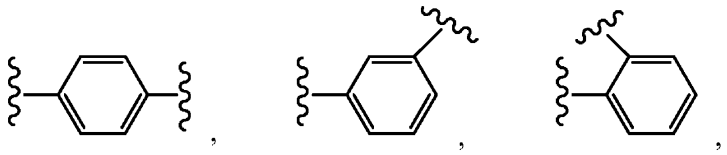
【０１２５】

「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(－CH＝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(－C≡C－)、プロパルギル(－CH_2C≡C－)、及び ４－ペンチニル(－$CH_2CH_2CH_2$C≡C－)が含まれる。

【０１２６】

「アリレン(arylene)」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。



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、－C_1－C_8 アルキル、－O－(C_1－C_8 アルキル)、－アリール、－C(O)R'、－OC(O)R'、－C(O)OR'、－C(O)NH_2 、－C(O)NHR'、－C(O)N(R')$_2$ －NHC(O)R'、－S(O)$_2$R'、－S(O)R'、－OH、－ハロゲン、－N_3 、－NH_2、－NH(R')、－N(R')$_2$、及び－CNを含む最大４つの基にて置換されてもよく、それぞれのR'は、H、－C_1－C_8アルキル及びアリールから個々に選択される。

【０１２７】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又はｓｐ３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－phenylethen－１－イル、ナフチルメチル、２－ナフチルエタン－１－イル、２－naphthylethen－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。

【０１２８】

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、本発明で使用され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。

【０１２９】

「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。

「リポソーム」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。リポ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。

【０１３０】

「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、Jeffamine^{TM})の繰り返しユニットである－(CR_2)$_n$O(CR_2)$_n$－などの部分、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。

【０１３１】

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

「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。

【０１３２】

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、光学的活性を欠く、２つの鏡像異性種を指す。

【０１３３】

「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。

【０１３４】

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、グロクロン酸塩、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しうる。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。

【０１３５】

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ツロン酸、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。

【０１３６】

「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。

【０１３７】

「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。

「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。

【０１３８】

省略記号

リンカー成分：

ＭＣ＝６-マレイミドカプロイル

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

シトルリン＝２-アミノ-５ウレイドペンタン酸

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

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

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

細胞障害性剤：

ＭＭＡＥ＝モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＷ７１８)
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(ＭＷ７３１．５)
ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ＝Ｃ末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にＤＭＡＥＡ(ジメチルアミノエチルアミン)を有するＭＭＡＦ(ＭＷ８０１．５)
ＭＭＡＦ－ＴＥＧ＝フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを有するＭＭＡＦ
ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ＝ＭＭＡＦのＣ末端にアミドとして結合した、Ｎ-ｔ-ブチル
ＤＭ１＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ(２')－(３-メルカプト-１-オキソプロピル)-メイタンシン
ＤＭ３＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ２-(４-メルカプト-１-オキソペンチル)-メイタンシン
ＤＭ４＝Ｎ(２')-デアセチル-Ｎ２-(４-メルカプト-４-メチル-１-オキソペンチル)-メイタンシン

【０１３９】

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、ＤＭＳＯはジメチルスルホキシドであり、ｄｏｅはドラフェニン(dolaphenine)であり、ｄｏｖはＮ,Ｎ-ジメチルバリンであり、ＤＴＮＢは５,５'-ジチオビス(２-ニトロ安息香酸)であり、ＤＴＰＡはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、ＤＴＴはジチオトレイトールであり、ＥＤＣＩは１-(３-ジメチルアミノプロピル)-３-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、ＥＥＤＱは、２-エトキシ-１-エトキシカルボニル-１,２-ジヒドロキノリンであり、ＥＳ-ＭＳはエレクトロスプレー質量分析であり、ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり、ＦｍｏｃはＮ-(９-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、ｇｌｙはグリシンであり、ＨＡＴＵは、Ｏ-(７-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-Ｎ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、ＨＯＢｔは１-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、ＨＰＬＣは高速液体クロマトグラフィであり、ｉｌｅはイソロイシンであり、ｌｙｓはリジンであり、ＭｅＣＮ(CH_3CN)はアセトニトリルであり、ＭｅＯＨはメタノールであり、Ｍｔｒは４-アニシルジフェニルメチル(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(ｐＨ７．４)であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｐｈはフェニルであり、Ｐｎｐはｐ-ニトロフェニルであり、ＭＣは６-マレイミドカプロイルであり、ｐｈｅはＬ-フェニルアラニンであり、ＰｙＢｒｏｐは、ブロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、ＳＥＣはサイズ排除クロマトグラフィであり、Ｓｕはスクシンイミドであり、ＴＦＡはトリフルオロ酢酸であり、ＴＬＣは薄層クロマトグラフィであり、ＵＶは紫外線であり、ｖａｌはバリンである。

【０１４０】

「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。

【０１４１】

「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いてもよい。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。

【０１４２】

図１

表1

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

int        _day[26][26] = {
/*      A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */    { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */    { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */    {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */    { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */    { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */    {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */    { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */    {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */    {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */    {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

表1（続く）

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

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

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

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

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

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

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

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

表1（続く）

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static	_dbval[26] = {
	1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static	_pbval[26] = {
	1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
	128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
	1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
	1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
	int	ac;
	char	*av[];
{
	prog = av[0];
	if (ac != 3) {
		fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
		fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
		fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
		fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
		fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
		exit(1);
	}
	namex[0] = av[1];
	namex[1] = av[2];
	seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
	seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
	xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

	endgaps = 0;		/* 1 to penalize endgaps */
	ofile = "align.out";	/* output file */

	nw();		/* fill in the matrix, get the possible jmps */
	readjmps();	/* get the actual jmps */
	print();	/* print stats, alignment */

	cleanup(0);	/* unlink any tmp files */}
```

main

表1（続く）

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

表1（続く）

...nw

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

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

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

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

...nw

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

表1（続く）

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna  || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
                                                        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
                                                        }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
                                                (void) free((char *)col1);                      }
```

表1（続く）

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

#include "nw.h"

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

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

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
                        pr_align();         }
```

表1（続く）

```
/*
 * 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);
```

表1（続く）

...getmat

```
        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

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

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

表1（続く）

...pr_align

```
        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()
```

dumpblock

```
{
        register   i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

表1（続く）

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                                    nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                                 putline
                                        int     ix;             {
```

表1（続く）

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

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

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


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

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

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

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

表1（続く）

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                                    stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

表1（続く）

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

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

表1（続く）

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                    g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

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

表1（続く）

...readjmps

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

表1（続く）

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

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

【０１４３】

ＩＩＩ．本発明の組成物及び方法

本発明は、抗ＣＤ７９ｂ抗体又はその機能的な断片、及び造血系腫瘍の治療における使用方法を提供する。

一態様では、本発明は、上記又は下記のいずれかのポリペプチドに結合する、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、抗体は、モノクローナル抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ(ａｂ')$_2$、及びＦｖ断片を含む抗体断片、ダイアボディ、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、又はそのそれぞれの抗原エピトープに対する抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、場合によって、例えばアウリスタチン、メイタンシノイド、ドラスタチン類似体又はカリケアマイシンを含む毒素、抗生物質、放射性同位体、核酸溶解酵素などの増殖阻害剤ないし細胞障害剤にコンジュゲートされてもよい。本発明の抗体は、場合によって、ＣＨＯ細胞又は細菌で生産されてもよく、好ましくは、それらが結合する細胞の死を誘導してもよい。検出目的のために、本発明の抗体は、検出可能に標識されても、固形支持体等に付着されてもよい。

【０１４４】

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としての抗体の親和性)がマウス抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのマウス抗体の親和性)又はキメラ抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和性)と実質的に同じである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としての抗体の親和性)がマウス抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのマウス抗体の親和性)又はキメラ抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和性)の例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５又は６０分の１である、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

【０１４５】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としての抗体の親和性)がマウス抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのマウス抗体の親和性)又はキメラ抗体の一価性親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和性)の例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０倍であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が二価の形態のマウス抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)又は二価の形態のキメラ抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和性)と実質的に同じである、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

【０１４６】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が二価の形態のマウス抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)又は二価の形態のキメラ抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧ断片としてのキメラ抗体の親和性)の例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５又は６０分の１である、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が二価の形態のマウス抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)又は二価の形態のキメラ抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧ断片としてのキメラ抗体の親和性)の例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０倍である、ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体であって、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、からなるか、又はから基本的になるものを提供する。

【０１４７】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。更なる態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭ±０．０４であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３２ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３６ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４４ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４８ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ

７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．５ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３ｎＭと０．５ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３２ｎＭと０．４８ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３６ｎＭと０．４４ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

【０１４８】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２ｎＭであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。更なる態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２ｎＭ±０．０２であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１２ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１４ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１６ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１８ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２２ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２４ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２６ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．２８ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３０ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１ｎＭと０．３ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１２ｎＭと０．２８ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１４ｎＭと０．２６ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１６ｎＭと０．２４ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では

、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．１８ｎＭと０．２２ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

【０１４９】

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．５ｎＭであるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。更なる態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．５ｎＭ±０．１であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．５ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．６ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．７ｎＭ以上であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．３ｎＭと０．７ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．４ｎＭと０．６ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。他の態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂに対する二価の形態の抗体の親和性(例えばＣＤ７９ｂに対するＩｇＧとしての抗体の親和性)が０．５ｎＭと０．５５ｎＭの間であるヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。

【０１５０】

一態様では、ＣＤ７９ｂに対するマウス抗体の一価性親和性は、配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の可変ドメイン配列を含むＦａｂ断片の結合親和性と実質的に同じである。他の態様では、ＣＤ７９ｂに対するマウス抗体の一価性親和性は、１９９３年７月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成される抗体の可変ドメインを含むＦａｂ断片、又は１９９３年７月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成される抗体の可変ドメインを含むキメラ抗体の結合親和性と実質的に同じである。

【０１５１】

当分野において十分に確立されているように、リガンドのそのレセプターへの結合親和性は、多くの中のいずれかのアッセイを用いて決定され、様々な量的値の項目で表されうる。したがって、一実施態様では、結合親和性は、Ｋｄ値として表され、(例えば、最小化された結合活性効果による)固有の結合親和性を反映する。概してそして好ましくは、無細胞環境か細胞が関与する環境であるかにかかわらず、結合親和性はインビトロで測定される。本明細書中でより詳細に記載されるように、結合親和性の倍数的差異は、ヒト化抗体(例えば、Ｆａｂ形態)の一価性結合親和性値及び参照／比較抗体(例えば、Ｆａｂ形態)(例えばドナー高頻度可変領域配列を有するマウス抗体)の一価性結合親和性値の比率に関して定量化されてもよく、この結合親和性値は同種のアッセイ条件で決定される。ゆえに、一実施態様では、結合親和性の倍数的差異は、Ｆａｂ形態のヒト化抗体及び前記参照／比較Ｆａｂ抗体のＫｄ値の比率として決定される。例えば、一実施態様では、本発明の抗体(Ａ)が参照抗体(Ｍ)の親和性の「３分の１」である親和性を有する場合、それから、ＡのＫｄ値が３倍である場合、ＭのＫｄ値は１倍であり、ＭのＫｄに対するＡのＫｄの比率は３:１である。反対に、一実施態様では、本発明の抗体(Ｃ)が参照抗体(Ｒ)の親和性の「３倍」である親和性を有する場合、それから、ＣのＫｄ値が１倍である場合、ＲのＫｄ値は３倍であり、ＲのＫｄに対するＣのＫｄの比率は１:３である。本明細書中に記

載のものを含む当分野で公知である多くのアッセイのいずれか、例えばＢｉａｃｏｒｅ、ラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)及びＥＬＩＳＡを用いて、結合親和性測定値を得てもよい。

【０１５２】

一態様では、

(a)

(i) KASQSVDYDGDSFLN（配列番号：１３１)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１

(ii) AASNLES（配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２

(iii) QQSNEDPLT（配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３

(iv) GYTFSSYWIE（配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１

(v) GEILPGGGDTNYNEIFKG（配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、

(vi) TRRVPVYFDY（配列番号：１３６)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３

からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５又は６のＨＶＲを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体が提供される。

一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ-Ｌ1は配列番号：１３１の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ-Ｌ2は配列番号：１３２の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ3は配列番号：１３３の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ-Ｈ1は配列番号：１３４の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ-Ｈ2は配列番号：１３５の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ-Ｈ3は配列番号：１３６の配列を含む。一実施態様では、これらの配列(本明細書に記載のように組み合わせて)を含む本発明の抗体は、ヒト化、又はヒトである。

【０１５３】

一態様では、

(a)

(i) KASQSVDYDGDSFLN（配列番号：１３１)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１

(ii) AASNLES（配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２

(iii) QQSNEDPLT（配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３

(iv) GYTFSSYWIE（配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１

(v) GEILPGGGDTNYNEIFKG（配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、

(vi) TRRVPVYFDY（配列番号：１３６)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３

からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５又は６のＨＶＲと、

(b) 配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４、１３５又は１３６に示される配列の少なくとも１の残基の修飾を配列に含む少なくとも１の変異ＨＶＲ

とを含む、ＣＤ７９ｂに結合する抗体が提供される。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ１は配列番号：１３１の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ２は配列番号：１３２の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ３は配列番号：１３３の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ１は配列番号：１３４の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ２は配列番号：１３５の配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ３は配列番号：１３６の配列を含む。一実施態様では、これらの配列(本明細書に記載のように組み合わせて)を含む本発明の抗体は、ヒト化、又はヒトである。

【０１５４】

一態様では、本発明は、１、２、３、４、５又は６のＨＶＲを含む抗体であって、この各々のＨＶＲが配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４、１３５及び１３６からなる群から選択される配列を含むか、からなるか又は基本的にからなり、このとき配列番号：１３１はＨＶＲ-Ｌ１に対応し、配列番号：１３２はＨＶＲ-Ｌ２に対応し、配列番号：１３３はＨＶＲ-Ｌ３に対応し、配列番号：１３４はＨＶＲ-Ｈ１に対応し、配列番号：１３５はＨＶＲ-Ｈ２に対応し、そして配列番号：１３６はＨＶＲ-Ｈ３に対応する抗体を提供

する。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２及びＨＶＲ－Ｈ３を含み、このそれぞれが順に配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４、１３５及び１３６を含む。

【０１５５】

発明の抗体内の変異体ＨＶＲは、ＨＶＲ内に一又は複数の残基の修飾を有しうる。一実施態様では、ＨＶＲ-Ｌ１変異体は、以下の位置：Ａ４(Ｋ)、Ａ９(Ｅ又はＳ)及びＡ１０(Ａ又はＳ)に１の置換を含む。一実施態様では、ＨＶＲ-Ｌ２変異体は、以下の位置：Ｂ２(Ｓ又はＧ)、Ｂ３(Ｒ又はＧ)、Ｂ４(Ｋ、Ｒ、Ｙ、Ｉ、Ｈ又はＱ)、Ｂ５(Ｒ)、Ｂ６(Ｇ、Ｋ、Ａ、Ｒ、Ｓ又はＬ)及びＢ７(Ｒ、Ｎ、Ｔ又はＧ)のいずれか一又は組合せに１～５(１、２、３、４又は５)の置換を含む。一実施態様では、ＨＶＲ-Ｌ３変異体は、以下の位置：Ｃ１（Ｎ又はＤ)、Ｃ２（Ｎ又はＰ)、Ｃ３（Ｄ又はＲ)、Ｃ５（Ｓ、Ｋ、Ａ、Ｑ、Ｄ、Ｌ又はＧ)、Ｃ６（Ａ、Ｅ又はＮ)、Ｃ７（Ａ)、Ｃ８（Ｒ)及びＣ９（Ｎ)のいずれか一又は組合せに１～４(１、２、３又は４)の置換を含む。一実施態様では、ＨＶＲ-Ｈ１変異体は、以下の位置：Ｄ１（Ｐ)、Ｄ２（Ｆ)、Ｄ３（Ｐ、Ｓ、Ｙ、Ｇ又はＮ)、Ｄ４（Ｌ又はＶ)、Ｄ５（Ｔ、Ｒ、Ｎ、Ｋ、Ｃ、Ｇ又はＰ)、Ｄ６（Ｒ、Ｔ、Ｋ又はＧ)、Ｄ８（Ｆ)、Ｄ９（Ｖ又はＬ)及びＤ１０（Ｓ、Ｑ、Ｎ又はＤ)のいずれか一又は組合せに１～７(１、２、３、４、５、６又は７)の置換を含む。一実施態様では、ＨＶＲ-Ｈ３変異体は、以下の位置：Ｆ４(Ｒ又はＩ)、Ｆ６(Ｉ又はＦ)、Ｆ７(Ｋ、Ｃ、Ｒ、Ｖ又はＦ)、Ｆ８(Ｌ)及びＦ９(Ｓ)のいずれか一又は組合せに１～３(１、２又は３)の置換を含む。各位置の後の括弧内の文字は例示的な置換(すなわち置き換わる)アミノ酸を示し、当業者に明らかなように、本明細書中に記載される文脈での置換アミノ酸としての他のアミノ酸の適合性は、当分野で公知の技術及び／又は本明細書中に記載される技術を用いて慣例的に評価されうる。一実施態様では、変異体ＨＶＲ-Ｌ１のＡ９はＥである。一実施態様では、変異体ＨＶＲ-Ｈ３のＦ６はＩである。一実施態様では、変異体ＨＶＲ-Ｈ３のＦ７はＲである。一実施態様では、変異体ＨＶＲ-Ｈ３のＦ８はＬである。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｆ６がＩであり、Ｆ７がＲであり、Ｆ８がＬである変異体ＨＶＲ-Ｈ３を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ａ９がＥである変異体ＨＶＲ-Ｌ１と、Ｆ６がＩであり、Ｆ７がＲであり、Ｆ８がＬである変異体ＨＶＲ-Ｈ３とを含む。一実施態様では、変異体ＨＶＲ-Ｌ１のＡ９はＳである。一実施態様では、本発明の抗体は、Ａ９がＳである変異体ＨＶＲ-Ｌ１と、Ｆ６がＩであり、Ｆ７がＲであり、Ｆ８がＬである変異体ＨＶＲ-Ｈ３とを含む。

【０１５６】

一実施態様では、本発明の抗体は、Ａ４がＫである変異体ＨＶＲ-Ｌ１を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ－Ｌ１は、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２及びＨＶＲ－Ｈ３を含み、この各々は順に配列番号：１３２、１３３、１３４、１３５及び１３６に示す配列を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ１抗体はさらに、Ａ９がＥ又はＳであり、及び／又はＡ１０がＡ又はＳであるＨＶＲ-Ｌ１変異体を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ１抗体はさらに、Ｃ６がＥ又はＮであり、及び／又はＣ７がＡであるＨＶＲ-Ｌ３変異体を含む。ある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体のある実施態様では、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位

置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、７５はＳであり、７８はＡであり、そして、又は、８０はＭである。これらの抗体のある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。

【０１５７】

一実施態様では、本発明の抗体は、Ｂ３がＲであり、Ｂ４がＫであり、Ｂ６がＧであり、Ｂ７がＲである変異体ＨＶＲ-Ｌ２を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｂ３がＲであり、Ｂ４がＹであり、Ｂ６がＫであり、Ｂ７がＲである変異体ＨＶＲ-Ｌ２を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｂ３がＲであり、Ｂ４がＫであり、Ｂ６がＧである変異体ＨＶＲ-Ｌ２を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ－Ｌ２はさらに、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２及びＨＶＲ－Ｈ３を含み、このそれぞれが順に配列番号：１３１、１３３、１３４、１３５及び１３６を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ２抗体はさらに、Ａ９がＥ又はＳであり、及び／又はＡ１０がＡ又はＳであるＨＶＲ-Ｌ１変異体を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ２抗体はさらに、Ｃ６がＥ又はＮであり、及び／又はＣ７がＡであるＨＶＲ-Ｌ３変異体を含む。ある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体のある実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、７５はＳであり、７８はＡであり、そして、又は、８０はＭである。これらの抗体のある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。

【０１５８】

一実施態様では、本発明の抗体は、Ｃ５がＫである変異体ＨＶＲ-Ｌ３を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｃ５がＳである変異体ＨＶＲ-Ｌ３を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ－Ｌ３はさらに、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２及びＨＶＲ－Ｈ３を含み、このそれぞれが順に配列番号：１３１、１３２、１３４、１３５及び１３６を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ３抗体はさらに、Ａ９がＥ又はＳであり、及び／又はＡ１０がＡ又はＳであるＨＶＲ-Ｌ１変異体を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｌ３抗体はさらに、Ｃ６がＥ又はＮであり、及び／又はＣ７がＡであるＨＶＲ-Ｌ３変異体を含む。ある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体のある実施

態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、７５はＳであり、７８はＡであり、そして、又は、８０はＭである。これらの抗体のある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列が位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。

【０１５９】

一実施態様では、本発明の抗体は、Ｄ３がＰであり、Ｄ５がＴであり、Ｄ６がＲであり、Ｄ１０がＮである変異体ＨＶＲ－Ｈ１を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｄ３がＰであり、Ｄ５がＮであり、Ｄ６がＲであり、Ｄ１０がＮである変異体ＨＶＲ－Ｈ１を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ－Ｈ１はさらに、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ２及びＨＶＲ－Ｈ３を含み、このそれぞれが順に配列番号：１３１、１３２、１３３、１３５及び１３６を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｈ１抗体はさらに、Ａ９がＥ又はＳであり、及び／又はＡ１０がＡ又はＳであるＨＶＲ-Ｌ１変異体を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｈ１抗体はさらに、Ｃ６がＥ又はＮであり、及び／又はＣ７がＡであるＨＶＲ-Ｌ３変異体を含む。ある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体のある実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、７５はＳであり、７８はＡであり、そして、又は、８０はＭである。これらの抗体のある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。

【０１６０】

一実施態様では、本発明の抗体は、Ｆ６がＩであり、Ｆ８がＬである変異体ＨＶＲ-Ｈ３を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、Ｆ６がＩであり、Ｆ７がＲであり、Ｆ８がＬである変異体ＨＶＲ－Ｈ３を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ－Ｈ３はさらに、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１及びＨＶＲ－Ｈ２を含み、このそれぞれが順に配列番号：１３１、１３２、１３３、１３４及び１３５を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｈ３抗体はさらに、Ａ９がＥ又はＳであり、及び／又はＡ１０がＡ又はＳであるＨＶＲ-Ｌ１変異体を含む。ある実施態様では、前記変異体ＨＶＲ-Ｈ３抗体はさらに、Ｃ６がＥ又はＮであり、及び／又はＣ７がＡであるＨＶＲ-Ｌ

３変異体を含む。ある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３及び／又は７８に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、及び／又は、７８はＡである。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体のある実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。これらの抗体の一実施態様では、ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトサブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４８はＩであり、６７はＡであり、６９はＦであり、７１はＡであり、７３はＴであり、７５はＳであり、７８はＡであり、そして、又は、８０はＭである。

これらの抗体のある実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークヒトκＩ軽鎖フレームワークコンセンサス配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、(ヒトκI軽鎖フレームワークコンセンサス配列の)位置４はＬであり、及び／又は、４７はＦである。

【０１６１】

一態様では、本発明は、図９(配列番号：１７－２１)及び／又は図１０(配列番号：２２－１０６)に示されるＨＶＲ配列の１、２、３、４、５又はすべてを含む抗体を提供する。

【０１６２】

宿主被検体に使用するための治療剤は、該被検体における該薬剤に対する免疫原性応答をほとんどないしは全く誘発しないのが望ましい。一実施態様では、本発明はそのような薬剤を提供する。例えば、一実施態様では、本発明は、宿主被検体において配列番号１０及び１４の配列を含む抗体と比較して実質的に低減したレベルでヒト抗マウス抗体応答(ＨＡＭＡ)を誘発する、及び／又は誘発することが期待されるヒト化抗体を提供する。他の例では、本発明は、最小限のヒト抗マウス抗体応答(ＨＡＭＡ)を誘発するか、全く誘発しないことが期待されるヒト抗体を提供する。一例では、本発明の抗体は、臨床的に許容可能なレベルであるか、それよりも低い抗マウス抗体応答を誘発する。

本発明のヒト化抗体は、その重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメインに一又は複数のヒト及び／又はヒトコンセンサス非高頻度可変領域(例えばフレームワーク)配列を含有してもよい。ある実施態様では、ヒト及び／又はヒトコンセンサス非高頻度可変領域配列内に一又は複数の付加的な修飾が存在する。一実施態様では、本発明の抗体の重鎖可変ドメインはヒトコンセンサスフレームワーク配列を含んでなり、一実施態様では、そのヒトコンセンサスフレームワーク配列はサブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列である。一実施態様では、本発明の抗体は、少なくとも一アミノ酸位置が修飾された変異体サブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列を含んでなる。例えば、一実施態様では、変異体サブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列は、位置７１、７３及び／又は７８の一又は複数に置換を含んでもよい。一実施態様では、前記の置換はＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及び／又はＮ７８Ａの何れかの組合せである。例えば、一実施態様では、変異体サブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３及び／又は７８に置換を含む。一実施態様では、前記置換は、Ｖ４８Ｉ、Ｆ６７Ａ、Ｉ６９

Ｆ、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及び／又はＬ７８Ａである。例えば、一実施態様では、変異体サブグループＩＩＩ重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０に置換を含む。一実施態様では、前記置換は、Ｖ４８Ｉ、Ｆ６７Ａ、Ｉ６９Ｆ、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、Ｋ７５Ｓ、Ｌ７８Ａ及び／又はＬ８０Ｍである。一実施態様では、本発明の抗体の軽鎖可変ドメインは、ヒトのコンセンサスフレームワーク配列を含み、一実施態様では、κIコンセンサスフレームワーク配列である。一実施態様では、本発明の抗体は、少なくとも一のアミノ酸位置で修飾されている変異体κIコンセンサスフレームワーク配列を含む。例えば、一実施態様では、変異体κIコンセンサスフレームワーク配列は位置４に置換を含む。一実施態様では、前記置換はＭ４Ｌである。例えば、一実施態様では、変異体κIコンセンサスフレームワーク配列は位置４及び／又は４７に置換を含む。一実施態様では、前記置換は、Ｍ４Ｌ及び／又はＬ４７Ｆである。

【０１６３】

当分野で公知であるように、また、より詳細に後述するように、抗体の高頻度可変領域を示すアミノ酸位置／境界域は、(以下に記載のように)当分野で公知の様々な定義及び状況によって異なりうる。可変ドメイン内の位置は、ある定義のもとで高頻度可変領域外と判断されても、異なる定義のもとでは高頻度可変領域内であると判断されうるハイブリッド高頻度可変位置とみなされるものが多い。また、一又は複数のこれらの位置は、伸展した高頻度可変領域にあるとみなされうる(以下に定義する)。本発明は、これらハイブリッド高頻度可変位置内に修飾を含有する抗体を提供する。一実施態様では、これらのハイブリッド高頻度可変位置には、重鎖可変ドメイン内の位置２６－３０、３３－３５Ｂ、４７－４９、５７－６５、９３、９４及び１０１－１０２の一又は複数が含まれる。一実施態様では、これらハイブリッド高頻度可変位置には、軽鎖可変ドメイン内の位置２４－２９、３５－３６、４６－４９、５６及び９７の一又は複数が含まれる。一実施態様では、本発明の抗体は、一又は複数のハイブリッド高頻度可変位置が修飾された可変ヒトサブグループコンセンサスフレームワーク配列を含んでなる。

【０１６４】

一態様では、本発明の抗体は、一又は複数の位置２６－３０、３３－３５、４８－４９、５８、６０－６３、９３及び１０１が修飾された可変ヒトサブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列を含んでなる。一実施態様では、抗体はG26Ｐ置換を含む。一実施態様では、抗体はＦ２７Ｙ置換を含む。一実施態様では、抗体は、Ｔ２８Ｐ、Ｓ、Ｙ、Ｇ又はＮ置換を含む。一実施態様では、抗体は、Ｆ２９Ｌ又はＦ２９Ｖ置換を含む。一実施態様では、抗体は、Ｓ３０Ｔ、Ｒ、Ｎ、Ｋ、Ｃ、Ｇ又はＰ置換を含む。一実施態様では、抗体は、Ａ３３W又はＡ３３Ｆ置換を含む。一実施態様では、抗体は、Ｍ３４Ｉ、Ｖ又はＬ置換を含む。一実施態様では、Ｓ３５Ｅ、Ｑ、Ｎ又はＤである。一実施態様では、抗体はＶ４８Ｉ置換を含む。一実施態様では、抗体はＳ４９Ｇ置換を含む。一実施態様では、抗体はＹ５８Ｎ置換を含む。一実施態様では、抗体はＡ６０Ｎ置換を含む。一実施態様では、抗体はＤ６１Ｅ置換を含む。一実施態様では、抗体はＳ６２Ｉ置換を含む。一実施態様では、抗体はＶ６３Ｆ置換を含む。一実施態様では、抗体はＡ９３Ｔ置換を含む。一実施態様では、抗体はＤ１０１Ｓ置換を含む。

一態様では、本発明の抗体は、位置２４、２７－２９、５６及び９７の一又は複数で修飾された変異体ヒトκサブグループIコンセンサスフレームワーク配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、抗体はＲ２４Ｋ置換を含む。一実施態様では、抗体はＱ２７Ｋ置換を含む。一実施態様では、抗体はＳ２８Ｄ又はＥ置換を含む。一実施態様では、抗体はＩ２９Ｇ、Ａ又はＳ置換を含む。一実施態様では、抗体はＳ５６Ｒ、Ｎ、Ｔ又はＧ置換を含む。一実施態様では、抗体はＴ９７Ｎ置換を含む。

【０１６５】

一態様では、本発明の抗体は、位置２６－３０、３３－３５、４８－４９、５８、６０－６３、９３及び１０１の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又はすべてで修飾されている変異体ヒトサブグループIIIコンセン

サスフレームワーク配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、修飾は、Ｇ２６Ｐ、Ｆ２７Ｙ、Ｔ２８Ｐ（Ｓ、Ｙ、Ｇ又はN)、Ｆ２９Ｌ（Ｖ)、Ｓ３０Ｔ（Ｒ、Ｎ、Ｋ、Ｃ、Ｇ又はＰ)、Ａ３３Ｗ（Ｆ)、Ｍ３４Ｉ（Ｖ又はＬ)、Ｓ３５Ｅ（Ｑ、Ｎ又はＤ)、Ｖ４８Ｉ、Ｓ４９Ｇ、Ｙ５８Ｎ、Ａ６０Ｎ、Ｄ６１Ｅ、Ｓ６２Ｉ、Ｖ６３Ｆ、Ａ９３Ｔ及びＤ１０１Ｓからなる群から選択される。本発明のある実施態様では、本発明の抗体は、位置４８、６７、６９、７１、７３、７５、７８及び／又は８０で修飾される変異体サブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列を含む。一実施態様では、前記置換は、Ｖ４８Ｉ、Ｆ６７Ａ、Ｉ６９Ｆ、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、Ｋ７５Ｓ、Ｌ７８Ａ及び／又はＬ８０Ｍである。

一態様では、本発明の抗体は、位置２４、２７－２９、５６及び９７の１、２、３、４、５又はすべてで修飾される変異体ヒトκサブグループIコンセンサスフレームワーク配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、修飾は、Ｒ２４Ｋ、Ｑ２７Ｋ、Ｓ２８Ｄ(Ｅ)、Ｉ２９Ｇ(Ａ又はＳ)、Ｓ５６Ｒ(Ｎ、Ｔ又はＧ)及びＴ９７Ｎからなる群から選択される。本発明のある実施態様では、本発明の抗体は、位置４及び／又は４７で修飾される変異体κＩコンセンサスフレームワーク配列を含む。一実施態様では、前記置換は、Ｍ４Ｌ及び／又はＬ４７Ｆである。

【０１６６】

本発明の抗体は、抗体が所望の生物学的特性(例えば所望の結合親和性)を表す限り、任意の好適なヒト又はヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含みうる。一実施態様では、本発明の抗体は、ヒト軽鎖のフレームワーク配列の少なくとも一部(又はすべて)を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ヒトκサブグループIフレームワークコンセンサス配列の少なくとも一部(又はすべて)を含む。

一態様では、本発明の抗体は、配列番号：９(図７Ａ－Ｂ)及び／又は１３(図８Ａ－Ｂ)に示されるフレームワーク配列を含む重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメインを含む。

【０１６７】

一態様では、本発明の抗体は、細胞障害性剤にコンジュゲートされたヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体である。一態様では、細胞障害性剤にコンジュゲートされたヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体は、異種移植片の腫瘍発達を阻害する。

一態様では、ヒト化抗体及びキメラ抗体は、一価性である。一実施態様では、ヒト化及びキメラ抗体は、Ｆｃ領域に連結された単一Ｆａｂ領域を含む。一実施態様では、参照キメラ抗体は、ヒトＦｃ領域に連結された、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示される可変ドメイン配列を含む。一実施態様では、ヒトＦｃ領域は、ＩｇＧ(例えばＩｇＧ１、２、３又は４)のものである。

【０１６８】

一態様では、本発明は、図１５(配列番号：１６４－１６６)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１５(配列番号：１６０－１６３)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１５(配列番号：１６７及び／又は１６８)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列(図１５、配列番号：１６４－１６６)、及びＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１５、配列番号：１６０－１６３)を含む重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１５、配列番号：１６４－１６６)と、図１５(配列番号：１６７及び／又は１６８)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列とを含む。一実施態様では、本発明の抗体はＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１５、配列番号：１６４－１６６)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１５、配列番号：１６０－１６３)と、ＣＨ１及び／又はＦｃ(図１５、配列番号：１６７及び／又は１６８)とを含む。

一態様では、本発明は、図１５(配列番号：１５６－１５８)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１５(配列番号：１５２-１５５)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１５(配列番号：１５９)に示されるＣＬ１配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１５に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１５６－１５８)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列(配列番号：１５２－１５５)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１５に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１５６-１５８)と、ＣＬ１配列(配列番号：１５９)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１５に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１５６－１５８)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ(配列番号：１５２－１５５)配列と、図１５(配列番号：１５９)に示されるＣＬ１配列とを含む。

【０１６９】

一態様では、本発明は、図１６(配列番号：１８３－１８５)に示される、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１６(配列番号：１７９－１８２)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１６(配列番号：１８６及び／又は１８７)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１６、配列番号：１８３-１８５)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１６、配列番号：１７９－１８２)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１６、配列番号：１８３－１８５)と、図１６に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列(配列番号：１８６及び／又は１８７)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１６、配列番号：１８３－１８５)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１６、配列番号：１７９－１８２)と、ＣＨ１及び／又はＦｃ(図１６、配列番号：１８６及び／又は１８７)とを含む。

一態様では、本発明は、図１６(配列番号：１７５－１７７)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１６(配列番号：１７１－１７４)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１６(配列番号：１７８)に示されるＣＬ１配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１６に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１７５－１７７)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列(配列番号：１７１－１７４)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１６に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１７５－１７７)と、ＣＬ１配列(配列番号：１７８)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１６に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列(配列番号：１７５－１７７)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ(配列番号：１７１－１７４)配列と、図１６(配列番号：１７８)に示されるＣＬ１配列とを含む。

【０１７０】

一態様では、本発明は、図１７(配列番号：２０２－２０４)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１７(配列番号：１９８－２０１)に示される

ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１７(配列番号：２０５及び／又は２０６)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１７、配列番号：２０２－２０４)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１７、配列番号：１９８－２０１)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１７、配列番号：２０２－２０４)と、図１７に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列(配列番号：２０５及び／又は２０６)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１７、配列番号：２０２－２０４)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１７、配列番号：１９８－２０１)と、ＣＨ１及び／又はＦｃ(図１７、配列番号：２０５及び／又は２０６)とを含む。

一態様では、本発明は、図１７(配列番号：１９４－１９６)に示されるＨＶＲ1-ＬＣ、ＨＶＲ2-ＬＣ及び／又はＨＶＲ3-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１７(配列番号：１９０－１９３)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１７(配列番号：１９７)に示されるＣＬ１配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１７に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１９４-１９６)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列(配列番号：１９０-１９３)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１７に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１９４－１９６)と、ＣＬ１配列(配列番号：１９７)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１７に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：１９４－１９６)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ(配列番号：１９０-１９３)配列と、図１７(配列番号：１９７)に示されるＣＬ１配列とを含む。

【０１７１】

一態様では、本発明は、図１８(配列番号：２２１－２２３)に示されるＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１８(配列番号：２１７－２２０)に示されるＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１８(配列番号：２２４及び／又は２２５)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１８、配列番号：２２１－２２３)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１８、配列番号：２１７－２２０)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１８、配列番号：２２１－２２３)と、図１８(配列番号：２２４及び／又は２２５)に示されるＣＨ１及び／又はＦｃ配列とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ１-ＨＣ、ＨＶＲ２-ＨＣ及び／又はＨＶＲ３-ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメイン(図１８、配列番号：２２１－２２３)と、ＦＲ１-ＨＣ、ＦＲ２-ＨＣ、ＦＲ３-ＨＣ及び／又はＦＲ４-ＨＣ配列(図１８、配列番号：２１７－２２０)と、ＣＨ１及び／又はＦｃ(図１８、配列番号：２２４及び／又は２２５)とを含む。

一態様では、本発明は、図１８(配列番号：２１３－２１５)に示されるＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施態様では、可変ドメインは、図１８(配列番号：２０９－２１２)に示されるＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列を含む。一実施態様では、抗体は、図１８(配列番号：２１６)に示されるＣＬ１配列を含む。一実施態様では

、本発明の抗体は、図１８に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：２１３－２１５)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ配列(配列番号：２０９－２１２)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１８に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：２１３－２１５)と、ＣＬ１配列(配列番号：２１６)とを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、図１８に示される、ＨＶＲ１-ＬＣ、ＨＶＲ２-ＬＣ及び／又はＨＶＲ３-ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメイン(配列番号：２１３－２１５)と、ＦＲ１-ＬＣ、ＦＲ２-ＬＣ、ＦＲ３-ＬＣ及び／又はＦＲ４-ＬＣ(配列番号：２０９－２１２)配列と、図１８(配列番号：２１６)に示されるＣＬ１配列とを含む。

【０１７２】

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ＣＤ７９ｂ抗体のいずれかの形態が改変、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ＴｈｉｏＦａｂの単一の改変したシステイン残基が生じるのに対して、ＩｇＧ抗体の二量体の性質のためにＴｈｉｏＭａｂ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。本発明のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体には、細胞関連のＣＤ７９ｂ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)。

【０１７３】

ある態様では、本発明のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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２４Ａ、２５Ａ、２６Ａ、２７Ａ、２８、４８Ａ及び４９Ａ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２４Ｂ、２５Ｂ、２６Ｂ、２７Ｂ、２８Ｂ、４８Ｂ及び４９Ｂ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２４－２８、４８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ＣＤ７９ｂ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２７Ａ及び４９Ａにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＨＣ-Ａ１１８Ｃに改変されたシステインを含む(ＥＵ番号：Ａｌａ１１８；カバット番号１１４；図２４Ｂ、２５Ｂ、２６Ｂ、２８Ｂ又は４８Ｂ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２４Ｂ、２５Ｂ、２６Ｂ、２８Ｂ又は４８Ｂにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ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、図２４Ｂ、２５Ｂ、２６Ｂ、２８Ｂ又は４８Ｂ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、本発明の親ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、Ｖ５Ｃ、Ａ２３Ｃ、Ａ８４Ｃ、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、本発明の親キメラ抗ＣＤ７９ｂ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ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ抗体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、本発明の親ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体についてこれらの位置でのアミノ酸の変化は、Ｖ１５Ｃ、Ｖ１１０Ｃ、Ｓ１１４Ｃ、Ｓ１２１Ｃ、Ｓ１２７Ｃ、Ｓ１６８Ｃ又はＶ２０５Ｃである。したがって、本発明の親キメラ抗ＣＤ７９ｂ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ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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。

【０１７４】

一態様では、本発明には、一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体であり、該システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体がＣＤ７９ｂポリペプチドに結合するものであり、親の抗ＣＤ７９ｂ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、このとき該親抗体が以下から選択される少なくとも一つのＨＶＲ配列を含むものである。

(a) KASQSVDYDGDSFLN (配列番号：１３１)又はKASQSVDYEGDSFLN (配列番号：１３７)である配列Ａ１－Ａ１５を含むＨＶＲ－Ｌ１、

(b) AASNLES (配列番号：１３２)である配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

(c) QQSNEDPLT (配列番号：１３３)である配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

(d) GYTFSSYWIE (配列番号：１３４)である配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

(e) GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号：１３５)である配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び、

(f) TRRVPVYFDY (配列番号：１３６)又はTRRVPIRLDY (配列番号：１３８)である配列Ｆ１－Ｆ１０を含むＨＶＲ－Ｈ３。

【０１７５】

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、システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体に関する。

【０１７６】

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ＤＮＡ分子の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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。

【０１７７】

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システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ)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ＣＤ７９ｂ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、例えばエピトープタグ配列又はイムノグロブリンのＦｃ領域などの異種性のポリペプチドに融合させた、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。

【０１７８】

システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、それぞれの抗原エピトープへの抗ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体、抗体断片、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、ＣＨＯ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。

本発明の他の態様では、本発明は、本明細書中に記載したいずれかの抗ＣＤ７９ｂ抗体及び抗ＣＤ７９ｂシステイン改変抗体をコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、このいずれかのベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞又は酵母であってもよい。さらに、本明細書中に記載のいずれかのポリペプチドを産生するための方法が提供され、所望のポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含んでなる。

【０１７９】

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(ＴＡＡ)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(ＡＤＣ)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－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。Ｌ１０－Ｌ２０、Ｌ１０５－Ｌ１１５、Ｌ１０９－Ｌ１１９、Ｌ１１６－Ｌ１２６、Ｌ１２２－Ｌ１３２、Ｌ１６３－Ｌ１７３、Ｌ２００－Ｌ２１０のアミノ酸範囲から選択される軽鎖の範囲内、及びＨ１－Ｈ１０、Ｈ１８－Ｈ２８、Ｈ７９－Ｈ８９、Ｈ１０７－Ｈ１１７、Ｈ１０９－Ｈ１１９、Ｈ１１１－Ｈ１２１のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内、及びＨ２７０－Ｈ２８０、Ｈ３６６－Ｈ３７６、Ｈ３９１－４０１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、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３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ＩｇＧサブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ及びＩｇＡ２を含むＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭの重鎖定常ドメインα、δ、ε、γ及びμにあってもよい。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。

【０１８０】

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、ＣＤ７９ｂに限定されないＣＤタンパク質)であってもよい。本発明のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体はその親の抗ＣＤ７９ｂ抗体相当物の抗原結合能を保持する。ゆえに、本発明のシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ヒト抗ＣＤ７９ｂアイソフォームβ及び／又はαなどのＣＤ７９ｂ抗原に対して(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)、結合、好ましくは特異的に結合することができる。

【０１８１】

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。

【０１８２】

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^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔ、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, Volumes 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、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡ及びＴＥＴＡ(Macrocyclics, 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): 1137-1146)。

【０１８３】

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-ＮＨＳ(１,４,７,１０-テトラアザシクロドデカン-１,４,７,１０-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬は市販されている(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出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. Cancer1990, 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: 829-36；Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74；Roselli等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

【０１８４】

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。

【０１８５】

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 Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

【０１８６】

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：

(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)。

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。

【０１８７】

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、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 Techni

ques Academic Press, San Diego)。

【０１８８】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばＥＬＩＳＡ、競合結合アッセイ、直接的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りうる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出しうる。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(ＳＰＲ)効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定して検出するものである。

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。

【０１８９】

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(ＦＭＡＴ(登録商標) ８１００ ＨＴＳ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(ＦＬＩＳＡ)、カスパーゼ切断(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23；米国特許第６３７２９０７号)、アポトーシス(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)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)。

【０１９０】

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) ＭＲＩ(磁気共鳴画像法)、(ii) ＭｉｃｒｏＣＴ(コンピューター断層撮影法)、(iii) ＳＰＥＣＴ(単一光子放射型コンピュータ断層撮影法)、(iv) ＰＥＴ(ポジトロン放出断層撮影) Chen等 (2004) Bioconjugate 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位のものである(米国特許第

６５２８６２４号)。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、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。

【０１９１】

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；Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, 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)。

【０１９２】

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、ｐＨ５．０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。

【０１９３】

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)-１-１,３,３-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、ＴＦＦＨ（N,N',N'',N'''-テトラメチルユーロニウム ２-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、ＰｙＢＯＰ（ベンゾトリアゾール-１-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、ＥＥＤＱ（２-エトキシ-１-エトキシカルボニル-１,２-ジヒドロ-キノリン)、ＤＣＣ（ジシクロヘキシルカルボジイミド)；ＤＩＰＣＤＩ（ジイソプロピルカルボジイミド)、ＭＳＮＴ（１-(メシチレン-２-スルホニル)-３-ニトロ-１H-１,２,４-トリアゾール、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。

【０１９４】

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２４６から２５０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。

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF　　配列番号：２４６
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF　　配列番号：２４７
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF　　配列番号：２４８
RLIEDICLPRWGCLWEDD　　配列番号：２４９
DICLPRWGCLW　　配列番号：２５０

【０１９５】

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ＣＤ７９ｂ抗体を含む。

【０１９６】

一態様では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、他のＣＤ７９ｂ抗体によって結合されるＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体は、１９９３年7月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成されるモノクローナル抗体、配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、又は１９９３年7月２０日にＡＴＣＣに寄託されたＨＢ１１４１３ハイブリドーマから生成される抗体の可変ドメイン及びＩｇＧ１からの定常ドメインないしは配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインのいずれかを含むキメラ抗体のＦａｂ断片によって結合されるＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体は、他のＣＤ７９ｂ抗体(すなわち、ＣＢ３.１(BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、ＡＴ１０５-１(AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、ＡＴ１０７-２(AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))によって結合されるＣＤ７９ｂ上の同じエピトープに結合する。

【０１９７】

他の態様では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、他のＣＤ７９ｂ抗体によって結合されるエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。他の実施態様では、本発明の抗体は、１９９３年7月２０日にＡＴＣＣに寄託されたＨＢ１１４１３ハイブリドーマから生成されるモノクローナル抗体、配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、又は１９９３年7月２０日にＡＴＣＣに寄託されたＨＢ１１４１３ハイブリドーマから生成される抗体の可変ドメイン及びＩｇＧ１からの定常ドメインないしは配列番号：１０(図７Ａ－Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ－Ｂ)の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインのいずれかを含むキメラ抗体のＦａｂ断片によって結合されるエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。他の実施態様では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、他のＣＤ７９ｂ抗体(すなわち、ＣＢ３.１(BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、ＡＴ１０５-１(AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、ＡＴ１０７-２(AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))によって結合されるＣＤ７９ｂ上のエピトープとは異なるＣＤ７９ｂ上のエピトープに結合する。

【０１９８】

他の態様では、本発明のＣＤ７９ｂ抗体は、１９９３年7月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成されるモノクローナル抗体、配列番号：１０(図７A-B)及び配列番号：１４(図８A-B)の可変ドメインを含むモノクローナル抗体、又は１９９３年7月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリ

ドーマから生成される抗体の可変ドメインとＩｇＧ１からの定常ドメイン、ないしは配列番号：１０(図７Ａ-Ｂ)及び配列番号：１４(図８Ａ-Ｂ)の配列を含むモノクローナル抗体の可変ドメインを含むキメラ抗体の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ＣＤ７９ｂ抗体は、他のＣＤ７９ｂ抗体(すなわち、ＣＢ３.１(BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA)、ＡＴ１０５-１(AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC)、ＡＴ１０７-２(AbD Serotec Catalog #MCA2209)、抗ヒトＣＤ７９ｂ抗体(BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA))のＦａｂ断片とは異なる(すなわち、それではない)。

【０１９９】

一態様では、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。

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数の抗体と担体とを含有する組成物を提供する。一実施態様では、担体は薬学的に許容可能である。

一態様では、本発明は、本発明のＣＤ７９ｂ抗体をコードする核酸を提供する。

一態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

一態様では、本発明は、本発明の核酸又はベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターは、いずれかの種類、例えば発現ベクターなどの組み換えベクターであってもよい。様々な宿主細胞のいずれかを用いてよい。一実施態様では、宿主細胞は原核細胞、例えば大腸菌である。一実施態様では、宿主細胞は真核細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞などの哺乳動物細胞である。

【０２００】

一態様では、本発明は、本発明の抗体の製造方法を提供する。例えば、本発明は、ＣＤ７９ｂ抗体(本明細書で定義されるように、完全長及びその断片を含む)の製造方法であって、適切な宿主細胞において該抗体(又はその断片)をコードする本発明の組み換えベクターを発現させ、該抗体を回収することを含む方法を提供する。

一態様では、本発明は、容器と、容器内に内包される組成物とを具備し、該組成物が一又は複数の本発明のＣＤ７９ｂ抗体を含むものである製造品を提供する。一実施態様では、組成物は本発明の核酸を含む。一実施態様では、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、本発明の製造品はさらに、被検体への組成物(例えば抗体)の投与についての指示を含む。

一態様では、本発明は、本発明の一又は複数のＣＤ７９ｂ抗体を含む組成物を含む第一容器と、バッファを含む第二容器とを具備するキットを提供する。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含む。

【０２０１】

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ＣＤ７９ｂ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。

【０２０２】

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(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。

【０２０３】

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。

【０２０４】

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂ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。

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞を含む癌性の腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、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、ＣＤ７９ｂ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。

【０２０５】

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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【０２０６】

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、ＣＤ７９ｂ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。

【０２０７】

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを含有することが疑われる試料においてＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂに対する該抗体の結合を決定することを含み、このとき該試料におけるＣＤ７９ｂ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。

一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂに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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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。

【０２０８】

一態様では、本発明は、血液又は血清における可溶性ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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。

【０２０９】

本発明の方法は、任意の好適な病理学的状態、例えばＣＤ７９ｂ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、白血病細胞又は骨髄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。

【０２１０】

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、ＣＤ７９ｂを発現しない細胞と比較してＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

本発明の他の態様では、本発明は、本明細書中に記載のいずれかの抗体をコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、このような任意のベクターを含む宿主細胞が提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、大腸菌又は酵母菌であってもよい。本明細書中に記載のいずれかの抗体の製造方法がさらに提供され、所望の抗体の発現に適する条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望の抗体を回収することを含む。

なお更なる態様では、本発明は、本明細書中に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体を担体と組み合わせて含む組成物に関する。場合によって、担体は薬学的に許容可能な担体である。

本発明の他の態様は、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂポリペプチド抗体の使用に関する。

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。

【０２１１】

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。

【０２１２】

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効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。

本発明の一態様は、式Ｉ抗体薬剤コンジュゲート化合物の製造方法であって、(a) システイン改変抗体の改変されたシステイン基をリンカー試薬と反応させて抗体－リンカー中間生成物Ａｂ－Ｌを形成させ、(b) Ａｂ－Ｌを活性化された薬剤成分Ｄと反応させて、抗体－薬剤コンジュゲートを形成させる、という工程を含むか、又は、(c) 薬剤成分の求核性基をリンカー試薬と反応させて薬剤－リンカー中間生成物Ｄ－Ｌを形成させ、(d) Ｄ－Ｌをシステイン改変抗体の改変されたシステイン基と反応させて、抗体－薬剤コンジュゲートを形成させる、という工程を含む方法である。

本発明の一態様は、癌細胞を検出するためのアッセイであって、(a) 細胞をシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬剤コンジュゲートにさらし、(b) システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体－薬剤コンジュゲート化合物の細胞に対する結合の程度を決定することを含む方法である。

【０２１３】

Ａ．抗ＣＤ７９ｂ抗体

一実施態様では、本発明は治療薬としての本明細書中における使用を理解しうる抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。抗体の例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

【０２１４】

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一又は複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生させる。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に関連する抗原をコンジュゲートさせるために有用である(特に合成ペプチドが使用されるとき)。例えば、抗原は、キーホールリンペットヘモシアニン(ＫＬＨ)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリ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、ＳＯＣｌ$_2$、又はＲ及びＲ^{1}が異なるアルキル基であるＲ^{1}Ｎ＝Ｃ＝ＮＲを用いてコンジュゲートさせることができる。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート１００μｇ又は５μｇ(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント３容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導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から１／１０のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。７から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。

【０２１５】

２．モノクローナル抗体

本明細書中に記載の抗原に対する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、次いで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髄腫細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞(融合パートナーとも呼ばれる)の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠失するならば、ハイブリドーマのための選択的培地は、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)。

【０２１６】

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

【０２１７】

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。

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

所望の特異性、親和性、及び／又は活性な抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されたら、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入により、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー(例えばプロテインＡ又はプロテインＧ-セファロースを使用するもの)、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、透析など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。

【０２１８】

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

さらなる実施態様では、モノクローナル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。

例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(C_H及びC_L)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４８１６５６７号；及びMorrison等, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列を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と融合させることによって、抗体をコードするＤＮＡを修飾し、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。前記の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可変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。

【０２１９】

３．ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含みうる。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形態は、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’、$F(ab')_2$又は非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む、抗体のその他抗原結合サブシーケンス)である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域(ＣＤＲ)由来の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、又はウサギといった非ヒト種(ドナー抗体)のＣＤＲ由来の残基によって置換されているヒト免疫グロブリンが含まれる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも移入されたＣＤＲ又はフレームワーク配列にも見られない残基も含みうる。一般に、ヒト化抗体は、すべて又はほぼすべてのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンに対応しており、且つすべて又はほぼすべてのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンの共通配列である、少なくとも一及び典型的には二の可変ドメインのほぼすべてを含む。最適には、ヒト化抗体は、免疫グロブリンの定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域(Ｆｃ)、の少なくとも一部も含む[Jones等、Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)］。

非ヒト抗体をヒト化する方法は、従来技術に周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入される一又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「移入」残基と呼ばれ、通常は一の「移入」可変ドメインから取得される。ヒト化は基本的にWinter及び共同研究者による方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実行される(Jones等、Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等、Science, 239:1534-1536 (1988))。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４８１６５６７号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

【０２２０】

抗体がヒトの治療用に用いられる場合、抗原性及びＨＡＭＡ応答(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。ＨＡＭＡ応答の低減又は除去は、適切な治療薬の臨床上の発達の有意な態様である。例として、Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937；Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572；Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530；Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138；Miller et al., Blood (1983), 62:988；Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352；Reichmann et al., Nature (1988), 332:323；Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495を参照のこと。本明細書において記述されるように、本発明は、ＨＡＭＡ応答が低減されるか又は取り除かれるように、ヒト化される抗体を提供する。さらに、これらの抗体の変異体は、当分野で公知の慣例的な方法を用いて得られる。その方法のいくつかは以降に記載される。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全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトＶドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(ＦＲ)をヒト化抗体に受け入れる(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))。

【０２２１】

例えば、本明細書において記述されるように、抗体のアミノ酸配列はフレームワーク及び／又は高頻度可変配列(一又は複数)を多様化させるために開始(親)配列として働きうる。開始高頻度可変配列が連結される選択されたフレームワーク配列は、本明細書において、アクセプターヒトフレームワークと称する。アクセプターヒトフレームワークは、ヒト免疫グロブリン(そのＶＬ及び／又はＶＨ領域)のものかあるいはそれに由来するものであってよいが、好ましくはヒトコンセンサスフレームワーク配列のものかあるいはそれに由来するものであり、これはそのようなフレームワークがヒト患者においてごく小さい免疫原性あるいは全く免疫原性を示さないことが証明されているためである。

アクセプターがヒト免疫グロブリンから得られる場合、場合によっては、ドナーフレームワーク配列を一まとまりのヒトフレームワーク配列の様々なヒトフレームワーク配列と整列配置させることによって、ドナーフレームワーク配列に対するその相同性に基づいて選択されるヒトフレームワーク配列を選択し、アクセプターとして最も相同性のあるフレームワーク配列を選択してもよい。

【０２２２】

一実施態様では、本明細書中のヒトコンセンサスフレームワークは、ＶＨサブグループＩＩＩ及び／又はＶＬκサブグループIコンセンサスフレームワーク配列のものかあるいはそれに由来するものである。

ゆえに、ＶＨアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列の１、２、３又はすべてを含んでもよい。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(配列番号：１４３)を含むＦＲ１、

WVRQAPGKGLEWV(配列番号：１４４)を含むＦＲ２、

RFTISX$_1$DX$_2$SKNTX$_3$YLQMNSLRAEDTAVYYC(配列番号：１４７)を含むＦＲ３であって、Ｘ$_1$はＡ又はＲであり、Ｘ$_2$はＴ又はＮであり、Ｘ$_3$はＡ又はＬであるＦＲ３、

WGQGTLVTVSS(配列番号：１４６)を含むＦＲ４。

【０２２３】

ＶＨコンセンサスフレームワークの例には以下が含まれる。

ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１０８)；

ヒトＶＨサブグループIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１０９－１１１)；

ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１１２)；

ヒトＶＨサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１１３－１１５)；
ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１１６)；
ヒトＶＨサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１１７－１１９)；
ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１２０)；
ヒトＶＨアクセプターフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１２１－１２２)；
ヒトＶＨアクセプター２フレームワークマイナスカバットＣＤＲ(配列番号：１２３)；又は、
ヒトＶＨアクセプタ２フレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号：１２４－１２６)。

【０２２４】

一実施態様では、ＶＨアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列の１、２、３又はすべてを含む。
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(配列番号：１４３)を含むＦＲ１、
WVRQAPGKGLEWV(配列番号：１４４)を含むＦＲ２、
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC(配列番号：１４５)、
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA(配列番号：１４８)、
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号：１４９)、
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS(配列番号：１５０)、又は
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR(配列番号：１５１)を含むＦＲ３、
WGQGTLVTVSS(配列番号：１４６)を含むＦＲ４。

【０２２５】

ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、以下のフレームワーク配列の１、２、３又はすべてを含んでもよい。
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(配列番号：１３９)を含むＦＲ１、
WYQQKPGKAPKLLIY(配列番号：１４０)を含むＦＲ２、
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(配列番号：１４１)を含むＦＲ３、
FGQGTKVEIKR(配列番号：１４２)を含むＦＲ４。

ＶＬコンセンサスフレームワークの例には、以下が含まれる。
ヒトＶＬκサブグループIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２７)；
ヒトＶＬκサブグループIIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２８)；
ヒトＶＬκサブグループIIIコンセンサスフレームワーク(配列番号：１２９)；又は、
ヒトＶＬκサブグループIVコンセンサスフレームワーク(配列番号：１３０)。

【０２２６】

アクセプターが、ヒト免疫グロブリン又はヒトコンセンサスフレームワークからのものか否かにかかわらず、配列において、選択されたヒトフレームワーク配列と同一でもよい一方で、本発明では、アクセプター配列はヒト免疫グロブリン配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に関して既存のアミノ酸置換を含有しうると考えられる。これらの既存の置換は、ヒト免疫グロブリン配列又はコンセンサスに関して、最小限、通常、４つ、３つ、２つ又は一つだけのアミノ酸の相違であることが好ましい。

非ヒト抗体の高頻度可変領域残基は、ＶＬ及び／又はＶＨアクセプターヒトフレームワークに組込まれる。例えば、ＫａｂａｔＣＤＲ残基、Ｃｈｏｔｈｉａ超可変ループ残基、ＡｂＭ残基、及び／又は接触残基に対応する残基を組込んでもよい。場合によって、以下のような伸展した高頻度可変領域残基が組み込まれる：２４－３４(Ｌ１)、５０－５６(Ｌ２)及び８９－９７(Ｌ３)、２６－３５Ｂ(Ｈ１)、５０－６５、４７－６５又は４９－６５(Ｈ２)及び９３－１０２、９４－１０２又は９５－１０２(Ｈ３)。

【０２２７】

高頻度可変領域残基の「組込み」は本明細書中で検討され、様々な方法で達成可能であり、例えば、所望のアミノ酸配列をコードする核酸は、そのフレームワーク残基がアクセプターヒトフレームワーク残基に変化するようにマウス可変ドメイン配列をコードする核酸を変異させることによって、又は、高頻度可変領域残基が非ヒト残基に変化するようにヒト可変ドメイン配列をコードする核酸を変異させることによって、又は、所望の配列をコードする核酸を合成することによってなどして生成できる。

本明細書中の実施例では、高頻度可変領域グラフト変異体は、各高頻度可変領域について別個のオリゴヌクレオチドを用いて、ヒトアクセプター配列をコードする核酸のＫｕｎｋｅｌ突然変異誘発法により生成された。Kunkel 等, Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)。慣例的な技術を用いてフレームワーク及び／又は高頻度可変領域の中に適当な変異を導入して、適正な高頻度可変領域-抗原相互作用を修正及び再確立できる。

【０２２８】

ファージ(ファジミド)ディスプレイ(また本明細書中ではファージディスプレイとも称する)は、配列のランダム化により生成されたライブラリ中の、多くの異なる潜在的な変異体抗体の生成及びスクリーニングのための簡便で迅速な方法として用いることができる。しかしながら、変更された抗体の作製及びスクリーニングのための他の方法も当業者に有用である。

ファージ(ファジミド)ディスプレイ技術は、抗原などのリガンドに結合する新規のタンパク質を生成して選別するための強力な手段を提供している。ファージ(ファジミド)ディスプレイ技術を用いると、高い親和性で標的分子と結合する配列について迅速に選別できるタンパク質変異体の大きなライブラリを生成できる。変異体ポリペプチドをコードする核酸は、通常、遺伝子ＩＩＩタンパク質又は遺伝子ＶＩＩＩタンパク質などのウィルスコートタンパク質をコードする核酸配列に融合する。タンパク質又はポリペプチドをコードする核酸配列が遺伝子ＩＩＩタンパク質の一部をコードする核酸配列に融合されている一価性ファジミドディスプレイシステムが開発されている。(Bass, S., Proteins, 8:309 (1990)、Lowman及びWells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991))。一価性ファジミドディスプレイシステムにおいて、遺伝子融合は低レベルで発現され、粒子の感染力が保持されるように野生型遺伝子ＩＩＩタンパク質も発現される。ペプチドライブラリを生成する方法及びそれらのライブラリのスクリーニング方法は、多くの特許に開示されている(例えば米国特許第５７２３２８６号、同第５４３２０１８号、同第５５８０７１７号、同第５４２７９０８号、及び同第５４９８５３０号)。

【０２２９】

抗体又は抗原結合ポリペプチドのライブラリは、ランダムなＤＮＡ配列を挿入することによって、単一遺伝子を変更すること、又は、関連した遺伝子のファミリをクローニングすることなどを含む、多くの方法により調製されている。ファージ(ファジミド)ディスプレイを用いた抗体又は抗原結合断片のディスプレイ方法は、米国特許第５７５０３７３号、同第５７３３７４３号、同第５８３７２４２号、同第５９６９１０８号、同第６１７２１９７号、同第５５８０７１７号、及び同第５６５８７２７号に記述されている。次いでライブラリは、所望の特徴を有する抗原結合タンパク質又は抗体の発現についてスクリーニングされる。

鋳型核酸を選択するアミノ酸に置き換える方法は当分野では十分に確立されており、そのいくつかは本明細書中に記載される。例えば、高頻度可変領域残基はキュンケル法を使用して置換されてもよい。例としてKunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)を参照のこと。

【０２３０】

オリゴヌクレオチド配列は、変更する高頻度可変領域残基の一又は複数の設計されたコドンセットを含む。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。コドンセットは、ＩＵＢコードによって以下に示すように、特定のヌクレオチド又はヌクレオチドの等モル混合物を示す符号を使って表される。

ＩＵＢコード
Ｇ　グアニン
Ａ　アデニン
Ｔ　チミン
Ｃ　シトシン
Ｒ(Ａ又はＧ)
Ｙ(Ｃ又はＴ)
Ｍ(Ａ又はＣ)
Ｋ(Ｇ又はＴ)
Ｓ(Ｃ又はＧ)
Ｗ(Ａ又はＴ)
Ｈ(Ａ又はＣ又はＴ)
Ｂ(Ｃ又はＧ又はＴ)
Ｖ(Ａ又はＣ又はＧ)
Ｄ(Ａ又はＧ又はＴ)Ｈ
Ｎ(Ａ又はＣ又はＧ又はＴ)

【０２３１】

例えば、コドンセットＤＶＫでは、ＤはヌクレオチドＡ又はＧ又はＴであり；ＶはＡ又はＧ又はＣであり；ＫはＧ又はＴであってよい。このコドンセットは１８の異なるコドンを示し、アミノ酸Ａｌａ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｙｓ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ及びＣｙｓをコードする。

オリゴヌクレオチド又はプライマーのセットは、標準の方法を使って合成できる。一組のオリゴヌクレオチドは、例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの全ての可能な組合せを表し且つ所望のアミノ酸群をコードする配列を含み、固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているオリゴヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー(Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能)を使って合成することができ、又は市販品を入手することができる(例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明に従って使用されるように、オリゴヌクレオチドは、可変ドメインの核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

【０２３２】

一つの方法では、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は、オリゴヌクレオチドを媒介した突然変異生成によって作製することができる。この手法はZoller等, Nucleic Acids Res.10:6487-6504 (1987)が記載しているように、当技術分野で公知である。つまり、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は、所望の制限コドンセットをコードしているオリゴヌクレオチドセットをＤＮＡ鋳型にハイブリダイズすることによって作製され、前記鋳型は可変領域核酸鋳型配列を含むプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーションの後、ＤＮＡポリメラーゼを用いて鋳型の完全二次相補鎖を合成し、この相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを組込み、前記オリゴヌクレオチドセットによって提供される制限コドンセットを含むようになる。

通常、長さが少なくとも２５ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが使われる。最適なオリゴヌクレオチドは、突然変異体をコードするヌクレオチド(一又は複数)の片側が鋳型と完全に相補性である少なくとも１２から１５個のヌクレオチドを持つ。これにより、オリゴヌクレオチドが正しく一本鎖ＤＮＡ鋳型分子にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の手法、例えばCrea等, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA, 75:5765 (1978)に記載の手法を使って容易に合成される。

【０２３３】
ＤＮＡ鋳型はバクテリオファージＭ１３ベクター(市販のＭ１３ｍｐ１８及びＭ１３ｍｐ１９ベクターが適当)に由来するベクター、又はViera等，Meth.Enzymol.，153:3 (1987)に記載の一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異されるＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの一つに挿入することができる。一本鎖鋳型の生産は、Sambrook等，上掲のセクション４．２１～４．４１に記載されている。
天然のＤＮＡ配列を変えるために、オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件の下で一本鎖鋳型にハイブリダイズされる。ＤＮＡ重合酵素、通常、Ｔ７ＤＮＡポリメラーゼ又はＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗ断片を次に加え、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使って鋳型の相補鎖を合成する。こうしてＤＮＡの一つの鎖が遺伝子１の突然変異した形態をコードし、他の鎖(元の鋳型)が遺伝子１の未変性、未変更の配列をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞、通常大腸菌ＪＭ１０１のような原核生物に形質転換される。細胞を増殖させた後にアガロースプレートの上へプレートし、突然変異したＤＮＡを含む細菌コロニーを同定するために^{32}Ｐリン酸塩で放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使ってスクリーニングする。
【０２３４】
直前で記載されている方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異を含むホモ二本鎖分子が作製されるように修正することができる。この修正は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを先に述べたように一本鎖鋳型にアニールする。３つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(ｄＡＴＰ)、デオキシリボグアノシン(ｄＧＴＰ)及びデオキシリボチミジン(ｄＴＴ)の混合物を、ｄＣＴＰ－(ａＳ)と呼ばれる修飾されたチオデオキシリボシトシン(Ａｍｅｒｓｈａｍから入手できる)と合わせる。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。ＤＮＡポリメラーゼをこの混合物へ追加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一のＤＮＡ鎖が生成される。さらに、この新しいＤＮＡ鎖はｄＣＴＰの代わりにｄＣＴＰ-(ａＳ)を含み、これはＤＮＡ鎖を制限酵素による消化作用から保護するのに役立つ。二本鎖ヘテロ二本鎖の鋳型鎖に適当な制限酵素でニックを入れた後、突然変異を起こさせる部位を含む領域の後方で鋳型鎖はＥｘｏＩＩＩヌクレアーゼ又は別の適当なヌクレアーゼで消化することができる。反応を終了すると、部分的にだけ一本鎖の分子が残る。次に、完全な二本鎖ＤＮＡホモ二本鎖が、４つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸のすべて、ＡＴＰ及びＤＮＡリガーゼの存在下でＤＮＡポリメラーゼを使って形成される。このホモ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞に形質転換することができる。
【０２３５】
前に示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは、鋳型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位を含むこともできる。ＤＮＡ鋳型は、バクテリオファージＭ１３ベクターに由来するベクター、又はViera等(Meth.Enzymol.，153:3 (1987))に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成できる。このように、突然変異させるべきＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの一つに挿入する必要がある。一本鎖鋳型の生産は、Sambrook等，上掲のセクション４．２１～４．４１に記載されている。
他の方法に従って、抗原結合は、修復された高頻度可変領域の選択により、抗体のヒト化の間に回復されてもよい(２００５年２月１８日出願の米国特許第１１／０６１８４１号を参照)。この方法には、非ヒト高頻度可変領域をアクセプターフレームワークに組み込み、さらにアクセプターフレームワーク配列を変更することなく一又は複数の高頻度可変領域に一又は複数のアミノ酸置換を導入することが含まれる。あるいは、一又は複数のアミノ酸置換の導入は、アクセプターフレームワーク配列内の修飾を伴ってもよい。
【０２３６】
別の方法によると、ライブラリは上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットを提供する

ことによって生成することができ、各セットは、異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを持つ。これらの配列は、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立される。上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鋳型核酸配列と共に、ポリメラーゼ連鎖反応(ＰＣＲ)で用いてＰＣＲ産物の「ライブラリ」を作製することができる。ＰＣＲ産物は確立された分子生物学的手法を使って他の関連した、又は無関係な核酸配列、例えばウィルスのコートタンパク質及び二量体化ドメインと融合することができるので、「核酸カセット」と呼ぶこともある。

ＰＣＲプライマー配列は、高頻度可変領域の溶媒に露出し非常に多様な位置のために設計された一又は複数のコドンセットを含む。前記したように、コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。

【０２３７】

標準的な組み換え技術を用いて、好適なスクリーニング／選別工程を介して選択された、所望の基準を満たす抗体選択物を単離してクローニングすることができる。

更に、抗体を、抗原に対する高い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ために、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グリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、ＦＲ残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【０２３８】

ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の様々な形態を考える。例えば、ヒト化抗体は、Ｆａｂなどの、任意で一又は複数の細胞障害性剤とコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを生成する抗体断片とすることができる。或いは、ヒト化抗体は、インタクトＩｇＧ１抗体などのインタクト抗体でもよい。

ヒト化の代わりに、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無しで、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); Bruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993)；米国特許第５５４５８０６号、同５５６９８２５号、同５５９１６６９号(すべてＧｅｎＰｈａｒｍ)；米国特許第５５４５８０７号；及び国際公開第９７／１７８５２号を参照されたい。

【０２３９】

また、ファージディスプレイ技術(McCafferty等、Nature 348:552-553 (1990))を用いて、未免疫のドナー由来の免疫グロブリン可変(Ｖ)ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体及び抗体断片を産生することができる。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細胞の特性の幾つかを模倣している。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。Ｖ-遺伝子セグメントの複数の供給源を、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、免疫化したマウスの脾臓由来の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から、多様な抗-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、多様な抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、基本的にMarks等, J. Mol. Biol. 222：581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12：725-734(1993)に記載の技術に従って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。

上述のように、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もできる(米国特許第５５６７６１０号及び同５２２９２７５号)。

【０２４０】

４．抗体断片

特定の実施態様では、抗体全体より抗体断片を使用する方が有利である。小さな断片は迅速なクリアランスを可能にし、固形腫瘍へのアクセスを向上させる。

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に発現され、且つ大腸菌から分泌されるので、これら断片を容易に大量生成することができる。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリ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。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含むインビボでの半減期が増大したＦａｂ及びＦ(ａｂ’)$_2$断片は、米国特許第５８６９０４６号に記載されている。抗体断片を生成するのための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖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ｓＦｖ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。ｓＦｖ融合タンパク質は、ｓＦｖ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。

【０２４１】

５．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２の異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、本明細書において記述されるように、ＣＤ７９ｂタンパク質の２つの異なるエピトープに結合してもよい。他のこのような抗体は、ＣＤ７９ｂ結合部位を他のタンパク質のための結合部位と組み合わせてもよい。あるいは、抗ＣＤ７９ｂアームは、Ｔ細胞レセプター分子(例えばＣＤ３)などの白血球上のトリガー分子、又はＦｃγＲI(ＣＤ６４)、ＦｃγＲII(ＣＤ３２)及びＦｃγＲIII(ＣＤ１６)などのＩｇＧのためのＦｃレセプター(ＦｃγＲ)に結合するアームと組み合わせて、ＣＤ７９ｂ発現細胞に細胞防御機構を集中させ局在化させてもよい。また、二重特異性抗体は、ＣＤ７９ｂを発現する細胞に細胞障害性剤を局所化するために用いられてもよい。これらの抗体は、ＣＤ７９ｂ-結合アームと、細胞障害性剤(例えばサポリン、抗インターフェロン-α、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)を結合するアームとを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体、又は、抗体断片(例えばＦ(ａｂ

')$_2$二重特異性抗体)として調製されてもよい。
国際公開９６／１６６７３は二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγRIII抗体を記載し、米国特許第５８３７２３４号は二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγRI抗体を開示する。二重特異性抗ＥｒｂＢ２／Ｆｃα抗体は国際公開９８／０２４６３に示される。米国特許第５８２１３３７号は二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＣＤ３抗体を教示する。
【０２４２】
二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等，Nature，305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は１０個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第９３／０８８２９号及びTraunecker等，EMBO Ｊ．10:3655-3659(1991)に開示されている。
【０２４３】
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。好ましくは、該融合は少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含むＩｇ重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているＤＮＡを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主細胞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３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、３つのポリペプチド断片の相互の割合の調節における柔軟性が増大する。しかし、少なくとも２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差の組み合わせの収率に有意な影響を及ぼさないときは、２又は３個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を単一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一実施態様では、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。
【０２４４】
米国特許第５７３１１６８号に記載された他の手法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第２の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。
二重特異性抗体は、架橋した抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。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、他方はビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に向けるため(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号、同第９２／２００３７３号、及び欧州特許第０３０８９号)提案されている。ヘテロコン

ジュゲート抗体は、便利な架橋方法のいずれかを使用して作製することができる。適切な架橋剤は当技術分野において周知であり、多数の架橋技術と共に米国特許第４６７６９８０号に開示されている。

【０２４５】

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、亜砒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Ｆａｂ'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。Ｆａｂ'-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Ｆａｂ'-チオールに再変換し、他のＦａｂ'-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Ｆａｂ'-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Ｆａｂ'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ＥｒｂＢ２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。

【０２４６】

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Ｆａｂ'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の２つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより$Ｖ_Ｌ$に$Ｖ_Ｈ$を結合してなる。従って、一つの断片の$Ｖ_Ｈ$及び$Ｖ_Ｌ$ドメインは他の断片の相補的$Ｖ_Ｌ$及び$Ｖ_Ｈ$ドメインと強制的に対形成させられ、よって２つの抗原結合部位を形成する。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)。

【０２４７】

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本発明の範囲内である。ヘテロコンジュゲート抗体は２つの共有結合で結合した抗体で構成される。そのような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞を標的化するため(米国特許第４６７６９８０号)、及びＨＩＶ感染の治療のため(国際公開９１／００３６０； 国際公開９２／２００３７３； 欧州特許第０３０８９号)に、提案されている。抗体は合成タンパクの化学の公知の方法、例えば架橋剤を伴うものを用いて、インビトロで調製してもよい。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド－交換反応を用いるかチオエーテル結合を形成させることにより構築されてもよい。この目的に適当な試薬の例には、イミノチオラート及びメチル－４－メルカプトブチルイミダート、並びに例えば米国特許４６７６９８０号に記載の試薬が含まれる。

【０２４８】

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。

【０２４９】

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性細胞媒介性細胞障害性(ＡＤＣＣ)及び／又は補体依存性細胞障害性(ＣＤＣ)を向上させることが望ましい。これは、抗体のＦｃ領域に一又は複数のアミノ酸置換を導入することにより達成することができる。別法として又は付加的に、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体－依存細胞性細胞障害性(ＡＤＣＣ)を有する可能性がある。Caron等，Ｊ．Exp．Med．176：1191-1195 (1992)及びShopes， Ｂ．Ｊ．Immunol．148：2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等，Cancer Research 53：2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等，Anti-Cancer Drug Design 3：219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第５７３９２７７号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、ＩｇＧ分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるＩｇＧ分子(例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3又はIgG_4)のＦｃ領域のエピトープを意味する。

【０２５０】

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・アメリカーナ(Phytolaca americana)タン

パク質(ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ-Ｓ)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。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)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートＨＣｌ等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン２，６-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、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、アウリスタチンペプチド、例えばモノメチルアウリスタチン(ＭＭＡＥ)(ドラスタチンの合成アナログ)、メイタンシノイド、例えばＤＭ１、トリコテセン、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。

【０２５１】

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ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲート(「ＴＤＣ」)を含んでもよい。

$$Ab\text{–}(L\text{–}D)_p \qquad I$$

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抗体当たりおよそ１～およそ２０の薬剤部分、ある実施態様では、抗体当たり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。

【０２５２】

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」、本明細書中では「ＭＣＣ」とも称される)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「ＳＩＡＢ」)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。

【０２５３】

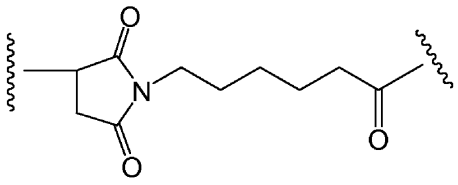
ある実施態様では、リンカーは以下の式ＩＩに示される通りである。

$$-A_a-W_w-Y_y- \qquad \text{II}$$

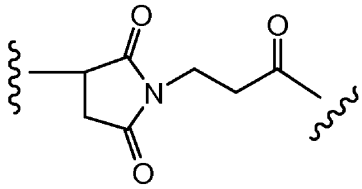
このとき、Ａはストレッチャーユニットであり、０から１の整数であり、Ｗはアミノ酸ユニットであり、ｗは０から１２の整数であり、Ｙはスペーサーユニットであり、ｙは０、１又は２であり、Ａｂ、Ｄ及びｐは式Ｉについて先に定義した通りである。このようなリンカーの例示的な実施態様は、米国公開２００５－０２３８６４９Ａ１に記述される。その内容は出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

【０２５４】

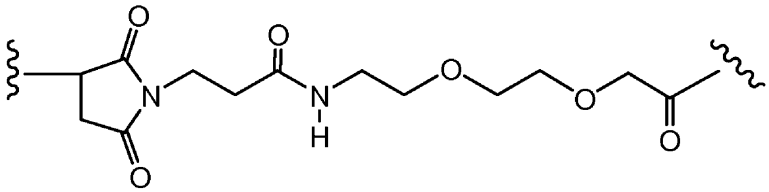
いくつかの実施態様では、リンカー成分は、抗体を他のリンカー成分又は薬剤部分に連結する「ストレッチャーユニット」を含んでもよい。例示的なストレッチャーユニットを以下に示す(波線は抗体への共有結合の部位を示す)。



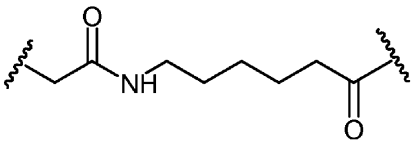
MC



MP



MPEG



【０２５５】

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(ｖｃ又はｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｆ又はａｌａ-ｐｈｅ)；フェニルアラニン-リジン(ｆｋ又はｐｈｅ-ｌｙｓ)；又はN-メチル-バリン-シトルリン(Ｍｅ-ｖａｌ-ｃｉｔ)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(ｇｌｙ-ｖａｌ-ｃｉｔ)及びグリシン-グリシン-グリシン(ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙ)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。

【０２５６】

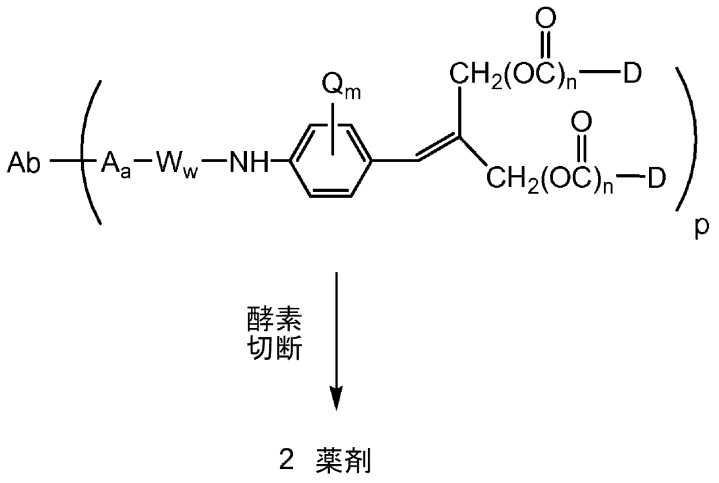
いくつかの実施態様では、リンカー成分は、直接又は、ストレッチャーユニット及び／又はアミノ酸ユニットにより、抗体を薬剤部分に連結する「スペーサー」ユニットを含みうる。スペーサーユニットは、「自己犠牲」又は「非自己犠牲」であってもよい。「非自己犠牲」のスペーサーユニットは、ＡＤＣの酵素的な(例えばタンパク質分解性の)切断によりスペーサーユニットの一部又はすべてが薬剤部分に結合したままとなるものである。非自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン-グリシンスペーサーユニットが含まれる。また、配列特異的な酵素的切断の影響を受けるペプチド性スペー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。

【０２５７】

「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Ｑｍに置き換えられ、このＱは-C_1-C_8アルキル、-Ｏ-(C_1-C_8アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、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、置換されたな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シクロ[２．２．１]及びビシクロ[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ａ-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。

【０２５８】

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。

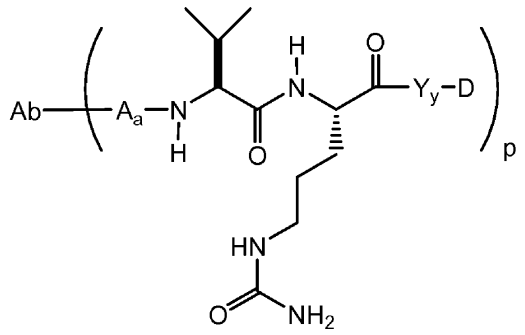


ここで、Ｑは－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｏ－(Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$アルキル)、－ハロゲン、－ニトロ、又は－シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数であり、ｎは０又は１であり、そして、ｐは１～およそ２０の範囲である。

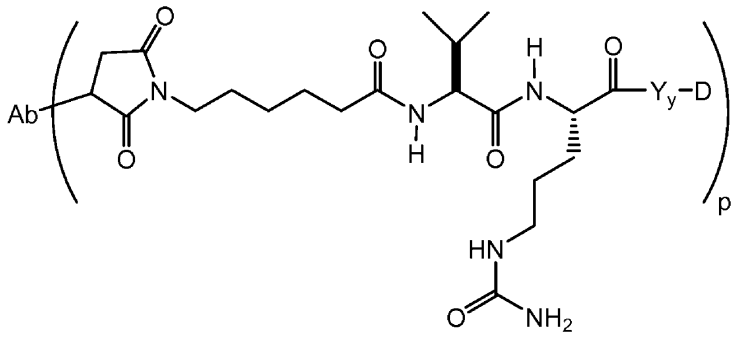
【０２５９】

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 & 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。

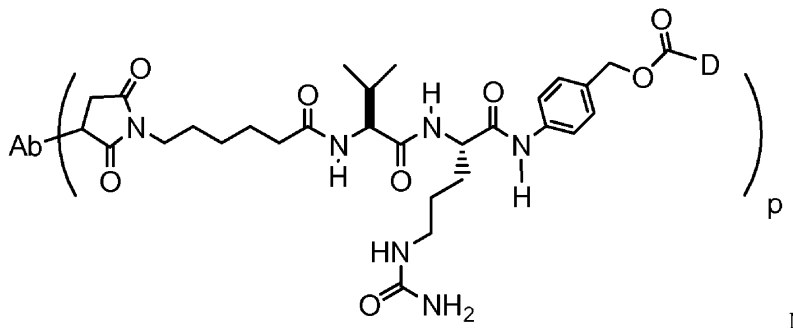
例示的なリンカーは、上記いずれかの一又は複数のリンカー成分を含んでもよい。ある実施態様では、リンカーは、以下のＡＤＣ　式IIにおいて括弧で示す。



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うる。

【０２６０】

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

【０２６１】

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、マイタンシノール及びマ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(－ＯＣＯＲ)、＋／－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。

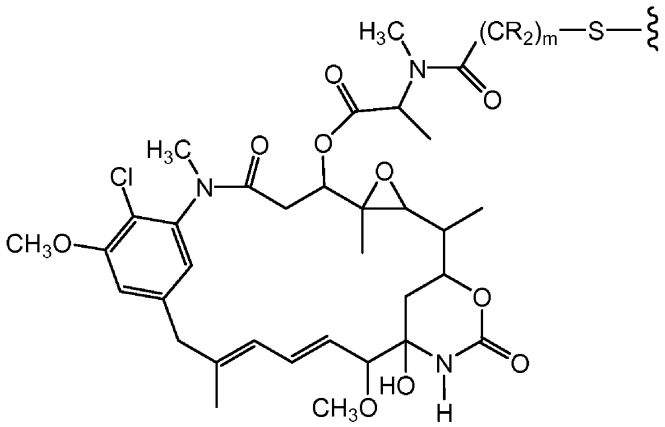
【０２６２】

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)(H_2S又はP_2S_5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／CH_2 ＯＲ)(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(CH_2OH又はCH_2OAc) (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 nudlflora)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。

【０２６３】

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；ＵＳ ＲＥ３９１５１；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)。

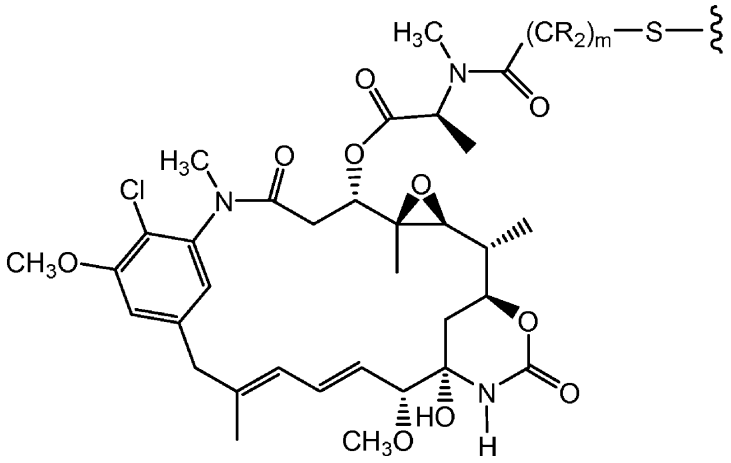
メイタンシノイド薬剤成分は、以下の構造を有するものを含む。



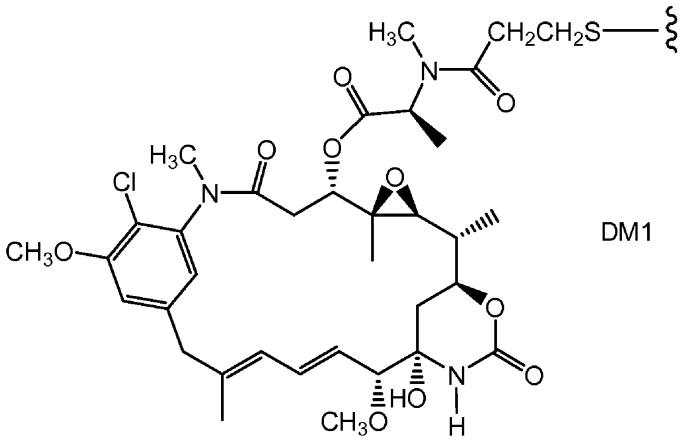
ここで、波線は、ＡＤＣのリンカーへのメイタンシノイド薬剤成分の硫黄原子の共有結合を示す。Ｒは、独立してＨ又はＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであってもよい。硫黄原子にアミド基を付着しているアルキレン鎖は、メタニル、エタニル又はプロピルであってもよく、すなわち、ｍは１、２又は３である(米国特許第６３３４１０号；米国特許第５２０８０２０号；米国特許第７２７６４９７第；Chari et al (1992) Cancer Res. 52: 127-131；Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623)。

【０２６４】

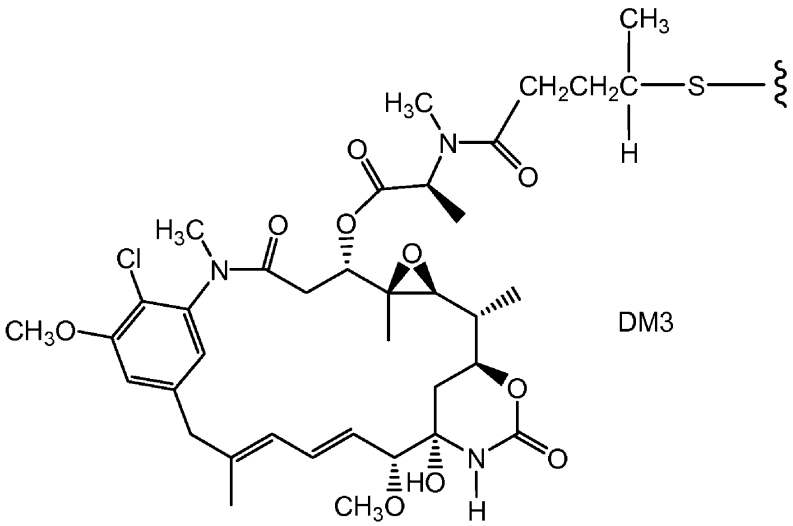
メイタンシノイド薬剤成分のすべての立体異性体は、本発明の化合物炭素、すなわちＤのキラルの炭素でのＲとＳ配位の任意の組合が考慮される。一実施態様では、メイタンシノイド薬剤成分は、以下の立体化学を有するであろう。



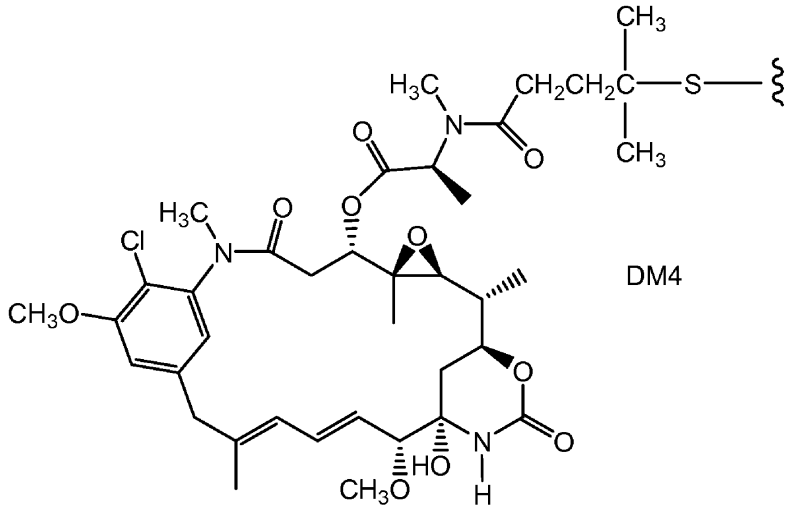
メイタンシノイド薬剤成分の例示的な実施態様には、以下の構造を有するＤＭ１；ＤＭ３；及びＤＭ４が含まれる。



DM1



DM3

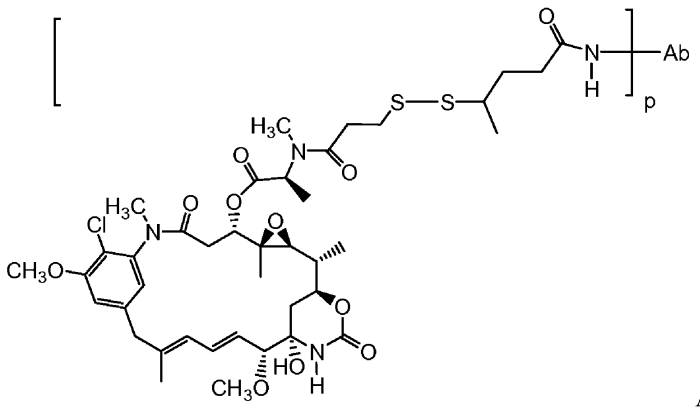


DM4

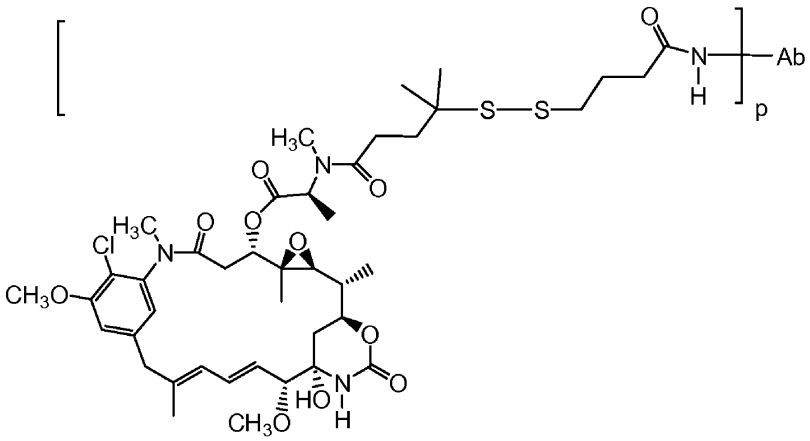
ここで、波線は、抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。(国際公開第２００５／０３７９９２号；米国特許公開２００５／０２７６８１２号Ａ１)。

【０２６５】

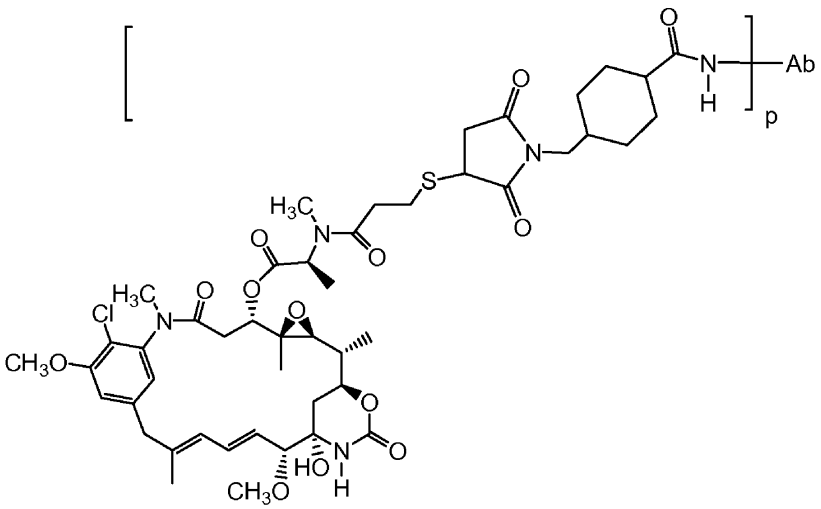
他の例示的メイタンシノイド抗体－薬剤コンジュゲートは以下のような構造と略記号を有している。(ここでＡｂは抗体であり、ｐは１～およそ８である。)



Ab -SPP-DM1



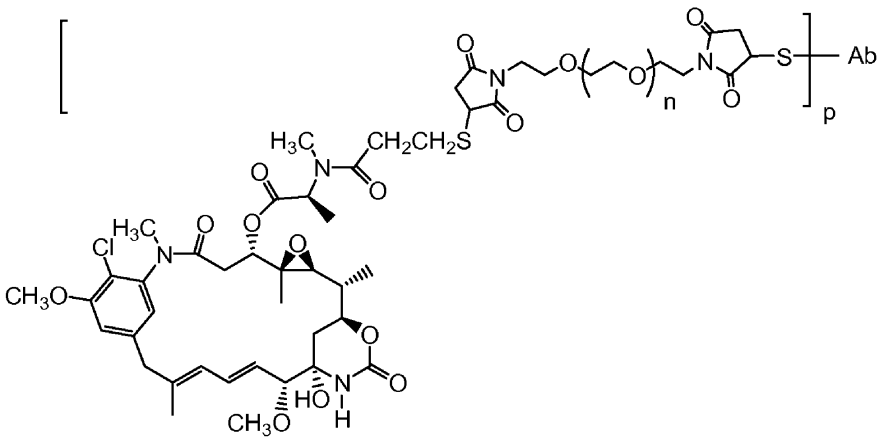
Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

【０２６６】

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。



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。

【０２６７】

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。

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第５２０８０２０号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。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５２０８０２０号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されており、例えばメイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第５２０８０２０号又は欧州特許第０４２５２３５号Ｂ１、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うる。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。

【０２６８】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(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。ある実施態様では、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(ＳＰＤＰ)(Carlsson等, Biochem. J. 173：723-737[1978])である。

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

【０２６９】

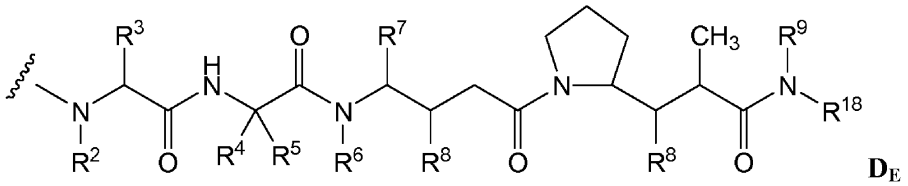
(2) アウリスタチン類及びドラスタチン類

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)。

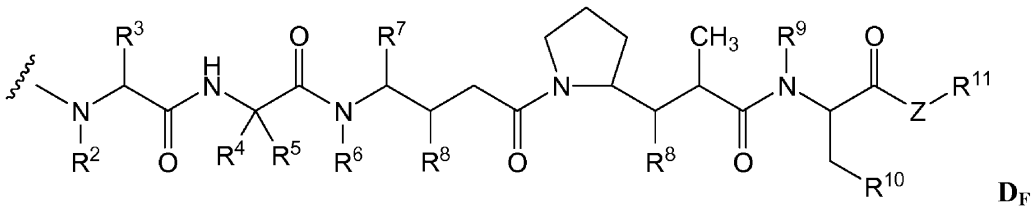
例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分ＤＥ及びＤＦが含まれる(米国公開特許２００５／０２３８６４９、２００４年３月２８日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される)。

【０２７０】

ペプチド性薬剤部分は以下の式D_E及びD_Fから選択されうる。



D_E



D_F

ここで、D_E及びD_F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。

R^2は、H及びC_1－C_8アルキルから選択され、

R^3は、H、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環式化合物、アリール、C_1－C_8アルキル-アリール、C_1－C_8アルキル－(C_3－C_8炭素環式化合物)、C_3－C_8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^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、

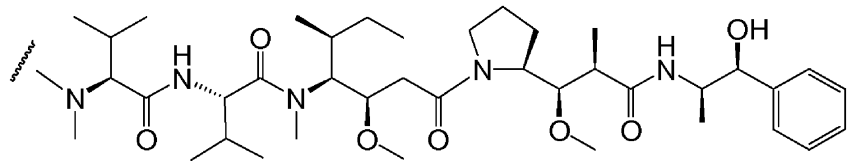
R^5は、H及びメチルから選択され、
又はR^4及びR^5は共同で環状炭素を形成し、R^a及びR^bがH、C_1－C_8アルキル及びC_3－C_8炭素環式化合物からそれぞれ選択される式－$(CR^aR^b)_n$－を有し、ｎは２、３、４、５及び６から選択され、
R^6は、H及びC_1－C_8アルキルから選択され、
R^7は、H、C_1－C_8アルキル、C_3－C_8炭素環式化合物、アリール、C_1－C_8アルキル－アリール、C_1－C_8アルキル－(C_3－C_8炭素環式化合物)、C_3－C_8ヘテロ環及びC_1－C_8アルキル－(C_3－C_8ヘテロ環)から選択され、
各々のR^8は、H、OH、C_1－C_8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、
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－$N(R^{16})_2$、－$(CH2)_n$－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。

【０２７１】

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。
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。
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。

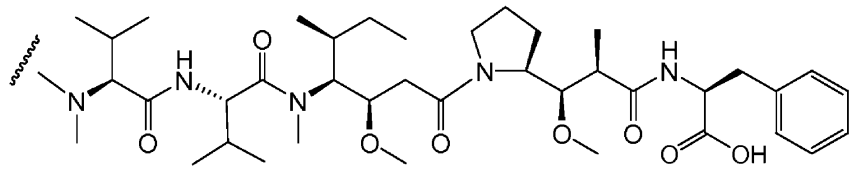
【０２７２】

式D_E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。



MMAE

式D_Fの例示的なアウリスタチンの実施態様はＭＭＡＦ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２００５／０２３８６４９号及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)を参照)。

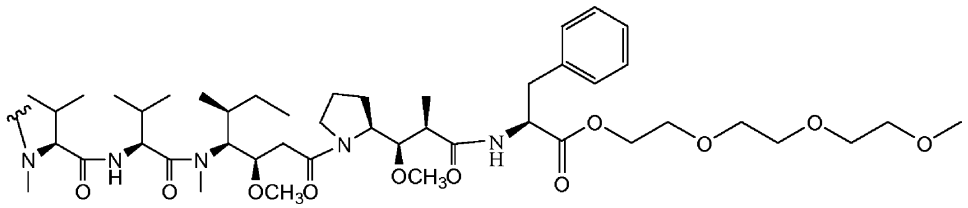


MMAF

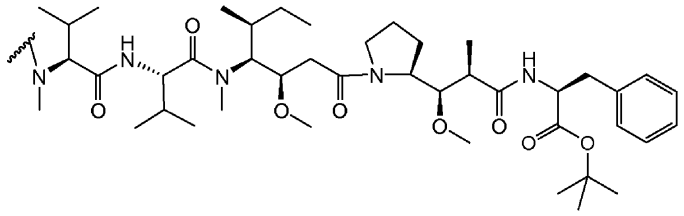
【０２７３】

他の例示的な実施態様には、ペンタ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２００７／００８８４８)及びペンタ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２００７／００８６０３)が含まれる。

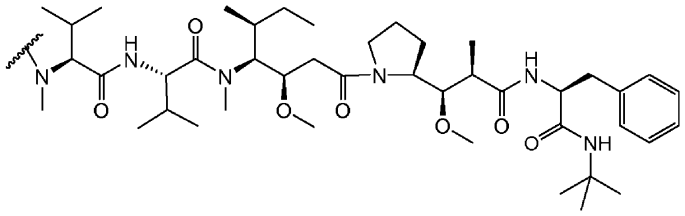
他の薬剤部分には以下のＭＭＡＦ誘導体が含まれる。ここで、波線は抗体－薬剤コンジュゲートのリンカー(Ｌ)への共有結合を示す。



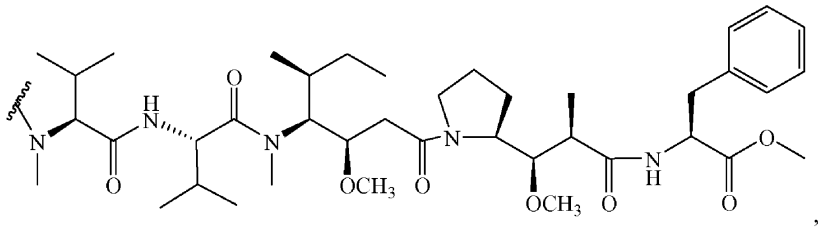
,



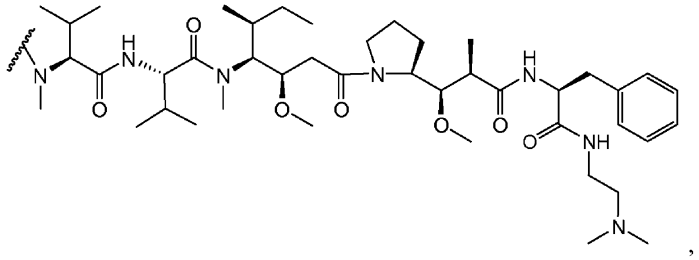
,



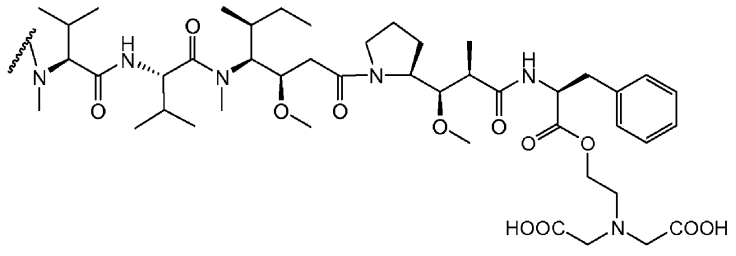
,



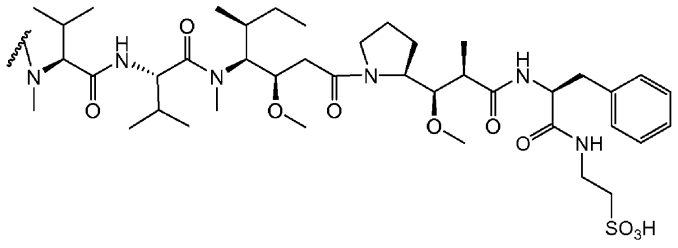
,



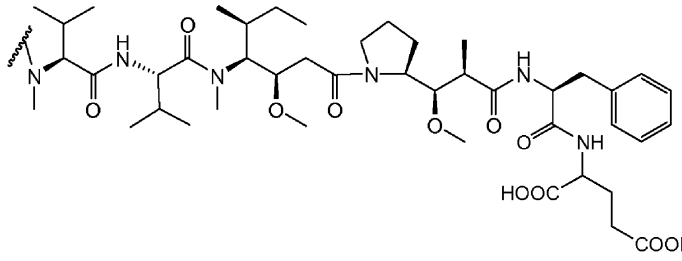
,



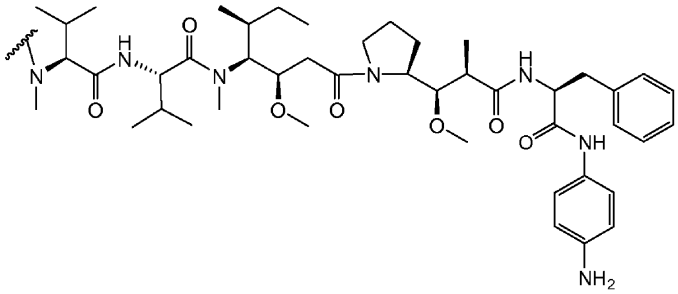
,



,



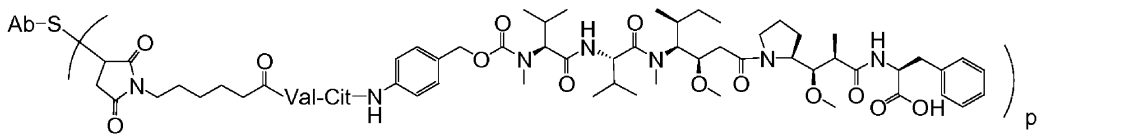
,及び



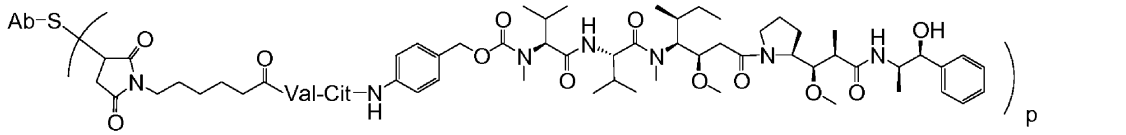
【０２７４】

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。

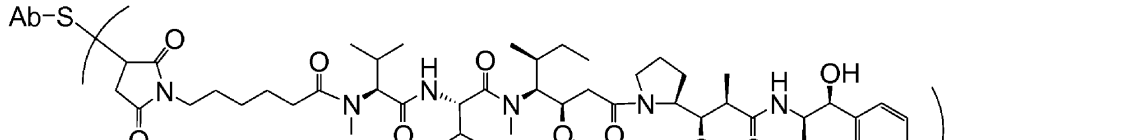
アウリスタチン／ドラスタチン又はその誘導体を含む式IのＡＤＣの例示的な実施態様は、米国特許公開第２００５-０２３８６４９号Ａ１及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されており、これは出典明記によってここに明確に援用される。ＭＭＡＥ又はＭＭＡＦと様々なリンカー成分を含む式IのＡＤＣの例示的な実施態様は、以下の構造及び略記号を有する(ここで、「Ａｂ」は抗体であり、ｐは１～およそ８であり、「Ｖａｌ－Ｃｉｔ」はバリン-シトルリンジペプチドであり、そして「Ｓ」は硫黄原子である。本明細書中の硫黄結合ＡＤＣのある構造説明では、単に硫黄結合の特徴を表し、特定の硫黄原子が複数のリンカー－薬剤成分を有することを表さないために、抗体を「Ａｂ－Ｓ」と表すことを理解するであろう。また、以下の構造の左の括弧は、ＡｂとＳの間の硫黄原子の左に配置されてもよく、本明細書中全体にわたって記載される本発明のＡＤＣの同等の記載である。



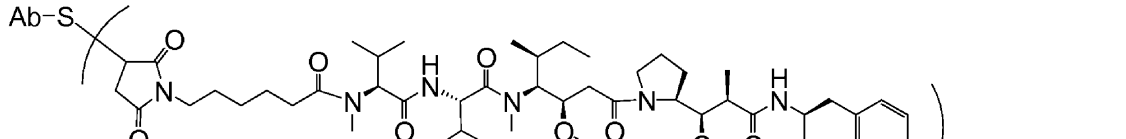
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

【０２７５】

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。

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。

特に、式D_F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。

【０２７６】

(3) カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートした抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖ＤＮＡ破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第５７１２３７４号、同５７１４５８６号、同５７３９１１６号、同５７６７２８５号、同５７７０７０１号、同５７７０７１０号、同５７７３００１号、同５８７７２９６号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-アセチル-γ_1^I、ＰＳＡＧ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ＱＦＡである。カリケアマイシン及びＱＦＡは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【０２７７】

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、ＢＣＮＵ、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ＬＬ-Ｅ３３２８８複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第５８７７２９６号)が含まれる。

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

【０２７８】

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。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及びＬｕの放射性同位体が含まれる。イムノコンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えばtc^{99m}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。

【０２７９】

放射-又は他の標識が、公知の方法でイムノコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-１９を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えばtc^{99m}又はI^{123}、Re^{186}、Re^{188}及びIn^{111}は、ペプチドのシステイン残基を介して結

合可能である。イットリウム-９０はリジン残基を介して結合可能である。ＩＯＤＯＧＥＮ法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80：49-57)は、ヨウ素-１２３の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【０２８０】

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開８１／０１１４５を参照)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。このようなイムノコンジュゲートは抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法(「ＡＤＥＰＴ」)に有用である。抗体にコンジュゲートされうる酵素には、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。

【０２８１】

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。

【０２８２】

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。

【０２８３】

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。

【０２８４】

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。

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。

【０２８５】

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、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが含まれる。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。

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。

【０２８６】

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、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、及びスルホ－ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(スクシンイミジル-(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。

また、抗体と細胞障害性剤のイムノコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-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。

【０２８７】
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。組み換えＤＮＡ分子は、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抗体と細胞障害性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。
【０２８８】
例示的なイムノコンジュゲートー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。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ(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ール、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)。
【０２８９】
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５５６５３３２号；米国特許第５５７３９０５号；米国特許第５５６７６１０号；米国特許第５２２９２７５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。

【０２９０】

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９３／１６１８５号；米国特許第５７１８９４号；米国特許第５５８７４５８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５６４１８７０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。

【０２９１】

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ＣＤ７９ｂ抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設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, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質内の遊離チオールの量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンＭはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンＧは、サブユニットを一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このタンパク質では、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。

【０２９２】
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(Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52；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。

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲアッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能である。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(Å^2)として表されうる。水が占める面積は１．４Å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、タンパク質のヴァンデルワールス表面を転がるので、プローブ球(溶媒分子を表す)の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、各原子の周りの拡がった球上(原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離)に表面ポイントを生成して、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。

【０２９３】
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(Å)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Ｇｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙ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ｘｓａｅ (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)のＳＯＬＶ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ＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)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髄腫細胞(米国特許第５８０７７１５号；米国公開特許第２００５／００４８５７２号；米国公開特許第２００４／０２２９３１０)などの宿主細胞に形質移入して、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。

【０２９４】
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Ｃｙｓ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ＴｈｉｏＦａｂ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(ＣＨＯ)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Ｃｙｓ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Ｃｙｓ残基は、反応性チオール基を全く持っておらず(還元剤で処理されない限り)、求電子性のリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応しない。新規に改変されたＣｙｓ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、ＭＣ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ及びＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦが含まれる。重鎖及び軽鎖の改変したＣｙｓ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ＦＲないしＣＤＲが短くなっているアミノ酸か、又はＦＲないしＣＤＲに挿入を含むアミノ酸を含みうる。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。

【０２９５】
一実施態様では、システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体は、
(a) システインによって親抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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Ｆａｂ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ＣＤ７９ｂ抗体に導入して、システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体を調製する(作製する)方法を提供する。

【０２９６】

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。

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。

【０２９７】

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。

【０２９８】

ｂ．抗ＣＤ７９ｂ　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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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：２２８)及び軽鎖配列(配列番号：２２９)を有する、ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、図２４；(b) 重鎖配列(配列番号：２３０)及び軽鎖配列(配列番号：２３１)を有する、ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、図

２５；(c) 重鎖配列(配列番号：２３２)及び軽鎖配列(配列番号：２３３)を有する、ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、図２６；(d) 重鎖配列(配列番号：２３６)及び軽鎖配列(配列番号：２３７)を有する、ｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、図２８；及び(e) 重鎖配列(配列番号：２４４)及び軽鎖配列(配列番号：２４５)を有する、ｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、図４８であった。

【０２９９】

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：２３４)及び軽鎖配列(配列番号：２３５)を有するｔｈｉｏ－ＭＡ７９ｂ－ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)、図２７及び(b) 重鎖配列(配列番号：２９９)及び軽鎖配列(配列番号：３００)を有するｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)－ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)、図４９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。

【０３００】

一実施態様では、ヒト化ＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２５１－２５９、表２)の一又は複数を含む。

表２：ヒト化ＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	EU 番号	配列番号:
EVQLCESGGG	V5C	V5C		251
LRLSCCASGYT	A23C	A23C		252
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C		253
TLVTVCSASTK	S116C	S112C		254
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C	A118C	255
VSSASCKGPSV	T120C	T116C	T120C	256
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	257
KGFYPCDIAVE	S375C	S371C	S375C	258
PPVLDCDGSFF	S400C	S396C	S400C	259

【０３０１】

一実施態様では、キメラＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２６０－２６８、表３)の一又は複数を含む。

表３：ｃｈＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	EU 番号	配列番号:
EVQLCQSGAE	Q5C	Q5C		260
VKISCCATGYT	K23C	K23C		261
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		262
TSVTVCSASTK	S116C	S112C		263
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSASCKGPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	266
KGFYPCDIAVE	S375C	S371C	S375C	267
PPVLDCDGSFF	S400C	S396C	S400C	268

【０３０２】

一実施態様では、抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２６９－２７７、表４)の一又は複数を含む。

表４：抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	EU 番号	配列番号:
EVQLCESGPG	Q5C	Q5C		269
LSLTCCVTGYS	T23C	T23C		270
LNSVTCEDTAT	S88C	S84C		271
TTLTVCSASTK	S111C	S112C		272
LTVSSCSTKGP	A113C	A114C	A118C	273
VSSASCKGPSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYPCDIAVE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLDCDGSFF	S395C	S396C	S400C	277

【０３０３】

一実施態様では、ヒト化ＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２７８－２８４、表５)の一又は複数を含む。

表５：ヒト化ＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	配列番号:
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	278
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	279
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	280
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	281
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	282
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	283
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	284

【０３０４】

一実施態様では、キメラＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２８５－２９１、表６)の一又は複数を含む。

表６：キメラＭＡ７９ｂシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	配列番号:
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	285
ELKRTCAAPSV	V114C	V110C	286
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	287
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	288
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	289
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	290
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	291

【０３０５】

一実施態様では、抗ｃｙｎｏＣＤ７９(ｃｈ１０Ｄ１０)システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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：２９２－２９８、表７)の一又は複数を含む。

表７：抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体の連続、カバット及びＥＵ番号付けの比較

配列	順次 番号	KABAT 番号	配列番号:
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	292
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	293
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	294
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	295
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	296
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	297
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	298

【０３０６】

ｃ．標識したシステイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体

システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ^{TM}、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(ＮＥＭ)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ＴｈｉｏＦａｂの反応によりビオチン化されたＴｈｉｏＦａｂが生じ、これによって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ＴｈｉｏＦａｂ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ＴｈｉｏＦａｂが生じる。薬剤-リンカー中間生成物とのＴｈｉｏＦａｂの反応により、ＴｈｉｏＦａｂ薬剤コンジュゲートが生じる。

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。

【０３０７】

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。

【０３０８】

ｄ．システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体の使用

システイン改変抗ＣＤ７９ｂ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(ＮＨＬ)、中悪性度ＮＨＬ、再発性中悪性度ＮＨＬ、再発性低悪性度ＮＨＬ、抵抗性ＮＨＬ、抵抗性低悪性度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、線毛細胞白血病(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、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体の使用に関する。

【０３０９】

ｅ．システイン改変抗体薬剤コンジュゲート(Ｔｈｉｏ-抗体薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ))

本発明の他の態様は、システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体(Ａｂ)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、

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

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ＣＤ７９ｂ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。

【０３１０】

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２４－２８及び４８－４９は、アウリスタチン薬剤成分が軽鎖(ＬＣ－ＡＤＣ)又は重鎖(ＨＣ－ＡＤＣ)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ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の実施態様を示す。

システイン改変抗ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲートの考えられる利点には、ＰＫ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。

【０３１１】

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、Jeffamine^{TM})の繰り返しユニットである－$(CR_2)_nO(CR_2)_n$－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): 765-77

3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。

【０３１２】

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－CH_2CH_2O－(「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。

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

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。

【０３１３】

ストレッチャーユニット

ストレッチャユニット(－Ａ－)は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(－Ｗ－)に連結することができる。この点に関しては、抗体(Ａｂ)は、ストレッチャーの官能基と結合することができる官能基を有する。天然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うる。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ＩＩ及び式ＩＩＩ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^{17}は、$(CH_2)_r$、C_3－C_8 カルボシクリル、Ｏ－$(CH_2)_r$、アリーレン、$(CH_2)_r$－アリーレン、－アリーレン－$(CH_2)_r$－、$(CH_2)_r$－(C_3－C_8 カルボシクリル)、(C_3－C_8 カルボシクリル)－$(CH_2)_r$、C_3－C_8 ヘテロシクリル、$(CH_2)_r$－(C_3－C_8 ヘテロシクリル)、－(C_3－C_8 ヘテロシクリル)－$(CH_2)_r$－、－$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_r$－CH_2－、－$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$－$CH_2$－、－$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$－、－$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$－$CH_2$－、及び－$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$－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。

【０３１４】

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。

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。

【０３１５】

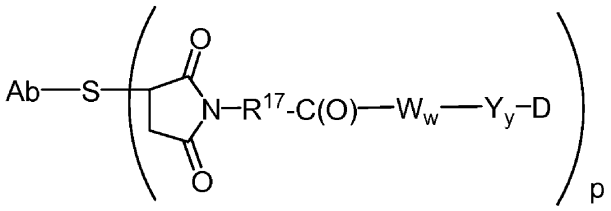
複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス－テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス－テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、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－チアジアジニル、２Ｈ,６Ｈ－１,５,２－ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、４ａＨ－カルバゾリル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、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、例えばビシクロ[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、又はビシクロ[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。

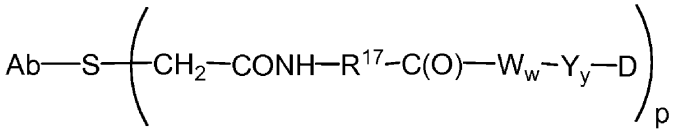
【０３１６】

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＝１～４)ことが理解される。

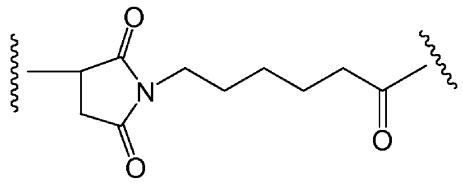


II



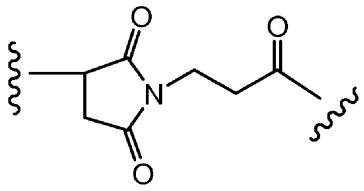
III

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。



MC

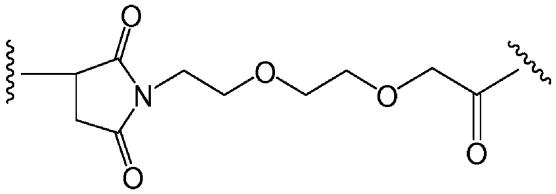
図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が－(ＣＨ$_2$)$_2$－である、マレイミド－プロパノイル(ＭＰ)から得られる。



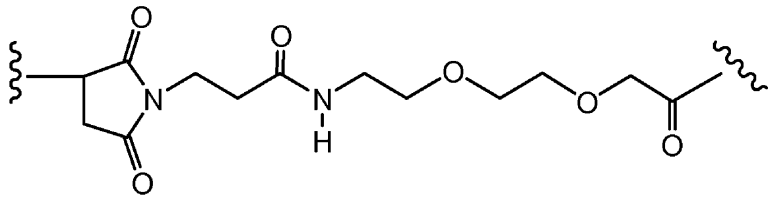
MP

【０３１７】

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$_2$ＣＨ$_2$Ｏ)$_r$－ＣＨ$_2$－であり、ｒが２である。

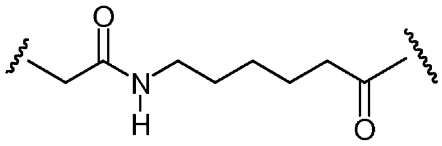


他の図示する式ＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ^{17}が－(ＣＨ$_2$)$_r$Ｃ(Ｏ)ＮＲ^b(ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ)$_r$－ＣＨ$_2$－であり、Ｒ^{b}がＨであり、各々のｒが２である。



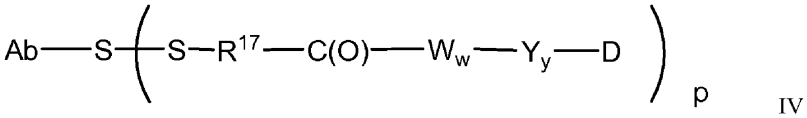
MPEG

図示する式ＩＩＩのストレッチャーユニットは、Ｒ１７が－(ＣＨ$_2$)$_5$－である。



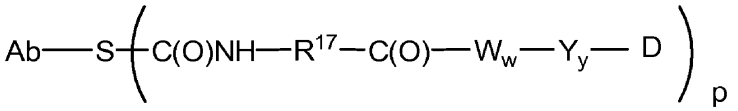
【０３１８】

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ＩＶ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。

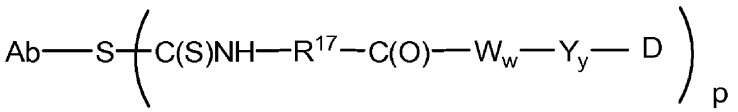


IV

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Ｖａ及びＶｂ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。



Va



Vb

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 & 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うる。

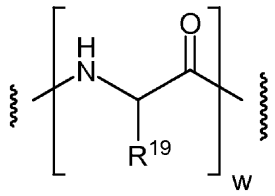
【０３１９】

アミノ酸ユニット

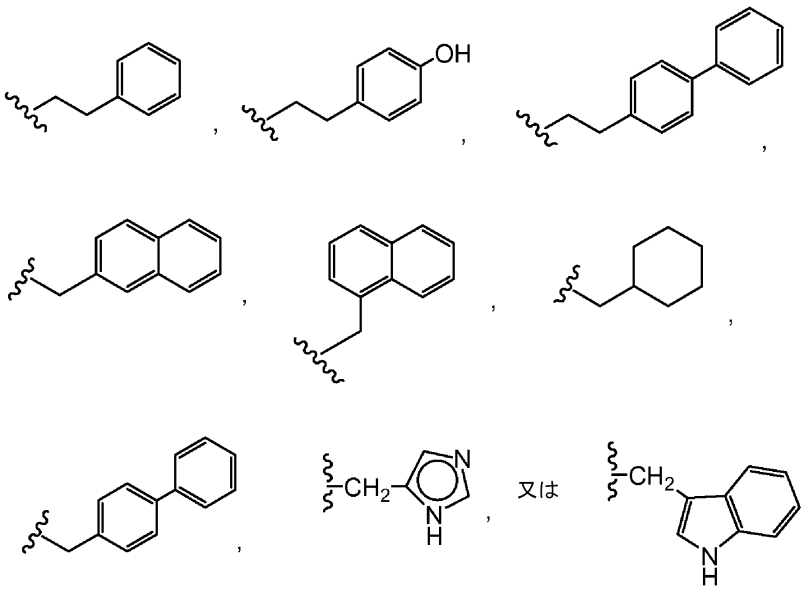
リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット(－Ｗｗ－)は、存在する場合には、抗体(Ａｂ)を本発明のシステイン改変抗体－薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の薬剤成分(Ｄ)に連結する。

－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。



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、－ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＣＨ(ＯＨ)ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＳＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、－(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣ(=ＮＨ)ＮＨ$_2$、－(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨ$_2$、－(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、－(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＨＯ、－(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣ(=ＮＨ)ＮＨ$_2$、－(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨ$_2$、－(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、－(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＨＯ、－(ＣＨ$_2$)$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、－(ＣＨ$_2$)$_4$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ(ＯＨ)ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$、２-ピリジルメチル－、３-ピリジルメチル－、４-ピリジルメチル－、フェニル、シクロヘキシル、



である。

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。

【０３２０】

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(ｖｃ又はｖａｌ－ｃｉｔ)、アラニン－フェニルアラニン(ａｆ又はａｌａ－ｐｈｅ)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(ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ)及びグリシン－グリシン－グリシン(ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ)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。

【０３２１】

スペーサーユニット

スペーサユニット(－Ｙｙ－)は、存在する場合(ｙ＝１又は２)には、アミノ酸ユニットが存在する(ｗ＝１～１２)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、スペ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、スペーサーユニットも薬剤成分を抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、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。非自己犠牲的なスペーサーユニットは、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、スペ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－グリシンスペーサーユニット又はグリシンスペ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$Ab-A_a-W_w-$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。

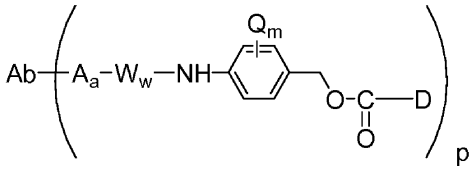
他の実施態様では、－Ｙｙ－は、フェニレン部分がQ_mに置換しているｐ-アミノベンジルカルバモイル(ＰＡＢ)ユニットであり、このときＱは$-C_1-C_8$アルキル、－Ｏ－(C_1-C_8アルキル)、－ハロゲン、－ニトロ、又は－シアノであり、そして、ｍは０～４の範囲の整数である。

【０３２２】

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

一実施態様では、スペ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、自己犠牲的なスペ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。



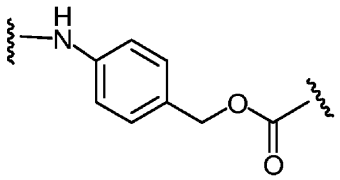
このとき、Ｑは、$-C_1-C_8$アルキル、－Ｏ－(C_1-C_8アルキル)、－ハロゲン、－ニトロ、又は－シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数であり、そして、ｐは１から４の範囲である。

【０３２３】

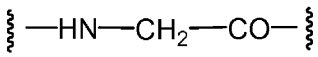
自己犠牲的なスペーサーの他の例には、ＰＡＢグループに電子的に類似している芳香族化合物、例として、２-アミノイミダゾール-５-メタノール誘導体(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、複素環式のＰＡＢ類似体(米国公開特許2005/0256030)、β-グルクロニド(国際公開２００７／０１１９６８)、及びオルトないしはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化されるスペーサー、例として、置換した、及び、置換していない４-アミノ酪酸

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スペーサーの例である。

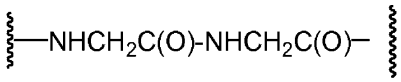
例示的なスペーサーユニット(－Ｙｙ－)を式Ｘ～ＸＩＩに示す。



X



XI



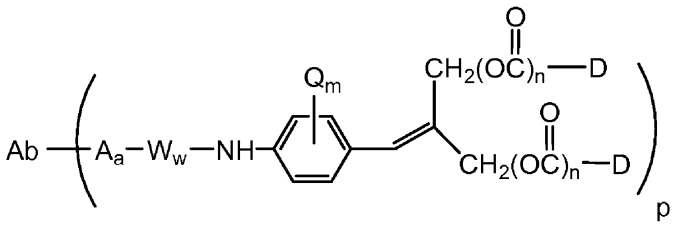
XII

【０３２４】

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、

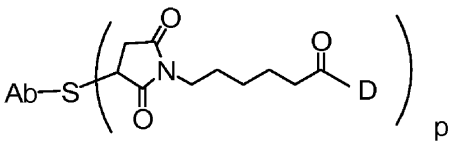


２-(4-アミノベンジリデン)プロパン１，３-ジオールデンドリマーユニットを含み(国際公開２００４／０４３４９３；de Groot等（2003）Angew．Chem．Int．Ed．42：4490-4494)、Ｑは、－Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－(Ｃ$_1$－Ｃ$_8$アルキル)、－ハロゲン、－ニトロ、又は－シアノであり、ｍは０～４の範囲の整数であり、ｎは０又は１であり、そして、ｐは１から４の範囲である。

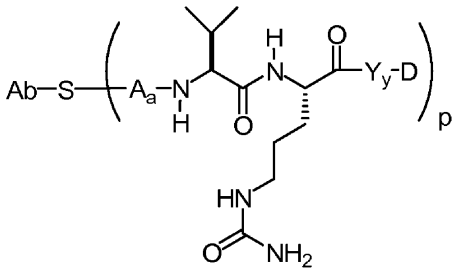
【０３２５】

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ＸＩＩＩｄ(Ｍ

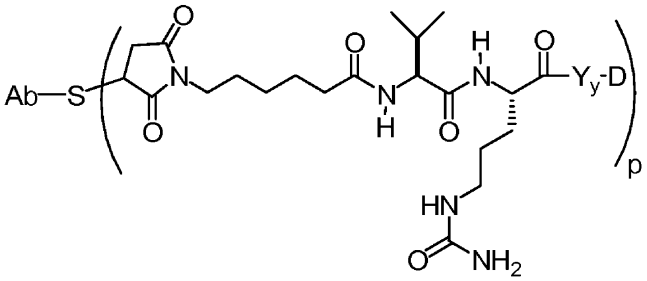
Ｃ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ)が含まれる。



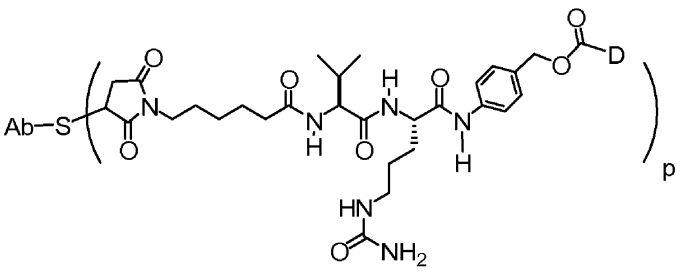
XIIIa



XIIIb



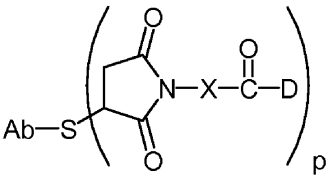
XIIIc



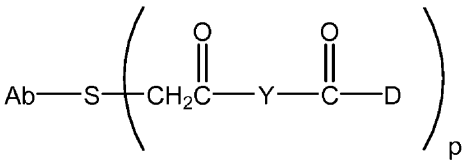
XIIId

【０３２６】

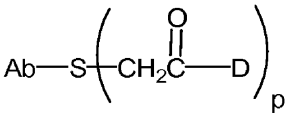
式Ｉａの抗体－薬剤コンジュゲート化合物の他の例示的な実施態様には、ＸＩＶａ－ｅが含まれる。



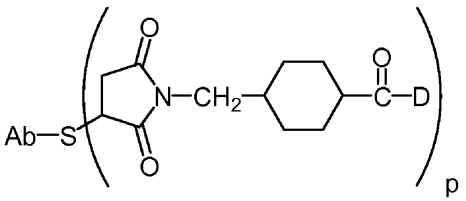
XIVa



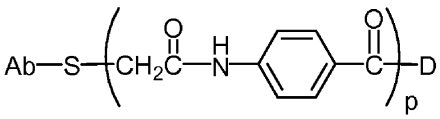
XIVb



XIVc

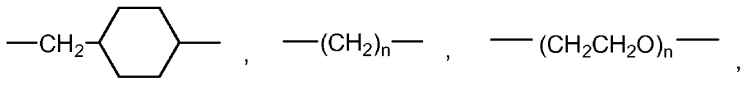


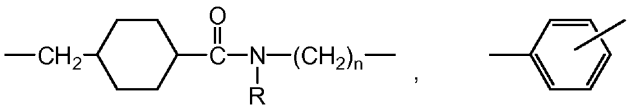
XIVd

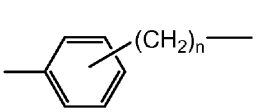


XIVe

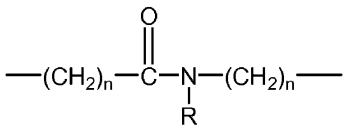
このとき、Ｘは以下のものであり、





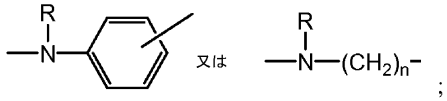


又は



;

Ｙは以下の通りであり、



;

そして、Ｒはそれぞれ Ｈ又はＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、そして、ｎは１～１２である。

【０３２７】

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、スペーサー、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。スペーサー、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うる。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(－ＳＯ$_3^-$)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。

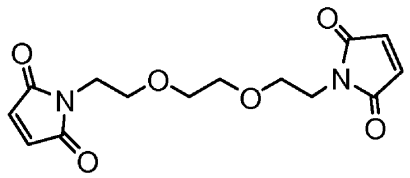
【０３２８】

リンカー試薬

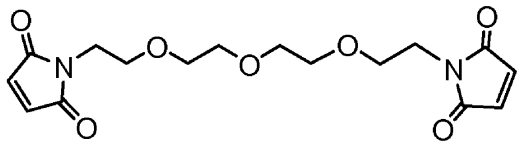
抗体とアウリスタチンとのコンジュゲートは、種々の二官能性リンカー試薬、例えばＮ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオ)プロピオナート(ＳＰＤＰ)、スクシンイミジル-４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシラート(ＳＭＣＣ)、イミノチオラン(ＩＴ)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートＨＣＬ)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-２,６-ジイソシアネート)、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、ＳＩＡＢ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、及びスルホ－ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ(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、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、1,8-ビス-マレイミドジエチレングリコール(ＢＭ(ＰＥＯ)$_2$)、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、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート及びイソチオシアネートが含まれる。



BM(PEO)$_2$



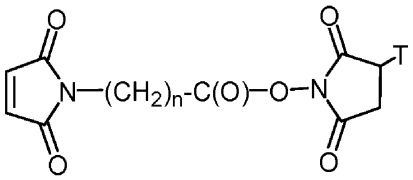
BM(PEO)$_3$

【０３２９】

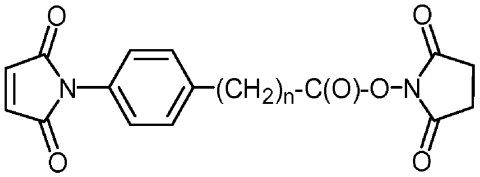
また、有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)などの他の商業的供給源により得ることができるし、Toki等 (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872；Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355；Frisch等 (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186；米国特許第６２１４３４５号；国際公開０２／０８８１７２；米国特許公開２００３１３０１８９；米国特許公開２００３０９６７４３；国際公開０３／０２６５７７；国際公開０３／０４３５８３；及び国際公開０４／０３２８２８に記載の手段に従って合成してもよい。

【０３３０】

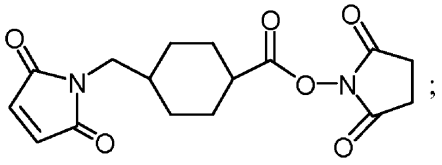
式(ＩＩＩａ)のストレッチャーは、以下のリンカー試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによって、リンカーに導入することができる。

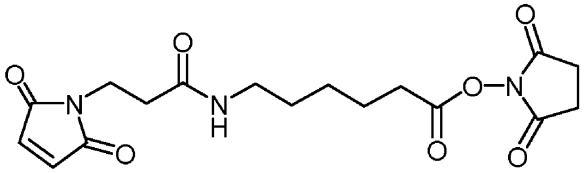


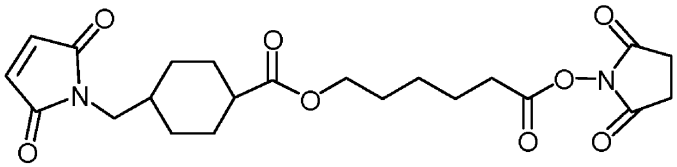
このときｎは１～１０の範囲の整数であり、Ｔは－Ｈ又は－ＳＯ$_3$Ｎａであり、

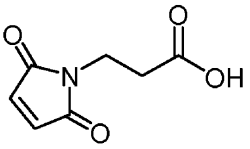


このときｎは０～３の範囲の整数である。

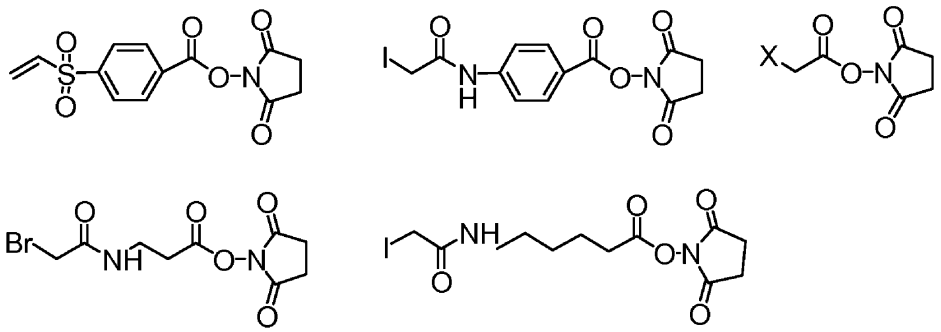

;


;


;及び


.

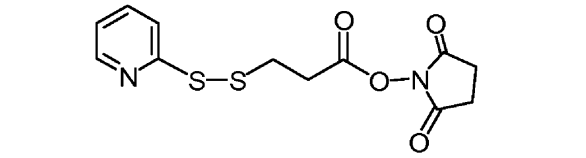
ストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットのＮ末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。

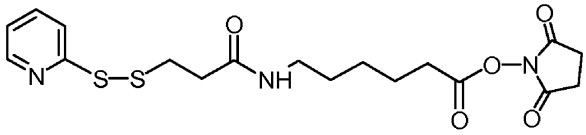


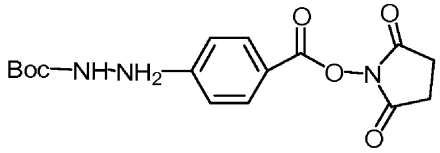
このときＸはＢｒ又はＩである。

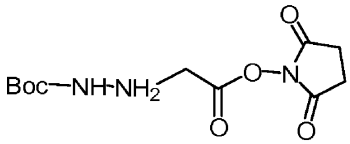
【０３３１】

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。



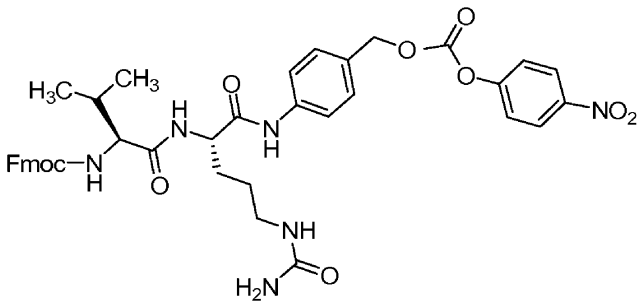




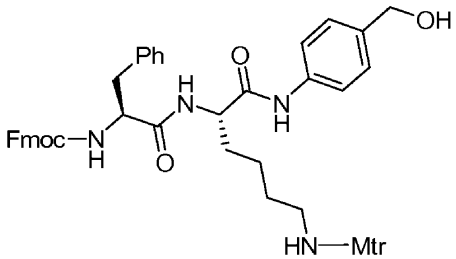


【０３３２】

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



マレイミドストレッチャーユニットとＰＡＢ自己－犠牲的スペーサーユニットとを有する例示的なｐｈｅ－ｌｙｓ(Ｍｔｒ、モノ－4－メトキシトリチル)ジペプチドリンカー試薬は、Dubowchik,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。



【０３３３】

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Ａｂ－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。

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、及び(iv) スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドが含まれる。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。

【０３３４】

システイン改変抗体は、ＤＴＴ(クリーランド試薬、ジチオトレイトール)又はＴＣＥＰ(トリス(２-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド；Getz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(ＴｈｉｏＭａｂ)を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成し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ＴＣＥＰにて３７℃で３時間かけて還元する。還元されたＴｈｉｏＭａｂを希釈して、１０ｍＭ 酢酸ナトリウム、ｐＨ５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($CuSO_4$)、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。

【０３３５】

図２３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２３の例示的なＴｈｉｏＭａｂ(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、ＴＣＥＰなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、ＤＨＡＡ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ＴｈｉｏＭａｂは、－Ｓ－Ｓ－結合形成によって外部からコンジュゲートされた改変ＣｙｓへのＣｙｓ付加物となる。したがって、精製されたＴｈｉｏＭａｂを、実施例５に記載の

還元及び再酸化の手順にて処理して、反応性のＴｈｉｏＭａｂｓを生産する。これらのＴｈｉｏＭａｂ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。

【０３３６】

１０．イムノリポソーム

ここで開示されている抗ＣＤ７９ｂ抗体は、免疫リポソーム(イムノリポソーム)として処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した２層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985)；Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980)；及び米国特許第４４８５０４５号及び同４５４４５４５号；及び１９９７年１０月２３日に公開の国際公開９７／３８７３１に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第５０１３５５６号に開示されている。

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

【０３３７】

Ｂ．抗体製造方法

１．所望の性質を有する抗ＣＤ７９ｂ抗体のスクリーニング

ＣＤ７９ｂポリペプチドに結合する抗体を生成する技術を、上記に記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体をさらに選択することができる。

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体の増殖阻害効果を、例えば、内因的又はＣＤ７９ｂ遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びＣＤ７９ｂ形質移入細胞は、数日間(例えば、２－７日)、種々の濃度の本発明の抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体で処理し、クリスタル・バイオレット又はＭＴＴで染色するか、又は他の何らかの比色アッセイによって分析することができる。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体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、ＤＮＡへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、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、ＣＤ７９ｂポリペプチドを過剰発現するものである。抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ある実施態様では約０．５から３０μｇ／ｍｌの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約２５－１００％、より好ましくは約３０－１００％、そしてさらにより好ましくは約５０－１００％又は７０－１００％のＣＤ７９ｂ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。増殖阻害は、細胞培養で、約０．５から３０μｇ／ｍｌ又は０．５ｎＭから２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、その増殖阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後１－１０日で確かめられる。約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ体重での抗ＣＤ７９ｂ抗体の投与が、抗体の最初の投与から約５日から３ヶ月、好ましくは約５から３０日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで増殖阻害作用がある。

【０３３８】

細胞死を誘発する抗ＣＤ７９ｂ抗体を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム(Ｐ

Ｉ)、トリパンブルー又は７ＡＡＤの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。ＰＩ取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体(例えば約１０μｇ／ｍｌ)を含有する培地でインキュベートする。細胞を３日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために３５ｍｍのストレーナキャップ付き１２×７５チューブ(チューブ当たり１ｍｌ、処理グループ当り３チューブ)に等分する。次いで、チューブへＰＩ(１０μｇ／ｍｌ)を与える。サンプルをＦＡＣＳＣＡＮ(登録商標)フローサイトメータとＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウエア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。このようにして、ＰＩ取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗ＣＤ７９ｂ抗体を細胞死誘導抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂポリペプチド上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 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ＣＤ７９ｂ抗体のように、試験抗体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、ＣＤ７９ｂポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群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。

【０３３９】

２．ある一つのライブラリスクリーニング法

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、所望の活性(一又は複数)を有する抗体についてスクリーニングするためにコンビナトリアルライブラリを用いて作製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成して、所望の結合特性を有する抗体についてこのライブラリをスクリーニングするためには当分野で様々な方法が公知である。このような方法は、一般にMethods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等, ed., Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom等 (2001)に、ある実施態様では、Lee等 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093に記載される。

原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Ｆｖ)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収／溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのＦｖ配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Ｆｃ)配列を用いての全長抗ＣＤ７９ｂ抗体クローンの構築によって得ることができる。

【０３４０】

ある実施態様では、抗体の抗原結合ドメインは、約１１０アミノ酸の２つの可変(Ｖ)領域である軽(ＶＬ)及び重(ＶＨ)鎖で形成され、その双方には、３つの高頻度可変ループ(ＨＶＲ)又は相補鎖決定領域(ＣＤＲ)が存在する。可変ドメインは、Winter等, Ann. Rev.

Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように、ＶＨ及びＶＬが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Ｆｖ(ｓｃＦｖ)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているＦａｂ断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、ｓｃＦｖコード化ファージクローン、及びＦａｂコード化ファージクローンは、総称して「ＦｖファージクローンJ又は「ＦｖクローンJと呼ぶ。

ＶＨ及びＶＬ遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(ＰＣＲ)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するＰＣＲプライマーを利用して高度可変ＣＤＲ３領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

【０３４１】

ある実施態様では、繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質ｐＩＩＩへの融合によって、抗体断片を表示するために用いられる。この抗体断片は、例えばMarks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のように、フレキシブルポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上にＶＨ及びＶＬドメインが連結されている一本鎖Ｆｖ断片として、又は、例えばHoogenboom等, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のように、１つの鎖はｐＩＩＩと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるＦａｂコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるＦａｂ断片として、表示されることが可能である。

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗ＣＤ７９ｂクローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合には、検体をＣＤ７９ｂで免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び／又は他の末梢血リンパ球(ＰＢＬ)である循環Ｂ細胞を、ライブラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、ＣＤ７９ｂ免疫化により、ＣＤ７９ｂに対するヒト抗体を産生するＢ細胞が生じるように、抗ＣＤ７９ｂクローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗ＣＤ７９ｂ抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【０３４２】

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

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び／又はＢ細胞又は他のＰＢＬの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、ＣＤ７９ｂが免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

【０３４３】

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

【０３４４】

合成的に再配列したＶ遺伝子のレパートリーは、Ｖ遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトＶＨ遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等，J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら，Nature Genet.，3: 88-94(1993))；これらクローニングされたセグメント(Ｈ１及びＨ２ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのＨ３ループをコードするＰＣＲプライマーによる多様なＶＨ遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。ＶＨレパートリーは、また、Barbas等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いＨ３ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトＶκ及びＶλセグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter， Eur. J. Immunol.，23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。ＶＨ及びＶＬフォールドの範囲及びＬ３及びＨ３の長さに基づく合成的Ｖ遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。ＤＮＡをコードするＶ遺伝子の増幅に続いて、生殖系のＶ遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

【０３４５】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でＶＨ及びＶＬ遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHografe等，Gene，128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等，Nucl. Acids Res.，21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のＦａｂフラグメントが利用される。ナイーブのＶＨ及びＶＬレパートリーは、１つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この２つのライブラリは、その後、各細胞が異な

る組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約10^{12}クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、ＶＨ及びＶＬ遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約10^{-8}ＭのＫ$_d^{-1}$)の多くの多様な抗体を提供する。

別法として、このレパートリーは、例えばBarbas等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clakson等，Nature，352: 624-628(1991)に記載のようにＰＣＲ後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。ＰＣＲアセンブリは、また、柔軟なペプチドスペーサーをコードしているＤＮＡとＶＨ及びＶＬ ＤＮＡを連結させて、単鎖のＦｖ(ｓｃＦｖ)レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内でのＰＣＲアセンブリ」は、Embleton等，Nucl. Acids Res.，20: 3831-3837(1992)に記載のように、ＰＣＲによってリンパ球内のＶＨ及びＶＬ遺伝子を組み合わせて、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

【０３４６】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約10^{6}～$10^{7}$$M^{-1}$のＫ$_d^{-1}$)である可能性があるが、Winterら(1994)，上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等，J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGram等，Proc. Natl. Acad. Sci USA，89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローンポリメラーゼ(Leung等，Technique，1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、１つ又はそれより多いＣＤＲをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のＦｖクローンにおいて、対象のＣＤＲまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるＰＣＲを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第９６０７７５４号(１９９６年３月１４日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等，Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するＶドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたＶＨ又はＶＬドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、10^{-9}Ｍの範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

ライブラリのスクリーニングは当分野で公知の様々な技術によって達成されうる。例えば、ＣＤ７９ｂは、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の方法において利用することが可能である。

【０３４７】

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

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bass等，Proteins，8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarks等，Biotechnol.，10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【０３４８】

親和性に僅かな違いがあったとしても、ＣＤ７９ｂに対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かだがより高い親和性である。ＣＤ７９ｂを限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異を保持するために、ファージは、過度のビオチン化ＣＤ７９ｂとインキュベートすることが可能であるが、ＣＤ７９ｂに対する標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化ＣＤ７９ｂとインキュベートできる。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに２倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

抗ＣＤ７９ｂクローンは活性を元に選択されうる。ある実施態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂを天然に発現する生細胞に結合する抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。一実施態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂリガンドとＣＤ７９ｂとの結合をブロックするが、ＣＤ７９ｂリガンドと第二タンパク質との結合をブロックしない抗ＣＤ７９ｂ抗体を提供する。このような抗ＣＤ７９ｂ抗体に対応するＦｖクローンは、(1) 上記のようなファージライブラリから抗ＣＤ７９ｂクローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれぞれについてＣＤ７９ｂと第二タンパク質を選択する、(3) 固定されたＣＤ７９ｂに抗ＣＤ７９ｂファージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップするＣＤ７９ｂ-結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する、そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって選別できる。場合によって、所望のブロック／非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。

【０３４９】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡ又は本発明のファージディスプレイＦｖクローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージＤＮＡ鋳型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、ＤＮＡを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするＤＮＡの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等，Curr. Opinion in Immunol.，5:256-262(1993)及びPluckthun，Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖及び／又は軽鎖定常領域をコードす

る公知のＤＮＡ配列(例えば好適なＤＮＡ配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び／又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えばＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＥ定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の可変ドメインＤＮＡから得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域ＤＮＡに融合したＦｖクローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある実施態様では、ヒト可変ＤＮＡから得たＦｖクローンをヒト定常領域ＤＮＡに融合して、完全長ないし一部のヒト重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成する。

【０３５０】

また、ハイブリドーマ由来の抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えばMorrison等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又はＦｖクローン由来の抗体ないし抗体断片をコードするＤＮＡは、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明のＦｖクローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

【０３５１】

Ｃ．抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ＡＤＥＰＴ)

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、ＡＤＥＰＴ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。

ＡＤＥＰＴ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。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ＣＤ７９ｂ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ＤＮＡ技術を使用して作成することができる(Neuberger等, Nature 312:604-608[1984])。

【０３５２】
Ｄ．抗ＣＤ７９ｂ抗体
ここに記載した抗ＣＤ７９ｂ抗体に加えて、抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体も調製できると考えられる。抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体は、コード化ＤＮＡ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ＣＤ７９ｂ抗体の翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。
ここに記載した抗ＣＤ７９ｂ抗体の変異は、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ＣＤ７９ｂ抗体の一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとすることができる。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、完全長又は成熟した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。
【０３５３】
抗ＣＤ７９ｂ抗体断片がここに提供される。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ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体断片は、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ＣＤ７９ｂ抗体断片は、ここで開示される天然の抗ＣＤ７９ｂ抗体と少なくとも１つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。
特定の実施形態では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表８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８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、所望の変異体を同定するために生成物がスクリーニングされる。
【０３５４】
表８

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; 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

【０３５５】

抗ＣＤ７９ｂ抗体の機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(ａ)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(ｂ)標的部位の電荷又は分子疎水性、又は(ｃ)側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。共通の側鎖特性に基づいて天然に発生する残基をグループ分けすることができる：

(１)疎水性： ノルロイシン、Met，Ala，Val，Leu，Ile;

(２)中性親水性： Cys，Ser，Thr，

(３)酸性： Asp，Glu;

(４)塩基性： Asn，Gln，His，Lys，Arg;

(５)鎖の方向に影響する残基： Gly，Pro;

(６)芳香性： Trp，Tyr，Phe

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

【０３５６】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びＰＣＲ突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発［Carter等，Nucl. Acids Res.，13: 4331 (1986); Zoller等，Nucl. Acids Res.，10: 6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等，Gene，34: 315 (1985)］、制限的選択突然変異誘発［Wells等，Philos. Trans. R. Soc. London SerA，317: 415 (1986)］又は他の知られた技術をクローニングしたＤＮＡに実施して、抗ＣＤ７９ｂ抗体変異体ＤＮＡを製造することもできる。

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

イソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。
抗ＣＤ７９ｂ抗体の適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化的安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗ＣＤ７９ｂ抗体にシステイン結合(複数でも)を加えて、その安定性を向上させてもよい(特に抗体がＦｖ断片のような抗体断片である場合)。
【０３５７】
特に好ましい種類の置換変異体は、親抗体の一又は複数の高頻度可変領域残基(例えば、ヒト化又はヒト抗体)の置換を含む。一般に、さらなる開発のために選択される結果として得られる変異体の生物学的特性は、それらが生成された親抗体の同特性より改善されている。そのような置換変異体を生成するための便利な方法には、ファージディスプレイを用いた親和性成熟化が含まれる。簡単には、複数の高頻度可変領域部位(例えば、６～７部位)を成熟させて、各部位に全ての可能なアミノ置換基を生成する。このように生成された抗体変異体は、各粒子内にパッケージされたＭ１３の遺伝子３生成物への融合物として、繊維状ファージ粒子由来の一価様式で表示される。次に、ファージディスプレイされた変異体を、ここに開示されるようにそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を実行し、抗原結合に有意に寄与している高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又は付加的に、抗原－抗体複合体の結晶構造を分析することにより、抗体とＣＤ７９ｂポリペプチドとの接点を同定することが有利な場合がある。そのような接触残基及び隣接残基は、本明細書で考慮される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、ここに記載のように変異体のパネルをスクリーニングし、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を有していた抗体を更なる開発用に選択することができる。
抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、本技術分野で既知の様々な方法によって調製することができる。これらの方法には、限定されないが、天然源からの単離(天然発生アミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、及び早期に調製された変異体又は抗ＣＤ７９ｂ抗体の非変異体バージョンのカセット変異導入が含まれる。
【０３５８】
Ｅ．抗ＣＤ７９ｂ抗体の修飾
抗ＣＤ７９ｂ抗体の共有結合的修飾は本発明の範囲に含まれる。共有結合的修飾の一型には、標的とする抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ酸残基を、抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体を、抗ＣＤ７９ｂ抗体の精製方法に用いるための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、グルタミニル及びアスパラギニル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。
本発明の範囲内に包含される抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体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。

【０３５９】

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。

グリコシル化部位の抗ＣＤ７９ｂ抗体への付加は、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、元の抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体アミノ酸配列は、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ＣＤ７９ｂ抗体をコードする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。

【０３６０】

抗ＣＤ７９ｂ抗体上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、１９８７年９月１１日に発行された国際公開８７／０５３３０、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体の共有結合的修飾の他の型は、抗体を、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を含む。また、抗体は、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、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルションで捕捉されてもよい。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ＣＤ７９ｂ抗体は、他の異種性ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した抗ＣＤ７９ｂ抗体を含むキメラ分子を形成する方法で修飾されてもよい。

【０３６１】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の、抗タグ抗体が選択的

に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗ＣＤ７９ｂ抗体のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。抗ＣＤ７９ｂ抗体のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ－ヒスチジン(ポリ-His)又はポリ－ヒスチジン－グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Field等，Mol．Cell．Biol．，8:2159-2165（1988）］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等，Molecular and Cellular Biology，5:3610-3616（1985）］；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ(gD)タグ及びその抗体［Paborsky等，Protein Engineering，3(6):547-553（1990）］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等，BioTechnology，6:1204-1210（1988）］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等，Science，255:192-194（1992）］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等，J．Biol．Chem．，266:15163-15166（1991）］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等，Proc．Natl．Acad．Sci．USA，87:6393-6397（1990）］を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体の可溶化(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、CH_2及びCH_3、又はヒンジ、CH_1、CH_2及びCH_3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、１９９５年６月２７日発行の米国特許第５４２８１３０号を参照のこと。

【０３６２】

Ｆ．抗ＣＤ７９ｂ抗体の調製

以下の説明は、主として、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード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ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体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(フォスターシティー，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ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体を製造してもよい。

【０３６３】

１．抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡの単離

抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡは、抗ＣＤ７９ｂ抗体のｍＲＮＡを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから得ることができる。したがって、ヒト抗ＣＤ７９ｂ抗体ＤＮＡは、ヒトの組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから簡便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又は公知の合成方法(例えば、自動核酸合成)により得てもよい。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(少なくとも約２０-８０塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるｃＤＮＡ又はゲノムライブ

ラリ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ＣＤ７９ｂ抗体をコードする遺伝子を単離するための代替法はＰＣＲ法を用いることである。［Sambrook等,上掲；Dieffenbach等, PCR Primer：A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)］。

【０３６４】

ｃＤＮＡライブラリ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内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、^{32}Ｐ標識ＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら, に示されている。

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

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

【０３６５】

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ＣＤ７９ｂ抗体製造のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler編 (IRL Press, 1991)及び上掲のSambrook等に見出すことができる。

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はＤＮＡが染色体外成分として又は染色体成分によって複製されるような宿主内へのＤＮＡの導入を意味し、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯ及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315(1983)及び１９８９年６月２９日公開の国際公開８９／０５８５９に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第４３９９２１６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。

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。

【０３６６】

ａ．原核生物宿主細胞

適切な原核生物には、限定するものではないが、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株MM２９４(ＡＴＣＣ３１４４６)；大腸菌Ｘ１７７６(ＡＴＣＣ３１５３７)；大腸菌株Ｗ３１１０(ＡＴＣＣ２７３２５)及びＫ５７７２(ＡＴＣＣ５３６３５)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌(E. coli)、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス(Serratia marcescans) 、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・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、根粒菌、ビトレオシラ、パラコッカス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(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325)は、組換えＤＮＡ生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５ (ａｒｇＦ－ｌａｃ)１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７(ＡＴＣＣ ５５，２４４)；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５ (ａｒｇＦ-ｌａｃ)１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｒｂｓ７ ｉｌｖＧ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；遺伝子型Ｗ３１１０ ΔｆｈｕＡ (ΔｔｏｎＡ) ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ΔｏｍｐＴΔ(ｎｍｐｃ-ｆｅｐＥ) ｄｅｇＰ４１ ｋａｎ^{R}を有する大腸菌Ｗ３１１０株 ３３Ｄ３(米国特許第５６３９６３５号)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。また、大腸菌２９４(ＡＴＣＣ ３１,４４６)、大腸菌Ｂ、大腸菌１７７６ (ＡＴＣＣ ３１,５３７)、及び大腸菌ＲＶ３０８(ＡＴＣＣ ３１,６０８)などの他の株及びその誘導体も適する。これらの例は、限定するものではなく例示的なものである。特定の遺伝子型を有する上記のいずれかの細菌の誘導体の構築方法は、当分野で公知であり、例えばBass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製能を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７又はｐＫＮ４１０などの周知のプラスミドがレプリコンを供給するために用いられる場合、例えば、大腸菌、セラチア又はサルモネラ種は宿主として好適に用いられうる。一般的に、宿主細胞は微量のタンパク質分解酵素を分泌し、更なるプロテアーゼインヒビターが細胞培養物に含まれるのが望ましい。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。

【０３６７】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、特にグリコシル化及びＦｃエフェクター機能が不要であるとき、例えば治療的抗体が細胞障害性剤(例えば毒素)にコンジュゲートしており、イムノコンジュゲート自体が腫瘍細胞の破壊に効果を示すときは、細菌

中で生成することができる。完全長抗体は循環においてさらに長い半減期を有する。大腸菌中の生成は、短時間で行うことができ、費用効率が高い。細菌中における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４６４８２３７号(Carter等)、同第５７８９１９９号(Joly等)、及び発現と分泌を最適化するための翻訳開始領域(ＴＩＲ)シグナル配列について記載した同第５８４０５２３号(Simmons等)を参照されたい。これらの特許文献はここで参照することにより本発明に包含される。発現の後、抗体は、可溶性の画分中の大腸菌細胞のペーストから単離され、例えばアイソタイプに応じたプロテインＡ又はＧカラムにより精製することができる。最終的な精製は、例えばＣＨＯ細胞に発現された抗体を精製するプロセスと同様に実行することができる。

【０３６８】

ｂ．真核生物宿主細胞

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ＣＤ７９ｂ抗体コードベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)(Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; １９８５年５月２日公開の欧州特許第１３９３８３号)；クリュイベロミセス宿主(Kluyveromyces hosts)(米国特許第４９４３５２９号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセスラクチス(K. lactis)(MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリス(K. fragilis)(ＡＴＣＣ１２４２４)、クリュイベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)(ＡＴＣＣ１６０４５)、クリュイベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii)(ＡＴＣＣ２４１７８)、クリュイベロミセス・ワルチイ(K. waltii)(ＡＴＣＣ５６５００)、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilarum)(ＡＴＣＣ３６９０６； Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクリュイベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(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、ニューロスポラ、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。

【０３６９】

グリコシル化抗ＣＤ７９ｂ抗体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ァ・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。

しかしながら、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，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１)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，ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０)；チヤイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ(ＣＨＯ，Urlaub等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216 (1980));マウスセルトリ細胞(ＴＭ４，Mather,Biol.Reprod.,23：243-251 (1980))；サル腎細胞(ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０)；アフリカミドリザル腎細胞(ＶＥＲＯ－７６，ＡＴＣＣ ＣＲＬ-１５８７)；ヒト頚管腫瘍細胞(ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ２)；イヌ腎細胞(ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ３４)；バッファローラット肝細胞(ＢＲＬ ３Ａ，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２)；ヒト肺細胞(Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５)；ヒト肝細胞(Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ ８０６５)；マウス乳房腫瘍細胞(ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１)；ＴＲＩ細胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 (1982))；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；及びヒト肝臓癌細胞(ＨｅｐＧ２)である。

宿主細胞は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の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。

【０３７０】

３．複製可能なベクターの選択及び使用

本発明の抗体の組み換え製造のために、コードする核酸(例えばｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ)は単離され、更なるクローニング(ＤＮＡの複製)又は発現のために複製可能なベクターに挿入される。抗体をコードするＤＮＡは従来の手順を用いて(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)容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は用いる宿主細胞にいくらか依存する。一般に、好適な宿主細胞は、原核生物又は真核生物(一般に哺乳動物)のものである。

ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、ＤＮＡはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ＣＤ７９ｂは直接的に組換え手法によって生成されるだけではなく、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ＣＤ７９ｂ抗体コードＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクリュイベロミセス(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・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(１９９０年４月４日発行の欧州特許第３６２１７９号)、又は１９９０年１１月１５日に公開された国際公開９０／１３６４６に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直

接分泌に使用してもよい。

【０３７１】

ａ．原核生物の宿主細胞

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

【０３７２】

通常、宿主細胞と互換性を持つ種から得られるコントロール配列とレプリコンを含有するプラスミドベクターがこれらの宿主と関連して用いられる。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内でベクターを複製させる核酸配列、並びに形質転換した細胞の表現型による選別が可能となるようなマーキング配列を含む。このような配列は、様々な細菌、酵母及びウイルスについて周知である。プラスミドｐＢＲ３２２に由来する複製開始点は、アンピシリン(Ａｍｐ)及びテトラサイクリン(Ｔｅｔ)耐性をコードする遺伝子を有するために形質転換された細胞の識別を容易にし、大部分のグラム陰性細菌に好適であり、２μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ又はＢＰＶ)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。また、ｐＢＲ３２２、その誘導体又は他の微生物プラスミドないしはバクテリオファージは、内在性タンパク質の発現のために微生物によって用いられうるプロモーターを含むか、含むように変更されていてもよい。特定の抗体の発現に用いられるｐＢＲ３２２誘導体の例は、Carter et al.の米国特許第５６４８２３７号に詳細に記載されている。

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

【０３７３】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする２又はそれ以上のプロモーターシストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(５')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源ＤＮＡからプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び／又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【０３７４】

様々な宿主となりうる細胞に認識されるプロモーターは周知である。原核生物の宿主に

よる使用に適切なプロモーターには、ＰｈｏＡプロモーター、β-ガラクタマーゼ、及びラクトースプロモーターシステム[Chang et al., Nature, 275:615 (1978)；Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(ｔｒｐ)プロモーターシステム[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)；欧州特許第３６７７６号]、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃ[deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]又はｔｒｃプロモーターが含まれる。また、細菌システムでの使用のためのプロモーターは、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡに操作可能に連結されたシャイン－ダルガーノ(Ｓ.Ｄ.)配列を含むであろう。しかしながら、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)。

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

【０３７５】

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

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

【０３７６】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等の米国特許第５８４０５２３号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(ＴＩＲ)の変異体を利用する。任意のＴＩＲについて、一連のアミノ酸又は核酸配列の変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作製することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。ヌクレオチド配列においてサイレント変化が好ましいが、ＴＩＲ変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。ＴＩＲにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの３番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、１番目及び２番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Metho

ds in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。
好ましくは、含有される各シストロンについて一定の範囲のＴＩＲ強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のＴＩＲ強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。ＴＩＲ強度は、Simmons等による米国特許第５８４０５２３号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づいて、所望の個々のＴＩＲを選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。
【０３７７】
ｂ．真核生物宿主細胞
一般的に、ベクター成分には、シグナル配列、複製起点、一以上のマーカー遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子の一又は複数を含むがこれらに限定するものではない。
【０３７８】
(1) シグナル配列成分
真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでいてもよい。選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものが好ましい。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスｇＤシグナルが利用できる。
このような前駆体領域のＤＮＡは、多価抗体をコードするＤＮＡに読み取り枠を一致させて結合される。
【０３７９】
(2) 複製開始点
一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、ＳＶ４０開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。
【０３８０】
(3) 選択遺伝子成分
典型的に、発現及びクローニングベクターは、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含であろう。典型的な選択遺伝子は、(ａ)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(ｂ)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(ｃ)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質、例えば桿菌のためのＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子、をコードする。
選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。
【０３８１】
哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例は、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばＤＨＦＲ又はチミジンキナーゼ、メタロチオネインＩ及びＩＩ、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。野生型ＤＨＦＲが使用される適切な宿主細胞は、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されるように、調製され、増殖される、ＤＨＦＲ活性を欠損しているＣＨＯ細胞株である(例えばＡＴＣＣ ＣＲＬ-９０９６)。例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、ＤＨＦＲの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Ｍｔｘ)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。あるいは、抗体をコードするＤＮＡ配列、野生型ＤＨＦＲタンパク質、及びアミノグリコシド３'-ホスホトランスフェラーゼ(ＡＰＨ)のような他の選択マーカーで形質転換あるいは同時形質転

換した宿主細胞(特に、内在性ＤＨＦＲを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはＧ４１８のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第４９６５１９９号を参照のこと。

酵母に用いられる適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である[Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)；Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)；Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]。ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファン中での生育能を欠く酵母の変異株、例えばＡＴＣＣ番号４４０７６又はＰＥＰ４-１の選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【０３８２】

(4) プロモーター成分

通常、発現及びクローニングベクターは、ｍＲＮＡ合成を促すために抗ＣＤ７９ｂ抗体コード核酸配列に作用可能に連結されるプロモーターを含む。様々な宿主となりうる細胞によって認識されるプロモーターは周知である。

実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ２５から３０塩基上流に見出されるＡＴリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から７０から８０塩基上流に見出される他の配列は、Ｎが任意のヌクレオチドであるＣＮＣＡＡＴ領域である。大部分の真核生物遺伝子の３'末端には、コード配列の３'末端へのポリＡ尾部の付加に対するシグナルであるＡＡＴＡＡＡ配列がある。これらすべての配列は真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ［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。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第７３６５７号に更に記載されている。

【０３８３】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗ＣＤ７９ｂ抗体の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(１９８９年7月5日に公開のＵＫ２２１１５０４)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス２)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス及びサルウイルス４０(ＳＶ４０)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

ＳＶ４０ウイルスの初期及び後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルスの複製起点を更に含むＳＶ４０制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩＥ制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主中でＤＮＡを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトβ-インターフェロンｃＤＮＡの発現を記載している、Reyes等, Nature 297:598-601 (1982)を参照。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用する

ことができる。

【０３８４】

(5) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードしているＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強されうる。エンハンサーは、転写を亢進するようにプロモーターに働く通常およそ１０から３００ｂｐの、ＤＮＡのシス作用因子である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー(１００－２７０塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。また、真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)も参照のこと。エンハンサーは、抗ＣＤ７９ｂ抗体コード配列の５'又は３'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから５'位に位置している。

【０３８５】

(6) 転写終末成分

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の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列を含みうる。このような配列は、真核生物又はウイルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの５'、時には３'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗ＣＤ７９ｂ抗体をコードしているｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第９４／１１０２６号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

組み換え脊椎動物細胞培養中での抗ＣＤ７９ｂ抗体の合成への適応に適する他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)；Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)；欧州特許第１１７０６０号；及び欧州特許第１１７０５８号に記載される。

【０３８６】

４．宿主細胞の培養

本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体を製造するために用いられる宿主細胞は様々な培地で培養されてよい。

ａ．原核生物宿主細胞

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

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

【０３８７】

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対して好ましい温度は、約２０℃から約３９℃、より好ましくは約２５℃から約３７℃の範囲、さらに好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主として宿主生物に応じて、約５から約９の範囲の任意のｐＨでありうる。大腸菌に対しては、ｐＨは好ましくは約６．８から約７．４

、より好ましくは約７．０である。
本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにＰｈｏＡプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。好ましくは、リン酸限定培地はＣ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地である(例として、Simmons等，Ｊ．Immunol．Methods (2002)，263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。
一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ＰＡＧＥ)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。
【０３８８】
本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも１０００リットルの容量、好ましくは約１０００から１００００００リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素／エネルギー源)を分散させる撹拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ１００リットル以下の容積で、約１リットルから約１００リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。
発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約１８０－２２０のOD_{550}まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約１２－５０時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。
【０３８９】
本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばＤｓｂタンパク質(ＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｂＣ、ＤｓｂＤ及び／又はＤｓｂＧ)又はＦｋｐＡ(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等 (1999) Ｊ Bio Chem 274:19601-19605；Georgiou等，米国特許第６０８３７１５号；Georgiou等，米国特許第６０２７８８８号；Bothmann及びPluckthun (2000) Ｊ．Biol．Chem．275:17100-17105；Ramm及びPluckthun (2000) Ｊ．Biol．Chem．275:17106-17113；Arie等 (2001) Mol．Microbiol．39:199-210。
発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等 (1998)；Georgiou等，米国特許第５２６４３６５号；Georgiou等，米国特許第

５５０８１９２号；Hara等 (1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

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

【０３９０】

ｂ．真核生物宿主細胞

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；又は米国再発行特許第３０９８５号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び／又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばＨＥＰＥＳ)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ™薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必須補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、ｐＨ等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【０３９１】

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。或いは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖、及びＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ－タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識することができる抗体を用いてもよい。抗体を順に標識することができ、二本鎖が表面に結合される場合はアッセイを行って、表面上に二本鎖が形成されたら、二本鎖に二本鎖に結合され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な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＣＤ７９ｂポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列に基づいた合成ペプチドに対して、又はＣＤ７９ｂＤＮＡに融合し、特異的抗体をコードする外因性配列に対して調製され得る。

【０３９２】

６．抗ＣＤ７９ｂ抗体の精製

抗ＣＤ７９ｂ抗体の形態は、培養液又は宿主細胞の可溶化液から回収される。膜に結合している場合、ポリペプチドは、適切な洗剤溶液(例えばトリトンＸ１００)を用いて又は酵素の切断により、膜から解放することができる。抗ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体を、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場合がある。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例

えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過;ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及び抗ＣＤ７９ｂ抗体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生成される特定の抗ＣＤ７９ｂ抗体の性質に依存する。

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(ｐＨ３．５)、ＥＤＴＡ、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(ＰＭＳＦ)の存在下で、３０分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

【０３９３】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインＡの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンＦｃ領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、又はγ４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γ３に推奨されている(Guss等, EMBO Ｊ. 5: 15671575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約２．５－４．５のｐＨでの溶離バッファーを用いて、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度(例えば、約０－０．２５Ｍ塩)で実施される。

【０３９４】

Ｇ．薬学的製剤

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１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１００００μｇ／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１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１０００μｇ／ｍ^2、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ８００μｇ／ｍ^2、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ６００μｇ／ｍ^2、およそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ４００μｇ／ｍ^2、およそ１０μｇ／ｍ^{2}から

およそ５００μｇ／ｍ^2、およそ１０μｇ／ｍ^{2}からおよそ３００μｇ／ｍ^2、およそ１０μｇ／ｍ^{2}からおよそ２００μｇ／ｍ^2、及びおよそ１μｇ／ｍ^{2}からおよそ２００μｇ／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。

【０３９５】

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一のヒト化ＭＡ７９ｂ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１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１００ｍｇ／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１μｇ／ｍ^{2}からおよそ５００μｇ／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一に記載のヒト化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１μｇ／ｍ^{2}からおよそ１０００ｍｇ／ｍ^{2}の用量範囲で投与されるであろう。

【０３９６】

一態様では、本発明はさらに、少なくとも一の本発明の抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

本発明に従って用いられる抗ＣＤ７９ｂ抗体又はＣＤ７９ｂイムノコンジュゲートを含有する治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体又はイムノコンジュゲートと、場合によっては薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、凍結乾燥又は水溶液の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、アセテート、トリス、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾール)；低分子量(約１０残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパ

ラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート化剤；トレハロース及び塩化ナトリウム等のtonicifier；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Ｚｎ-タンパク質複合体)；及び／又はＴＷＥＥＮ(登録商標)、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。インビボ投与に用いられる薬学的製剤は一般に滅菌されている。これは滅菌濾過メンブレンによる滅菌によって容易に達成される。

【０３９７】

また、本明細書中の製剤は、治療される特定の症状に必要な一より多い活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含みうる。例えば、抗ＣＤ７９ｂ抗体に加え、一製剤中に、更なる抗体、例えばＣＤ７９ｂポリペプチド上の異なるエピトープを結合する第二抗ＣＤ７９ｂ抗体、又は特定の癌の増殖に影響する増殖因子などのいくつかの他の標的に対する抗体を含むのが望ましいかもしれない。あるいは又はさらに、組成物はさらに、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、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、意図する目的のために有効である量で組み合わせて好適に存在する。

【０３９８】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

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

【０３９９】

抗体は、標的細胞／組織への運搬のために任意の適切な様式で調製されてもよい。例えば、抗体はイムノリポソームとして調製されてもよい。「リポソーム」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なる小さいベシクルである。リポソームの構成成分は二重層形成に共通に配置される。そして、生物学的膜の脂質配列と同種である。抗体を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985)；Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980)；米国特許第４４８５０４５号及び同４５４４５４５号；及び１９９７年１０月２３日公開

の国際公開９７／３８７３１に記載されるような、当分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第５０１３５５６号に開示されている。

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

インビボ投与のために使用される製剤は無菌でなければならない。これは、濾過滅菌メンブレンによる濾過によって容易に達成される。

【０４００】

Ｈ．抗ＣＤ７９ｂ抗体による治療

癌におけるＣＤ７９ｂ発現を定量するために、種々の検出アッセイが利用可能である。一実施形態では、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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％を超えて検出される。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％を超えて観察される。

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

ＣＤ７９ｂポリペプチド発現に関して０又は１＋スコアの腫瘍は、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂが過剰発現していることを特徴としうる。

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ＣＤ７９ｂポリペプチド過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

【０４０１】

ＣＤ７９ｂ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)を投与し、標識の局在化について患者を外部スキャニングする。

上に記載したように、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現している癌の染色にとって有用である(例えば、ラジオイメージングで)。また、他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からＣＤ７９ｂ発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体は、例えば、ＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットにおいて、インビトロでＣＤ７９ｂポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からＣＤ７９ｂポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【０４０２】

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ＣＤ７９ｂ抗体による治療は、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ＣＤ７９ｂ抗体は、疾患の初期診断時及び再発中におけるＣＤ７９ｂ発現癌の緩

和に有用である。治療用途に関しては、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、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ＣＤ７９ｂ抗体による治療は、従来的治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来的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ＣＤ７９ｂ抗体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ＣＤ７９ｂ抗体は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施形態では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は化学療法剤、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(ＰＤＲ)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【０４０３】

特定の一実施形態では、細胞障害剤に結合した抗ＣＤ７９ｂ抗体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、ＣＤ７９ｂタンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施形態では、細胞障害剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞障害剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ及びＤＮＡエンドヌクレアーゼを含む。

抗ＣＤ７９ｂ抗体又はその毒素コンジュゲートは、公知の方法、例えばボーラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、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。抗体の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗ＣＤ７９ｂ抗体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。

【０４０４】

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ＣＤ７９ｂ抗体又は抗体類の投与を組合せることが望ましい。

他の実施形態では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗ＣＤ７９ｂ抗体(又は抗体類)と一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害剤との組合せ投与、例えば異なる化学療法剤又は他の細胞障害性剤又は腫瘍の増殖を阻害する他の治療剤の混合液の同時投与を含む。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セタキセル)及び／又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。抗体は、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ＣＤ７９ｂ

抗体(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。

【０４０５】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療摂生に加えて、抗体治療の前、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(例えば外的ビーム照射又は抗体のような放射標識薬剤での治療)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ＣＤ７９ｂ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。

【０４０６】

本発明の抗体組成物は良好な医療行為に一致した形で処方され、投与量が決められ、投与される。この場合に考慮される因子には、治療されている特定の疾患、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、医師に知られている他のファクターが含まれる。抗体は、必ずしもそうする必要はないが、場合によっては、当該疾患の予防又は治療のために現在使用されている一又は複数の薬剤と共に処方される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する本発明の抗体の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは、一般に、これまで使用されたものと同じ用量及び投与経路で、あるいはこれまで用いられた投薬量の約１から９９％で使用される。

【０４０７】

疾患の予防又は治療のため、投与量及び投与方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体の適切な用量は、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への応答性、担当医の裁量に依存するであろう。抗体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、抗体は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重１ｋｇ当たり約１μｇから約５０ｍｇ(例えば約０．１－１５ｍｇ／ｋｇ／用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約４ｍｇ／ｋｇの初期負荷量、続いて１週間に約２ｍｇ／ｋｇの維持用量の抗ＣＤ７９ｂ抗体を投与することからなってよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【０４０８】

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

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、ＤＥＡＥ-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。

【０４０９】
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、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ-Ｃｈｏｌ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ー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ＣＤ７９ｂ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)を介して又は相補鎖依存性細胞障害において相補鎖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。
一実施形態では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗ＣＤ７９ｂ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。
上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。
【０４１０】
本抗ＣＤ７９ｂ抗体は、哺乳動物におけるＣＤ７９ｂを発現する癌の治療、或いは、該癌の一又は複数の症状の緩和に有用である。そのような癌には、限定するものではないが、造血癌又は血液関連癌、例えばリンパ腫、白血病又はリンパ性悪性疾患と、また脾臓の癌及びリンパ節の癌が含まれる。かかるＢ細胞関連癌のより特定的な例には、例えば高悪性度、中悪性度及び低悪性度リンパ腫(Ｂ細胞リンパ腫、例えば粘膜関連リンパ組織Ｂ細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、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)及び白血病(二次性白血病、慢性リンパ性白血病、例えばＢ細胞白血病(ＣＤ５＋Ｂリンパ球)、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病及び骨髄異形成を含む)、及び他の血液及び／又はＢ細胞又はＴ細胞関連癌が含まれる。癌は前述の癌が転移したものを含む。抗体は、哺乳動物においてＣＤ７９ｂポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい一実施形態では、抗体は、インビボ又はインビトロで、細胞上のＣＤ７９ｂポリペプチドに結合すると、ＣＤ７９ｂを発現する腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的である。このような抗体には、ネイキッド抗ＣＤ７９ｂ抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞障害性又は細胞増殖阻害特性を有するネイキッド抗体は、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、ここ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ＣＤ７９ｂ抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は増殖阻害剤は、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を使用することが好ましい。
【０４１１】
本発明は、本発明の抗ＣＤ７９ｂ抗体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ネイキッド抗体として存在する一又は複数の抗ＣＤ７９ｂ抗体を含有し得る。さらなる実施形態においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を

含む成長阻害剤又は細胞障害剤とこれらの抗体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ＣＤ７９ｂ抗体と担体を含有する製剤も提供する。一実施形態では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含有する治療用製剤である。

本発明の他の態様は、抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるＣＤ７９ｂポリペプチド発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体治療組成物は、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、ＣＤ７９ｂポリペプチドを発現する細胞の増殖を阻害し、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ＣＤ７９ｂ抗体を含有するキット又は製造品も提供する。抗ＣＤ７９ｂ抗体を含むキットは、例えばＣＤ７９ｂ細胞殺傷アッセイ、細胞からのＣＤ７９ｂポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、ＣＤ７９ｂの単離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ス)に結合した抗ＣＤ７９ｂ抗体を含むことができる。インビトロにおけるＣＤ７９ｂの検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットにおける抗体を含む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。

【０４１２】

Ｉ．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(ＡＤＣ)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ＡＤＣ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(ＮＨＬ)、侵襲性ＮＨＬ、再発侵襲性ＮＨＬ、再発無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ性白血病(ＡＬＬ)、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ＣＤ７９ｂ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／又は細胞障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ＡＤＣの効能を評価するために設計することができる。

【０４１３】

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(ＮＨＬ)、侵襲性ＮＨＬ、再発侵襲性ＮＨＬ、再発無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ性白血病(ＡＬＬ)、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ＡＤＣが癌細胞に結合できるように、ＣＤ７９ｂ発現細胞を含みうる。癌におけるＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂの過剰発現はＩＨＣ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ＩＨＣ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ＣＤ７９ｂタンパク質の染色強度基準に一致させる。

【０４１４】

疾患の予防又は治療の場合、ＡＤＣ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１ｋｇ当たり約１μｇから１５ｍｇ(例えば０．１－２０ｍｇ／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１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／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１０ｍｇ／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４ｍｇ／ｋｇの初期負荷量、続いて１週間に約２ｍｇ／ｋｇの維持用量の抗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。

【０４１５】

Ｊ．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、細胞障害剤、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て存在する。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ＣＤ７９ｂ 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(例えばアバスチン(登録商標))を含む。

【０４１６】

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／又は細胞障害剤、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。

【０４１７】

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。

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。

【０４１８】

Ｋ．製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、ＣＤ７９ｂを発現する癌の治療、予防及び／又は診断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ＣＤ７９ｂ抗体である。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(ＢＷＦＩ)、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ＣＤ７９ｂ発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのＣＤ７９ｂ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。ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体を含むことが可能である。インビトロでのＣＤ７９ｂポリペプチドの検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエ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ＣＤ７９ｂ抗体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。

【０４１９】

Ｌ．ＣＤ７９ｂポリペプチドの用途

本発明は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを模倣するもの(アゴニスト)又はＣＤ７９ｂポリペプチドの効果を防止するもの(アンタゴニスト)を同定するために化合物をスクリーニングする方法を包含する。アンタゴニスト薬剤候補のスクリーニング分析は、本明細書中で同定される遺伝子によりコードされるＣＤ７９ｂポリペプチドに結合し、若しくはそれと複合体形成する化合物、あるいは例えば細胞からのＣＤ７９ｂポリペプチドの発現を阻害することを含む、そうでなければコードされるポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を妨げる化合物を同定するように設計される。このようなスクリーニング分析には、ハイスループットスクリーニングにより化学ライブラリーを分析できる分析を含み、小分子の薬剤候補を同定するのに特に適したものにする。

分析は、当該分野でよく特性付られているタンパク質－タンパク質結合分析、生化学的スクリーニング分析、免疫分析、及び細胞ベース分析を含む様々な形式で行われ得る。

アンタゴニストのための全ての分析は、ここで同定された核酸によってコードされるＣ

ＣＤ７９ｂポリペプチドに薬剤候補を、これら二成分が相互作用することを可能にする条件及び十分な時間、接触させることを必要とする点で共通している。

【０４２０】

結合分析では相互作用は結合であり、形成された複合体は反応混合物中で単離又は検出され得る。特定の実施態様では、本明細書中で同定される遺伝子によりコードされたＣＤ７９ｂポリペプチド又は薬剤候補は、例えば、マイクロタイタープレート等の固相上に、共有、若しくは非共有結合により固定される。非共有結合は一般に固体表面をＣＤ７９ｂポリペプチドの溶液で被覆し、乾燥することによって達成される。あるいは、固定化されるべきＣＤ７９ｂポリペプチドに特異的な、例えばモノクローナル抗体である固定化抗体を、それを固体表面に固定化するのに用い得る。検出可能な標識により標識化されていてもよい非固定化成分を、例えば、固定化された成分を含むコートされた表面である固定化された成分に添加することにより分析を行う。反応が終了したら、例えば洗浄により未反応の成分を除去し、固体表面に固定化された複合体を検出する。当初は固定化されていない成分が検出可能な標識を有する場合、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。当初は固定化されていない成分が標識を有さない場合には、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識化された抗体を用いて複合体形成は検出され得る。

【０４２１】

候補化合物が本明細書中で同定される遺伝子によりコードされる特定のＣＤ７９ｂポリペプチドと相互作用はしても、結合はしない場合、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の周知の方法により分析され得る。このような分析には、例えば、架橋法、共免疫沈降法、及び勾配又はクロマトグラフィーカラムによる同時精製等の伝統的な手法が含まれる。更に、タンパク質－タンパク質相互作用は、Ｆｉｅｌｄｓと共同研究者(Fields及びSong, Nature(London), 340:245-246(1989)；Chien等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:9578-9582(1991))により記載され、Chevray及びNathans, Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89:5789-5793(1991)により開示される酵母を用いた遺伝子系を用いてモニターされ得る。酵母ＧＡＬ４等の多くの転写活性化物質は、一方がＤＮＡ結合ドメインとして働き、もう一方が転写活性化ドメインとして機能する２つの物理的に別個のモジュールドメインからなる。前述の文献に記載の酵母発現系(一般に「ツーハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性を利用し、１個は標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合されたタンパク質で、もう一方が候補活性化タンパク質が活性ドメインに融合されたタンパク質である２個のハイブリッドタンパク質を利用する。ＧＡＬ４－活性化プロモーターの制御下のＧＡＬ１－ｌａｃＺレポーター遺伝子の発現は、タンパク質－タンパク質相互作用によるＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用性のポリペプチドを含むコロニーは、β－ガラクトシダーゼのための色原性の基質により検出される。ツーハイブリッド技術を用いた２つの特異的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^{TM})は、Ｃｌｏｎｔｅｃｈより市販されている。この系はまた特異的なタンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインのマッピング、並びにこれらの相互作用に重要なアミノ酸残基の位置を正確に決定するために拡張され得る。

【０４２２】

本明細書中で同定されるＣＤ７９ｂ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妨げる化合物は、以下のようにして試験され得る：通常、遺伝子の産物及び細胞内又は細胞外成分を含む反応混合物が、２つの産物の相互作用及び結合を可能にする条件下並びに可能にする時間をかけて調製される。結合を阻害する候補化合物の能力を試験するために、反応を試験化合物の不在下及び存在下で行う。更に、陽性コントロールとして、第３の反応混合物にプラシーボを添加し得る。混合物中に存在する試験化合物及び細胞内又は細胞外成分の間の結合(複合体形成)を、上述のようにしてモニターする。試験化合物を含む反応混合物中では形成されないコントロール反応中の複合体の形成は、試験化合物とその反応相手との相互作用を試験化合物が妨げることを示す。

【０４２３】
アンタゴニストを分析するため、ＣＤ７９ｂポリペプチドが、特定の活性についてスクリーニングされる化合物と一緒に細胞に添加され、ＣＤ７９ｂポリペプチド存在下で、興味ある活性を阻害する化合物の能力が、化合物がＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂポリペプチドとアンタゴニストとなり得るものを、膜結合ＣＤ７９ｂポリペプチド受容体又は組換え受容体と、競合阻害分析に適当な条件下で一緒にすることによっても、アンタゴニストは検出され得る。受容体に結合したＣＤ７９ｂポリペプチド分子の数を、アンタゴニストとなり得るものの有効性を決定するのに用い得るよう、ＣＤ７９ｂポリペプチドを放射能等により標識化することができる。例えばリガンド選別及びＦＡＣＳ分取等、当業者に公知の多数の方法により、受容体をコードする遺伝子を同定し得る。Coligan等, Current Protocols in Immun.,1(2)：第５章(1991)。ポリアデニル酸化ＲＮＡがＣＤ７９ｂポリペプチドに反応性の細胞から調製された場合には、好ましくは発現クローニングが採用され、このＲＮＡから製造されたｃＤＮＡライブラリーはプールに分けられ、ＣＤ７９ｂポリペプチドに反応性でないＣＯＳ細胞又は他の細胞をトランスフェクトするのに用いられる。ガラススライド上で生育されたトランスフェクトされた細胞を、標識ＣＤ７９ｂポリペプチドに曝露する。ＣＤ７９ｂポリペプチドは、ヨード化、又は部位特異的プロテインキナーゼのための認識部位を含めることを含む種々の手段により標識され得る。固定化及び培養に続き、スライドをオートラジオグラフィー分析に付す。陽性のプールを同定し、サブプールを調製し、相互作用サブープーリング、及び再スクリーニング工程を用いて再トランスフェクトし、最終的に、推定される受容体をコードする単一のクローンが得られる。

【０４２４】
受容体同定の別の方法として、標識されたＣＤ７９ｂポリペプチドを、受容体分子を発現する細胞膜又は抽出調製物と光親和性結合させ得る。架橋された材料をＰＡＧＥにより分解し、Ｘ線フィルムに曝露する。受容体を含む標識複合体を、削り取り、ペプチド断片に分解し、タンパク質マイクロシークエンシングに付し得る。マイクロシークエンシングにより得られたアミノ酸配列は、推定される受容体をコードする遺伝子を同定するためのｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするために縮重オリゴヌクレオチドプローブのセットを設計するのに用いられるであろう。

【０４２５】
アンタゴニストのための別の分析では、哺乳動物細胞又は受容体を発現する膜調製物は、候補化合物の存在下で標識ＣＤ７９ｂポリペプチドと共にインキュベートされるであろう。その後、この相互作用を増幅し又は阻害する化合物の能力を測定し得る。
アンタゴニストとなり得るもののより具体的な例には、ＣＤ７９ｂポリペプチドと免疫グロブリンの融合体、特にこれらに限定されるわけではないが、ポリクローナル抗体、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、及びこのような抗体若しくは断片のキメラ又はヒト化型、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体が含まれる。或いは、アンタゴニストとなり得るものは、例えば、受容体を認識するが何の効果も与えず、それによりＣＤ７９ｂポリペプチドの活性を競合的に阻害するＣＤ７９ｂポリペプチドの変異型である、密接に関連したタンパク質であり得る。

【０４２６】
ここで同定されるＣＤ７９ｂ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る他の分子は、癌を含む種々の疾患の治療のために、薬学的組成物の形態で投与することができる。
ＣＤ７９ｂポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として使用されるとき、内部移行抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えＤＮＡ技術によって生成できる。

例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

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

【０４２７】

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(ＰＥＧ)、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-１,３-ジオキソラン、ポリ-１,３,６-トリオキサン、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。

【０４２８】

Ｎ．スクリーニング方法

本発明の更に他の実施態様は、ＣＤ７９ｂポリペプチドを含むと疑われる試料中のＣＤ７９ｂポリペプチドの存在を決定する方法であって、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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)ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【０４２９】

ＩＶ．抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体及びイムノコンジュゲートは、生体試料中のＣＤ７９ｂの存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合に許容される条件下で抗ＣＤ７９ｂ抗体と生体試料を接触させ、抗ＣＤ７９ｂ抗体とＣＤ７９ｂとの間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。
一態様では、本発明は、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体と試験細胞を接触させ、ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出することによって試験細胞によるＣＤ７９ｂの発現レベル(量的に又は質的に)を測定し、そして、試験細胞によるＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂを発現する細胞)によるＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂの発現レベルが高い場合にＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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。
【０４３０】
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(ＮＨＬ)、侵襲性ＮＨＬ、再発侵襲性ＮＨＬ、再発無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ性白血病(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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂに対する抗ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合に許容される条件下で抗ＣＤ７９ｂ抗体と細胞を接触させ、抗ＣＤ７９ｂ抗体と細胞表面上のＣＤ７９ｂとの間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。細胞の表面上に発現されたＣＤ７９ｂへの抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは、「ＦＡＣＳ」アッセイである。
【０４３１】
ある他の方法は、ＣＤ７９ｂに対する抗ＣＤ７９ｂ抗体の結合を検出するために用いてもよい。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、ＥＬＩＳＡ(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(ＩＨＣ)が含まれる。
ある実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ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、^{3}Ｈ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(ＨＲＰ)、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、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、ＨＲＰ、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。

【０４３２】

ある実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかのＣＤ７９ｂから抗ＣＤ７９ｂ抗体を分離することを伴う。これは従来、水不溶性基質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、グルター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ＣＤ７９ｂ抗体を不溶化するか、又は抗ＣＤ７９ｂ抗体とＣＤ７９ｂとの複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によって抗ＣＤ７９ｂ抗体を不溶化することによって達成される。

診断ないし検出の上記いずれかの実施態様は、抗ＣＤ７９ｂ抗体の代わりに、ないしは抗ＣＤ７９ｂ抗体に加えて本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われうる。

【０４３３】

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、エクスビボ、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、ＣＤ７９ｂへのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗ＣＤ７９ｂ抗体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、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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(ＮＨＬ)、侵襲性ＮＨＬ、再発侵襲性ＮＨＬ、再発無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ性白血病(ＡＬＬ)、及びマントル細胞リンパ腫が含まれる。

【０４３４】

一態様では、本発明は、抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体又は抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂを有する他の哺乳動物(例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)においてＣＤ７９ｂを結合するために用いてもよい。一実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂはヒトＣＤ７９ｂである。

【０４３５】

一実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体ないしイムノコンジュゲートは、個体のＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ発現Ｂ細胞中に内部移行する。一実施態様では、ＣＤ７９ｂはヒトのＣＤ７９ｂであり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗ＣＤ７９ｂ抗体が結合するＣＤ７９ｂを発現している哺乳動物であってもよい。また更に、個体は、ＣＤ７９ｂが(例えば、ＣＤ７９ｂの投与によって、又はＣＤ７９ｂ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。

抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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。

【０４３６】

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て使われてもよい。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、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(ＮＨＬ)、侵襲性ＮＨＬ、再発侵襲性ＮＨＬ、再発無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病(ＣＬＬ)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、ヘアリーセル白血病(ＨＣＬ)、急性リンパ性白血病(ＡＬＬ)、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。

【０４３７】

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て使われてもよい。

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。

【０４３８】

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およそ１～９９％で、或いは経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

【０４３９】

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１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ(例えば０．１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／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１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／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０．０５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲であろう。ゆえに、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／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４ｍｇ／ｋｇの初期負荷投与量の後、約２ｍｇ／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。

【０４４０】

Ｃ．活性アッセイ

本発明の抗ＣＤ７９ｂ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。

【０４４１】

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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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－Ｇｌｏ™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。

【０４４２】

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。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ™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ＣＤ７９ｂ抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施態様では、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３×１０^{6}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Ｃａ$^{2+}$結合バッファ(１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７.４、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、２.５ｍＭ $CaCl_2$)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、ＦＡＣＳＣＡＮ™フローサイトメーター及びＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ™ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ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。

【０４４３】

一態様では、抗ＣＤ７９ｂ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、Ｃａ$^{2+}$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、ＦＡＣＳＣＡＮ™フローサイトメーター及びＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ™ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ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ＤＮＡＥＬＩＳＡ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ＣＤ７９ｂを発現

する又はＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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、ＣＤ７９ｂを発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にＣＤ７９ｂを発現しないがＣＤ７９ｂ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。

【０４４４】

一態様では、抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＳＣＩＤ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、ＢＪＡＢ－ｌｕｃ細胞(ルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入したＥＢＶ陰性バーキットリンパ腫細胞株)、Ｒａｍｏｓ細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、ＳｕＤＨＬ－４細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、ＤｏＨＨ２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)、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞(Jadayel, D.M.等, Leukemia 11(1):64-72 (1997)を参照)を含む、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。

【０４４５】

２．結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、ある実施態様では、抗ＣＤ７９ｂ抗体は、細胞の表面に発現されるＣＤ７９ｂに結合する能力について試験される。ＦＡＣＳアッセイ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、ＣＤ７９ｂへの結合について、マウスＭＡ７９ｂ抗体、ヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１７抗体及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１８及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ２８及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ３２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ＭＡ７９ｂ抗体、ヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１７抗体及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１８及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ２８及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ３２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。

【０４４６】

例示的な競合アッセイでは、固定されたＣＤ７９ｂは、ＣＤ７９ｂに結合する第一標識抗体(例えばマウスＭＡ７９ｂ抗体、ヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１７抗体及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ１８抗体及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ２８及び／又はヒト化ＭＡ７９ｂ．ｖ３２)と、ＣＤ７９ｂへの結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含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ＣＤ７９ｂを第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。ＣＤ７９ｂへの第一抗体の結

合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたＣＤ７９ｂと結合している標識の量を測定する。固定されたＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂは、細胞の表面上に、又はその表面上にＣＤ７９ｂを発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

一態様では、精製した抗ＣＤ７９ｂ抗体はさらに、限定するものではないが、Ｎ末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ(ＨＰＬＣ)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ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。

【０４４７】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はＡＤＣＣなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のＦｃ活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び／又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、ＣＤＣ及び／又はＡＤＣＣ活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Ｆｃレセプター(ＦｃＲ)結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠損している(すなわちＡＤＣＣ活性を欠損していると思われる)が、ＦｃＲｎ結合能は維持していることを確認することができる。ＡＤＣＣを仲介する第一細胞であるＮＫ細胞は、ＦｃγＲIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はＦｃγＲI、ＦｃγＲII及びＦｃγＲIIIを発現する。造血系細胞でのＦｃＲ発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表３に要約されている。対象とする分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第５５００３６２号又は同第５８２１３３７号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(ＰＢＭＣ)及びナチュラルキラー(ＮＫ)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のＡＤＣＣ活性は、例えばClynes 等のPNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、Ｃ１ｑ結合アッセイを行って、抗体がＣ１ｑに結合できない、つまりＣＤＣ活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載のように、ＣＤＣアッセイを行ってもよい。また、ＦｃＲｎ結合及びインビボクリアランス／半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【０４４８】

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】

【０４４９】

実施例において示される市販の試薬は、特に明記しない限り製造業者の指示に従って用いた。実施例において使用する抗体には市販の抗体が含まれ、限定するものではないが、抗ＣＤ７９ｂ(Biomeda(Foster City, CA) 又はBDbioscience(San Diego, CA)又はAncell(Bayport, MN)から購入された抗体)、抗ＣＤ７９ｂ(１９９３年７月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成される)及びキメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体(１９９３年７月２０にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成される抗体からの可変ドメインを含むもの)が含まれる。以下の実施例、及び明細書全体を通してＡＴＣＣ寄託番号によって識別される細胞の供給源は、アメリカ培養細胞系統保存機関、マナッサス、バージニア州である。

【０４５０】

実施例１：ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の生成

残基番号はカバットに従う(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。一文字アミノ酸略記号を用いる。ＤＮＡ縮重は、ＩＵＢコード(Ｎ＝Ａ／Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｄ＝Ａ／Ｇ／Ｔ、Ｖ＝Ａ／Ｃ／Ｇ、Ｂ＝Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｈ＝Ａ／Ｃ／Ｔ、Ｋ＝Ｇ／Ｔ、Ｍ＝Ａ／Ｃ、Ｒ＝Ａ／Ｇ、Ｓ＝Ｇ／Ｃ、Ｗ＝Ａ／Ｔ、Ｙ＝Ｃ／Ｔ)を用いて表す。

【０４５１】

Ａ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト

様々なヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体を生成した。マウスＭＡ７９ｂ抗体(ＭＡ７９ｂ)(Roswell Park Cancer Institute; Okazaki et al., Blood, 81:84-94 (1993))のＶＬ及びＶＨドメインを、ヒトコンセンサスＶＬκＩ(ｈｕKI)及びヒトサブグループIIIコンセンサスＶＨ(ｈｕIII)ドメインと整列させた。ＨＶＲグラフトを作製するために、３つの位置、つまりＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及びＬ７８Ａでヒトサブグループ IIIコンセンサスＶＨドメインと異なるアクセプターＶＨフレームワーク(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))を用いた。マウスＭＡ７９ｂ(ＭＡ７９ｂ)の高頻度可変領域をアクセプターヒトコンセンサスフレームワークに設定し、ＭＡ７９ｂの直接のＨＶＲ－グラフトを生成した(本明細書中では「ＭＡ７９ｂグラフト」又は「ＭＡ７９ｂ－グラフト」又は「ｈｕＭＡ７９ｂ－グラフト」と称する)。ＶＬドメインでは、位置２４－３４(Ｌ１)、５０－５６(Ｌ２)及び８９－９７(Ｌ３)(図７Ａ-Ｂ)の領域をヒトコンセンサスアクセプターに融合させた。ＶＨドメインでは、位置２６－３５(Ｈ１)、４９－６５(Ｈ２)及び９３－１０２(Ｈ３)を融合させた(図８Ａ-Ｂ)。MacCallum et al. (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996))は抗体と抗原複合体結晶構造を分析して、重鎖の位置４９、９３及び９４が接触領域の一部であって、それゆえに抗体をヒト化する場合にＨＶＲ-Ｈ２及びＨＶＲ-Ｈ３の定義に含まれることを発見した。

直接－グラフト変異体(ｈｕＭＡ７９ｂ－グラフト)は、各々の高頻度可変領域のために異なるオリゴヌクレオチドを用いて、ＩｇＧとして及びファージにディスプレイされたＦａｂとして、キュンケル突然変異誘発法によって生成した。適切なクローンはＤＮＡ塩基配列決定によって評価した。

【０４５２】

Ｂ.ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト変異体

ＭＡ７９ｂ－グラフト(MA79b-grafted)「ヒト化」抗体の高頻度可変領域に突然変異の多様性を包含した抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト変異体を、ファージライブラリを用いて生成した。抗ＣＤ７９ｂ抗体グラフト変異体は、ＨＶＲ内に単一の位置バリエーション(図９)か又はＨＶＲ内に複数の位置バリエーション(図１０)を含んだ。

【０４５３】

Ｃ.ファージ選別

ファージ選別のために、ＣＤ７９ｂの細胞外ドメイン(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$)(２μｇ／ｍｌ)をＭａｘｉＳｏｒｐマイクロタイタープレート(Nunc)上にＰＢＳ中、４℃で終夜をかけて固定した。プレートは、カゼインブロッカー(Pierce)を用いて少なくとも１時間ブロックした。培養上清物からファージを回収し、０．５％ＢＳＡ及び０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ(ＰＢＳＢＴ)に懸濁した。ファージライブラリの添加と２時間のファージ選別の後、マイクロタイターウェルを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ(ＰＢＳＴ)にて十分に洗浄し、結合しなかったファージを除去し、結合したファージを１００ｍＭ ＨＣｌを含むウェルを３０分間インキュベートすることによって溶出させた。選別の続くラウンドの間、ＰＢＳＴによる洗浄回数を増やすことによってか又は溶出までの時間を増やすために可溶性ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$とインキュベートすることによって、選別強度を増やしてもよい。

溶出されたファージは１Ｍ Ｔｒｉｓ，ｐＨ８にて中和し、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ細胞及びＭ１３／ＫＯ７ヘルパーファージを用いて増幅させ、２ＹＴ、５０μｇ／ｍｌ カルベニシリンにて３７℃で終夜生育させた。標的を含むウェルから溶出されたファージのタイタ

ーは、標的を含まないウェルから回収したファージのタイターと比較し、増菌を評価した。

【０４５４】

Ｄ.Ｆａｂ製造及びＩｇＧ製造

親和性測定値のためのＦａｂタンパク質を発現させるために、停止コドンを、ファージディスプレイベクターの重鎖とｇ３との間に導入した。クローンは大腸菌３４Ｂ８細胞に形質移入し、完全Ｃ.Ｒ.Ａ.Ｐ.培地中で３０℃で生育させた(Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。細胞は遠心分離により回収し、ＰＢＳ、１００μＭ ＰＭＳＦ、１００μＭ ベンズアミジン、２．４ｍＭ ＥＤＴＡに懸濁し、マイクロ流動化装置を用いて破壊(broken open)した。ＦａｂはプロテインＧ親和性クロマトグラフィにて精製した。

スクリーニングのために、ＩｇＧ変異体はまず最初に２９３細胞において製造した。ＶＬ及びＶＨをコードするベクター(２５μｇ)をＦｕＧｅｎｅシステムを用いて２９３細胞に形質移入した。５００μｌのＦｕＧｅｎｅをＦＢＳを含まない４．５ｍｌのＤＭＥＭ培地と混合し、室温で５分間インキュベートした。各々の鎖(２５μｇ)をこの混合物に添加し、室温で２０分間インキュベートし、次いで、フラスコに移し、５％CO_2下、３７℃で終夜をかけて形質移入させた。次の日、形質移入混合物を含む培地を除去し、０．１ｍｌ／Ｌの微量元素(Ａ０９３４)及び１０ｍｇ／Ｌのインスリン(Ａ０９４０)を有する２３ｍｌのＰＳ０４培地と置き換えた。培地を１０００ｒｐｍにて５分間かけて回収した後、さらに5日間細胞をインキュベートし、０．２２μｍ低タンパク-結合フィルターを用いて濾過滅菌した。１２５ｍｌの培地ごとに2．５ｍｌの０．１％ＰＭＳＦを添加した後、試料を４℃で保存することができる。

【０４５５】

Ｅ.親和性決定(Ｂｉａｃｏｒｅ分析)

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体の親和性測定のために、ヒトＣＤ７９ｂの細胞外ドメイン(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$)を、ＣＨＯ細胞にのみ、又は、Ｆｃ融合(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$-Ｆｃ)として発現させ、従来の手段によって精製した。さらに、ＭＡ７９ｂのためのエピトープを含む１６アミノ酸ペプチド(ARSEDRYRNPKGSACK)(配列番号：１６)を従来の方法によって合成した。

ＭＡ７９ｂ抗体のためのエピトープ(図１９に「試験ペプチド」として標識した)の特徴は、２００６年8月3日に出願の米国特許第１１／４６２３３６号に既に開示されている。ＭＡ７９ｂのエピトープは膜貫通ドメインより遠位の細胞外ペプチド領域に位置し、ヒトＣＤ７９ｂの完全型及び切断型に存在していた(Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002))。このことは正常及び悪性Ｂ細胞において記載されている(Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9): 651-9 (1995)；Alfarano et al., Blood, 93(7): 2327-35 (1999))。ＣＤ７９ｂの切断型は全体の細胞外Ｉｇ様ドメインを欠いている(ＣＤ７９ｂのスプライシング切断型に存在しない細胞外Ｉｇ様ドメインを図１９の囲みで示す)。

ＭＡ７９ｂ、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体又はＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＦａｂ及びＩｇＧ変異体の、固定したｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$ないしはｈｕＣＤ７９ｂ－Ｆｃ又はＭＡ７９ｂのエピトープを含む１６アミノ酸ペプチドへの結合を、表面プラズマ共鳴法により測定した。親和性決定は、ＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}－２０００を用いた表面プラスモン共鳴法によって行った。抗原、ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$又はｈｕＣＤ７９ｂ－Ｆｃは、ＣＭ５センサーチップ上に、１０ｍＭ 酢酸ナトリウムｐＨ４．８において固定した(およそ５０－２００ＲＵ)。大きな結合(アビディティ)作用があるために、親和性測定値は固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$の量に影響された。したがって、異なる日に実行した試料について決定した親和性は、標準物質として同時に実行したＭＡ７９ｂに正規化した。ＭＡ７９ｂのエピトープを含む１６アミノ酸ペプチド(ARSEDRYRNPKGSACK)(配列番号：１６)への結合を測定した実験では、ビオチン化ペプチドをストレプトアビジンコートセンサーチップ上にキャプチャーした(およそ２０ＲＵ)。精製したＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(Ｆａｂ又はＩｇＧとして)(ＰＢＳＴにて０．５～１００

０ｎＭの２倍段階希釈)を３０μｌ／分の流速で注入した。各々の試料は、４分の会合及び１０分の脱会合により分析した。各々の注入の後、チップは１０ｍＭ グリシンｐＨ１．７を用いて再構成した。

結合応答は、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(ＦａｂまたはＩｇＧとして)フローセルからコントロールフローセルを減算することによって修正した。動態分析のために、k_{on}及びk_{off}の同時フィッティングの１：１Ｌａｎｇｕｉｒモデルを用いた。

【０４５６】

Ｆ.結合分析(ＦＡＣＳ分析)

さらにＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体又は抗体変異体のＦａｂ変異体の結合を決定するために、ＤｏＨＨ-２細胞に対するＦａｂ及び／又はＩｇＧ変異体の結合は、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。さらに、ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ細胞に対するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体の結合は、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(コントロールとして用いたＩｇＧバージョン))のＦａｂ変異体のＦＡＣＳ分析のために、まずＤｏＨＨ－２細胞(１００μｌ中1×10^{6})は、１μｇの元のマウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体(ＭＡ７９ｂ)のある場合又はない場合で３０分間インキュベートし、その後１μｇのそれぞれのＦａｂ変異体(又はコントロール抗体)を添加した。すべてのＦａｂ変異体はκ軽鎖を有しており、ＤｏＨＨ－２細胞は細胞表面上にκ軽鎖を発現しないので、ＰＥコンジュゲートマウス抗ヒトＩｇ、κ軽鎖(クローンG20-193, BD Biosciences, San Diego, CA)を二次検出抗体として用いた。

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＩｇＧ変異体(コントロールとして用いたｃｈＭＡ７９ｂのＩｇＧバージョン)の更なるＦＡＣＳ分析のために、１．０μｇ、０．１μｇ又は０．０１μｇの抗体を、ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞の１００万細胞当たりの力価を測定した。ＰＥコンジュゲートマウス抗ヒトＩｇを二次検出抗体として用いた。

【０４５７】

Ｇ.親和性決定(スキャッチャード分析)

ＨＶＲ－Ｌ２及びＨＶＲ－Ｈ３(ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３)内に変異を有するＩｇＧ変異体の結合をさらに決定するために、ヒトＣＤ７９ｂ及びカニクイザルＣＤ７９ｂを発現するＢＪＡＢ細胞に対するヨード化ＩｇＧ変異体の結合を分析し、スキャッチャード分析を行った。

スキャッチャード分析のために、カニクイザルＣＤ７９ｂ及び内在性ヒトＣＤ７９ｂを安定して発現する形質移入したＢＪＡＢ細胞株の存在下で、０．５ｎＭのI^{125}標識ＭＡ７９ｂ又はｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３を、それぞれ５０～０．０２ｎＭ(１２工程 １：２段階希釈)の非標識ＭＡ７９ｂ又はｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３に対して競合させた。４℃で４時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、細胞ペレット数をγカウンターにて読み取った(1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Walthem, MA)。すべての時点を３通り行い、１０分間計数した。平均ＣＰＭは、ニューリガンド(Genentech, South San Francisco, CA)プログラムを用いたＫｄ算出のために用いた。

【０４５８】

結果及び考察

Ａ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の生成の結果

ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の生成に用いたヒトアクセプターフレームワークは、コンセンサスヒトκＩ ＶＬドメインと、ヒトサブグループIIIコンセンサスＶＨドメインの変異体を含む。変異体ＶＨドメインは、ヒトコンセンサスから３つの変化、つまりＲ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ及びＬ７８Ａを有する。ＭＡ７９ｂのＶＬ及びＶＨドメインは、ヒトκI及びサブグループIIIドメインと整列配置させた。各々のＨＶＲを識別し、次いで、ヒトアクセプターフレームワーク内に融合(グラフト)させて、ファージ上のＦａｂとして表出しうるＨＶＲグラフトを生成した(図７及び８)。

ＦａｂとしてＭＡ７９ｂ－グラフトを表出するファージは固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$に結合した(データは示さない)。しかしながら、ｈｕＭＡ７９ｂ－グラフト配列がＩｇＧとして発現された場合、ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ｅｃｄ}$に対する親和性のＦＡＣＳ分析は、結合親和性が１００分の１未満に減少したことを示し(データは示さない)、そしてＢｉａｃｏｒｅ分析は５０分の１未満を示した(図１１)。

【０４５９】

１．ＣＤＲ修復

以下の配列変化を有する固定されたｈｕＣＤ７９ｂｅｃｄに結合することが可能であったＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体が、識別された。

単一位置変化を含むライブラリにおいて、ＶＬ内の配列変化のみターゲティングＨＶＲ(only sequence changes targeting HVR)が観察され、図９に示す(Ｌ１変異では、Ｑ２７Ｋ（配列番号：１７；ＳＰＬ-２変異)、Ｌ２変異では、Ｌ５４Ｒ（配列番号：１８)、Ｅ５５Ｋ（配列番号：１９)、及びＬ３変異では、Ｅ９３Ｓ（配列番号：２０；ＳＰＬ-５変異)、Ｅ９３Ｋ（配列番号：２１))。

複数の位置変化を含むライブラリにおいて、Ｌ２、Ｌ３、Ｈ１及びＨ３内の配列変化のみターゲティングＨＶＲ(only sequence changes targeting HVR)が観察され、図１０に示す(Ｌ２変異では、Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｇ及びＳ５６Ｒ(配列番号：２２；Ｌ２-２変異)；Ｎ５３Ｒ(配列番号：２３)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｇ及びＳ５６Ｎ(配列番号：２４)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｋ及びＳ５６Ｒ(配列番号：２５)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｙ、Ｅ５５Ｋ及びＳ５６Ｒ(配列番号：２６；Ｌ２-２９変異)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ及びＥ５５Ｋ(配列番号：２７)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ及びＥ５５Ａ(配列番号：２８)；Ｓ５２Ｇ、Ｎ５３Ｉ、Ｅ５５Ａ及びＳ５６Ｒ(配列番号：２９)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｒ(配列番号：３０)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ及びＥ５５Ｇ(配列番号：３１；Ｌ２-３８突然変異)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｈ、Ｅ５５Ｋ及びＳ５６Ｒ(配列番号：３２)；Ａ５１Ｓ、Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｙ、Ｅ５５Ｓ及びＳ５６Ｒ(配列番号：３３)；Ａ５１Ｇ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｌ及びＳ５６Ｒ(配列番号：３４)；Ｌ５４Ｒ及びＥ５５Ｋ(配列番号：３５)；Ｎ５３Ｋ及びＥ５５Ｇ(配列番号：３６)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｙ、Ｅ５５Ｒ及びＳ５６Ｒ(配列番号：３７)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｒ、Ｅ５５Ｒ及びＳ５６Ｔ(配列番号：３８)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｒ、Ｅ５５Ｇ及びＳ５６Ｒ(配列番号：３９)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｑ、Ｌ５４Ｒ、Ｅ５５Ｋ及びＳ５６Ｒ(配列番号：４０)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｌ及びＳ５６Ｒ(配列番号：４１)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｋ及びＳ５６Ｎ(配列番号：４２)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｇ及びＳ５６Ｔ(配列番号：４３)；Ｓ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ｇ及びＳ５６Ｇ(配列番号：４４)；及びＳ５２Ｒ、Ｎ５３Ｋ、Ｅ５５Ａ及びＳ５６Ｒ(配列番号：４５)、Ｌ３変異では、Ｅ９３Ａ(配列番号：４６)；Ｅ９３Ｑ(配列番号：４７)；変異なし(配列番号：４８)；Ｅ９３Ｄ(配列番号：４９)；Ｅ９３Ｌ(配列番号：５０)；Ｑ８９Ｎ、Ｑ９０Ｎ、Ｅ９３Ｇ及びＴ９７Ｎ(配列番号：５１)；Ｑ９０Ｐ、Ｓ９１Ｄ、Ｄ９４Ａ及びＬ９６Ｒ(配列番号：５２)；Ｑ８９Ｄ、Ｓ９１Ｒ、そして、Ｅ９３Ａ(配列番号：５３)、Ｈ１変異では、Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｓ(配列番号：５４)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｒ及びＥ３５Ｑ(配列番号：５５)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ及びＥ３５Ｎ(配列番号：５６)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ、Ｓ３１Ｒ、そしてＥ３６Ｎ(配列番号：５７；Ｈ１-６変異)；Ｓ３０Ｎ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：５８)；Ｔ２８Ｓ及びＳ３０Ｋ(配列番号：５９)；Ｇ２６Ｐ、Ｔ２８Ｓ、Ｆ２９Ｌ、Ｓ３０Ｃ、Ｓ３１Ｔ、Ｗ３３Ｆ及びＥ３５Ｄ(配列番号：６０)；Ｔ２８Ｙ及びＳ３０Ｔ(配列番号：６１)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｇ、Ｓ３１Ｒ、Ｉ３４Ｖ及びＥ３５Ｎ(配列番号：６２)；Ｓ３０Ｋ及びＳ３１Ｋ(配列番号：６３)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ及びＥ３５Ｑ(配列番号：６４)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｒ及びＳ３１Ｒ(配列番号：６５)；Ｔ２８Ｐ、Ｆ２９Ｖ、Ｓ３０Ｇ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｓ(配列番号：６６)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｎ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：６７；Ｈ１-１突然変異)；Ｔ２８Ｇ、Ｓ３０Ｔ及びＥ３５Ｓ(配列番号：６８)；Ｓ３０Ｔ、Ｉ３４Ｌ及びＥ３５Ｓ(配列番号：６９)；Ｓ３０Ｔ(配列番号：７０)；Ｓ３１Ｇ及びＥ３５Ｎ(配列番号：７１)；Ｓ３０Ｒ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：７２)；Ｔ２８Ｓ、Ｓ３

０Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：７３)；Ｔ２８Ｓ、Ｓ３０Ｒ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：７４)；Ｔ２８Ｓ、Ｓ３０Ｒ及びＳ３１Ｒ(配列番号：７５)；Ｔ２８Ｓ、Ｓ３０Ｐ、Ｉ３４Ｌ及びＥ３５Ｑ(配列番号：７６)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ及びＳ３１Ｒ(配列番号：７７)；Ｔ２８Ｐ及びＳ３１Ｇ(配列番号：７８)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｒ及びＥ３５Ｓ(配列番号：７９)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：８０)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｒ及びＳ３１Ｇ(配列番号：８１)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｎ及びＳ３１Ｒ(配列番号：８２)；Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｎ、Ｓ３１Ｇ及びＥ３５Ｎ(配列番号：８３)；Ｔ２８Ｎ、Ｆ２９Ｖ、Ｉ３４Ｌ及びＥ３５Ｓ(配列番号：８４)；Ｙ２７Ｆ、Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｔ及びＥ３５Ｓ(配列番号：８５)；及び、Ｙ２７Ｆ、Ｔ２８Ｐ、Ｓ３０Ｎ、Ｓ３１Ｒ及びＥ３５Ｎ(配列番号：８６)、そしてＨ３変異では、Ｖ９８Ｉ及びＦ１００Ｌ(配列番号：８７；Ｈ3-１２変異)；変異なし(配列番号：８８)；Ｙ９９Ｋ及びＦ１００Ｌ(配列番号：８９)；Ｆ１００Ｌ(配列番号：９０)；Ｖ９８Ｉ(配列番号：９１)；Ｖ９８Ｆ、Ｙ９９Ｃ及びＦ１００Ｌ(配列番号：９２)；Ｆ１００Ｌ(配列番号：９３)；Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌ(配列番号：９４；Ｈ3-１０変異)；Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｋ及びＦ１００Ｌ(配列番号：９５)；Ｖ９８Ｉ及びＹ９９Ｒ(配列番号：９６)；Ｖ９８Ｉ(配列番号：９７)；Ｄ１０１Ｓ(配列番号：９８)；Ｙ９９Ｖ及びＦ１００Ｌ(配列番号：９９)；Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌ(配列番号：１００)；Ｙ９９Ｒ(配列番号：１０１)；Ｙ９９Ｆ及びＦ１００Ｌ(配列番号：１０２)；Ｖ９８Ｉ及びＦ１００Ｌ(配列番号：１０３)；Ｖ９８Ｉ(配列番号：１０４)；Ｖ９６Ｒ、Ｙ９９Ｃ及びＦ１００Ｌ(配列番号：１０５)；及び、Ｖ９６Ｉ(配列番号：１０６))。

選択されたクローンは、ＦＡＣＳによる分析のためにＦａｂとして、そしてＢｉａｃｏｒｅ及びスキャッチャードによる更なる分析のためにＩｇＧとして再フォーマットした。

【０４６０】

ａ．親和性決定(Ｂｉａｃｏｒｅ分析)

Ｂｉａｃｏｒｅ分析を示す図１１に示すように、このＣＤＲ-修復手法により、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体の親和性を向上させる多くの異なる配列変化が同定された。表面プラスモン共鳴アッセイから、単一ＨＶＲ変化を有する試験した変異体はいずれもＭＡ７９ｂと同等の親和性を有していなかったが、ＨＶＲ－Ｌ２及びＨＶＲ－Ｈ３（ＭＡ７９ｂ－グラフト 「ヒト化」抗体変異体Ｌ２／Ｈ３；本明細書中ではｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３とも称する)において同定された変化を組み合わせると、Ｂｉａｃｏｒｅ分析によって測定されるように、固定したｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$ないしはｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$－Ｆｃ又はＭＡ７９ｂのエピトープを含む１６アミノ酸ペプチドに結合した場合に、ＭＡ７９ｂと同程度の親和性を有する変異体となる(図１１)ことが示された。

抗原(ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$-Ｆｃ)に対するＭＡ７９ｂの単量体結合(Ｆａｂ)対二量体結合(ＩｇＧ)の分析(図１１、列１、ＦａｂをＩｇＧカラムと比較する)により、ＭＡ７９ｂに存在する１００倍の結合活性(アビディティ)成分が親和性改善変異体に欠いていることが示唆された。具体的には、ＭＡ７９ｂと比較して単量体結合において５倍の改善を示すＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体Ｌ２－２(本明細書中ではｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２－２とも称する)では(図１１、列１及び３、Ｆａｂカラムを比較する)、ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２－２をＩｇＧとして再フォーマットすることによって見かけの親和性は得られなかった(図１１、列４、ＦａｂをＩｇＧカラムと比較する)。さらに、最初のＭＡ７９ｂ ＨＶＲグラフト－「ヒト化」抗体(ｈｕＭＡ７９ｂグラフト)は、結合においてこの結合活性成分の欠失を示す(図１１、列２、ＦａｂをＩｇＧカラムと比較する)。結合活性(アビディティ)による結合の亢進能は、細胞表面抗原を結合する際に望ましいかもしれない。

【０４６１】

ｂ．親和性決定(スキャッチャード分析)

スキャッチャード分析によって評価されるように、このＣＤＲ-修復手法によりＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体の親和性を向上させた多くの異なる配列変化が同定された

。　具体的には、細胞結合アッセイから、カニクイザルＣＤ７９ｂ及び内在性ヒトＣＤ７９ｂを安定して発現するＢＪＡＢ細胞を結合するために、ＭＡ７９ｂ及びＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体Ｌ２／Ｈ３(ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３)（ＩｇＧとして再フォーマットしたもの)の親和性は、スキャッチャード分析によって決定されるように、それぞれ０.６３ｎＭ(ＭＡ７９ｂ；Ｋｄ＝０.６３±０.１４ｎＭ)及び０.５２ｎＭ(ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３；Ｋｄ＝０.５２±０.１ｎＭ)のＫｄ値であったことが示された(データは示さない)。

【０４６２】

ｃ．結合決定(ＦＡＣＳ分析)

ＦＡＣＳ分析によって評価されるように、このＣＤＲ-修復手法により、ＤｏＨＨ-２細胞に対するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(ｈｕＭＡ７９ｂグラフト)の結合を向上させた多くの異なる配列変化が同定された(データは示さない)。具体的には、ＳＰ及び６のＳＲライブラリから同定されたＦａｂ変異体(Ｌ２-２、Ｈ３-１０　Ｈ１-１変異)のＤｏＨＨ-２細胞に対するＦＡＣＳ分析は、Ｆａｂ変異体及びｈｕＭＡ７９ｂグラフト(ＩｇＧとしてフォーマットされたもの)のＤｏＨＨ-２細胞に対する結合を示した(データは示さない)。さらに、Ｆａｂ変異体のＦＡＣＳ分析から、ＤｏＨＨ-２細胞に対するＦａｂ変異体の結合が、マウス抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体(ＭＡ７９ｂ)とともにプレインキュベートすることによってブロックされたことが示された(データは示さない)。

【０４６３】

２．フレームワーク修復

ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３変異体のＨＶＲ－Ｌ２に導入したＨＶＲ配列変化は、いずれかのヒト生殖系において観察されたものと根本的に異なっていた。ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３変異体が、ＤＭ１にコンジュゲートされた場合、インビボマウス異種移植片モデルでの腫瘍増殖の抑制に有効であることが観察された。抗原に対するｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３変異体の単量体結合(Ｆａｂ)対二量体結合(ＩｇＧ)の分析が結合活性の欠失を示したので(図１１)、下記のようにフレームワーク修復を行った。

二量体抗原結合におけるフレームワーク位置の役割を調べるために、「すべてのフレームワーク」位置変異体を、潜在的に重要なマウスフレームワーク位置がＭＡ７９ｂ　ＨＶＲ－グラフト「ヒト化」抗体(ｈｕＭＡ７９ｂグラフト)に組み込まれるように構築した。Ｂｉａｃｏｒｅ分析及びスキャッチャード分析によって評価されるように、このいずれかのＨＶＲ変化を欠いている変異体(「すべてのフレームワーク」として図１２に示される)は、キメラＭＡ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)(図１２)と同程度の二量体結合親和性を有していた。

位置４及び／又は４７(ＶＬ)及び／又は位置４７、４８、６７、６９、７１、７３、７４、７８及び／又は８０(ＶＨ)にマウスフレームワーク残基を含むＩｇＧ変異体を作製して、高親和性、二量体結合を維持するために必要なフレームワーク位置の最低一群を決定した(図１２)。マウスフレームワーク残基を、図７Ａ－Ｂ(配列番号：１０)及び図８Ａ－Ｂ(配列番号：１４)に示す。ＶＬの４７及びＶＨの７５及び８０のフレームワーク位置が、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７)(図１２、１７として示す列)によって証明されたように、重要でないことが明らかとなった。

ＶＬの４及びＶＨの４８、６７、６９、７１、７３の位置にマウスフレームワーク残基を含み、さらにＶ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌを含むＨＶＲ-Ｈ３に変化を含む(「Ｈ３-１０」として図１２に示され、Ｈ３-１０変異として上記されるもの)、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１８(ＭＡ７９ｂ.ｖ１８；図１２、１８として示す列)は、変異体１７(図１２、１７として示す列)と比較して、二量体結合の更に２倍の改善を示した(図１２、２８として示す列)。

起こりうる製造時の問題を避けるために、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＨＶＲ-Ｌ１の潜在的なイソ-アスパラギン酸形成部位(Ａｓｐ－Ｇｌｙ)を、Ｄ２８をＧｌｕに変換することによって取り除いた(グルタミン酸)(Ｄ２８Ｅ；変異体２８を参照；本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８」とも称する；図１２、２８として示す列)。ま

た、Ｄ２８からＳｅｒ(セリン)(Ｄ２８Ｅ；変異体３２を参照；本明細書中では「ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２」とも称する；図１２、３２として示す列)を含む、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＶＬにおける安定性のための他の置換も許容した。

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８；図１２、２８として示す列)、これは、(１) ＶＬの４及びＶＨの４８、６７、６９、７１、７３及び７８の位置にマウスフレームワーク残基を含み、(２) Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌを含むＨＶＲ-Ｈ３にさらに変化を含み(「Ｈ３-１０」として図１２に示され、Ｈ３-１０変異として上記されるもの)、そして(３) さらにＨＶＲ-Ｌ１に変化(上記のＤ２８Ｅ)を含むものをＢｉａｃｏｒｅ分析にて特徴付けした。

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体３２(ＭＡ７９ｂ.ｖ３２；図１２、３２として示す列)、これは、(１) ＶＬの４及びＶＨの４８、６７、６９、７１、７３及び７８の位置にマウスフレームワーク残基を含み、(２) Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌを含むＨＶＲ-Ｈ３にさらに変化を含み(「Ｈ３-１０」として図１２に示され、Ｈ３-１０変異として上記されるもの)、そして(３) さらにＨＶＲ-Ｌ１に変化(上記のＤ２８Ｓ)を含むものをＢｉａｃｏｒｅ分析にて特徴付けした。

【０４６４】

ａ．親和性決定(Ｂｉａｃｏｒｅ分析)

Ｂｉａｃｏｒｅ分析を示す図１２に示すように、このフレームワーク-修復手法により、ｈｕＣＤ７９ｂｅｃｄに対するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体の親和性を向上させる多くの異なる配列変化が同定された。表面プラスモン共鳴アッセイから、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８；ＶＬの４及びＶＨの４８、６７、６９、７１、７３及び７８の位置にマウスフレームワークを、並びに、ＨＶＲ－Ｈ３内にＨ３－１０変異(Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌ(上記))とＨＶＲ－Ｌ１内にＤ２８Ｅ変異(安定性のため、上記を参照)を有する；図１２、２８として示す列)と、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２；ＶＬの４及びＶＨの４７、４８、６７、６９、７１、７３及び７８の位置にマウスフレームワークを、並びに、ＨＶＲ－Ｈ３内にＨ３－１０変異(Ｖ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌ(上記))とＨＶＲ－Ｌ１内にＤ２８Ｓ変異(安定性のため、上記を参照)を有する；図１２、３２として示す列)は、Ｂｉａｃｏｒｅ分析によって測定されるように、固定されたｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$への結合の場合に、キメラＭＡ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)と同程度の親和性を有したことが示された。

【０４６５】

ｂ．親和性決定(スキャッチャード分析)

スキャッチャード分析によって評価されるように、このフレームワーク-修復手法によりＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(ｈｕＭＡ７９ｂグラフト)の親和性を向上させる多くの異なる配列変化が同定された。細胞結合アッセイから、カニクイザルＣＤ７９ｂ及び内在性ヒトＣＤ７９ｂを安定して発現するＢＪＡＢ細胞を結合するために、ＭＡ７９ｂ、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８；図１２、２８として示す列を参照)(ＩｇＧとして再フォーマットしたもの)及びＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体３２(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２；図１２、３２として示す列を参照)の親和性は、スキャッチャード分析によって決定されるように、それぞれ０.６３ｎＭ(ＭＡ７９ｂ；Ｋｄ＝０.６３±０.１４ｎＭ)、０.４４ｎＭ(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８；Ｋｄ＝０.４４±０.０４ｎＭ)、及び０.２４ｎＭ(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２；Ｋｄ＝０.２４±０.０２ｎＭ)のＫｄ値であったことが示された(データは示さない)。

【０４６６】

ｃ．結合決定(ＦＡＣＳ分析)

ＦＡＣＳ分析によって評価されるように、このフレームワーク-修復手法により、ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞に対するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体(ｈｕＭＡ７９ｂグラフト)の結合を向上させる多くの異なる配列変化が同定された(データは示さない)。具体的には、ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞に対するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」

抗体変異体(変異体ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２)のＩｇＧ変異体のＦＡＣＳ分析は、ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞への結合を示した(データは示さない)。

【０４６７】

Ｂ．ヒト化抗ＣＤ７９ｂ抗体の生成の考察

６つのマウスＭＡ７９ｂ ＨＶＲのグラフト(位置２４－３４(Ｌ１)、５０－５６(Ｌ２)、８９－９７(Ｌ３)、２６－３５(Ｈ１)、４９－６５(Ｈ２)及び９３－１０２(Ｈ３)として定められる)の、ヒトコンセンサスκＩ ＶＬ及びサブグループＩＩＩ ＶＨ(Ａ７１、Ｔ７３及びＡ７８を含む)へのグラフトから、ＣＤＲ修復を用いて、結合親和性を向上させるＨＶＲ１－６内の変化を同定した。図１０及び１１において同定されたＨＶＲ配列変化又はこれら変化の組合せにより、ＭＡ７９ｂと同程度の親和性を有するＭＡ７９ｂのヒト化変異体が生じた。

これに対して、フレームワーク修復を用いて、ＶＬの４及びＶＨの４８、６７及び６９のフレームワーク位置をｈｕＭＡ７９ｂグラフト(ＶＨの７１、７３及び７８にマウスフレームワーク残基を含む)に付加することによって二量体結合活性を取り戻させた(図１２；ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７))。ｈｕＣＤ７９ｂ$_{ecd}$抗原に対するこれらのフレームワーク変異変異体の親和性は、ＨＶＲ-Ｈ３に３つの変化、つまりＶ９８Ｉ、Ｙ９９Ｒ及びＦ１００Ｌを付加することによってさらに向上した(図１２；ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１８(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８))。ＨＶＲ-Ｌ１内の潜在的なイソ-アスパラギン酸形成部位はＤ２８Ｅ変異により取り除いた(図１２；ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体２８(ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８))。

【０４６８】

実施例２：抗ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)の生成

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体のＩｇＧ変異体の有効性を試験するために、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体を、ＤＭ１などの薬剤にコンジュゲートした。ＤＭ１にコンジュゲートさせた変異体には、ＨＶＲ-Ｌ２及びＨＶＲ-Ｈ３に変異を有する変異体(ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３)、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２が含まれる。

抗ＣＤ７９ｂ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ｔｈｉｏ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ｅ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(ｖ

ｃ)-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。

【０４６９】

ＳＭＣＣ及びＤＭ１を用いた、抗ＣＤ７９ｂのための抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、米国公開特許２００５／０２７６８１２において記述される手順と同様に生成した。抗ＣＤ７９ｂ精製抗体は、５０ｍＭ リン酸カリウム及び２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．０を含む溶液にバッファを交換した。ＳＭＣＣ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)は、ジメチルアセトアミド(ＤＭＡ)に溶解し、抗体溶液に加えて１０:１のＳＭＣＣ／Ａｂ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、ＳＭＣＣ修飾抗体は、１５０ｍＭ ＮａＣｌ及び2ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．０を有する３５ｍＭ クエン酸ナトリウムにて平衡化されたＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム(G-２５)で精製した。ＤＭＡに溶解したＤＭ１を、ＳＭＣＣ抗体調製物に添加して、１０:１の抗体に対するＤＭ１のモル比とした。混合しながら室温で４～２０時間反応させた。ＤＭ１修飾抗体溶液は、反応していないＤＭ１を取り除くために２０容量のＰＢＳにてダイアフィルターし、フィルター滅菌して、４℃に貯蔵した。一般的に、この方法によって抗体の４０～６０％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９５％より多くの単量体であった。ＤＭ１が２５２ｎｍで吸光度最大を有するので、抗体に結合した薬剤の量は、２５２及び２８０ｎｍ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。

【０４７０】

ＳＰＰ－ＤＭ１リンカーを用いた、本明細書中に記載の抗ＣＤ７９ｂのための抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)は、米国公開特許２００５／０２７６８１２において記述される手順と同様に生成してもよい。抗ＣＤ７９ｂ精製抗体は、５０ｍＭ リン酸カリウム及び２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．０を含む溶液にバッファを交換する。ＳＰＰ(Immunogen)は、ＤＭＡに溶解し、抗体溶液に加えておよそ１０:１のＳＰＰ／Ａｂ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、１０：１の比率はおよそ３～４の抗体に対する薬剤比率となる。ＳＰＰは、混合しながら室温で３～４時間反応させる。続いて、ＳＰＰ修飾抗体は、１５０ｍＭ ＮａＣｌ及び2ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．０を有する３５ｍＭ クエン酸ナトリウム又はリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．４にて平衡化されたＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム(G-２５)で精製する。ＤＭＡに溶解したＤＭ１を、ＳＰＰ抗体調製物に添加して、１０:１の抗体に対するＤＭ１のモル比とする。この結果、抗体上の利用可能なＳＰＰリンカーの３～４倍のモル比となる。混合しながら室温で４～２０時間、ＤＭ１と反応させる。ＤＭ１修飾抗体溶液は、反応していないＤＭ１を取り除くために２０容量のＰＢＳにてダイアフィルターし、フィルター滅菌して、４℃に貯蔵される。一般的に、この方法によって抗体の４０～６０％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９５％より多くの単量体であった。ＳＭＣＣ－ＤＭ１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、２５２及び２８０ｎｍでの差次的な吸光度測定によって決定されうる。

【０４７１】

ＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ＭＭＡＥ、ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ（ｖｃ)-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ又はＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ（ｖｃ)-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ薬剤リンカーを用いた、本明細書中に記載の抗ＣＤ７９ｂ抗体のための抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)もまた、米国公開特許２００５／０２３８６４９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ＣＤ７９ｂ抗体は、ｐＨ８．０で５００ｍＭ ホウ酸ナトリウム及び５００ｍＭ 塩化ナトリウムに溶解し、さらに過剰量の１００ＭＭジチオトレイトール(ＤＴＴ)にて処理される。

３７℃でおよそ３０分間インキュベートした後、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５樹脂による溶出によりバッファを交換し、１ｍＭ ＤＴＰＡを含むＰＢＳにて溶出する。チオール／Ａｂ値は、溶液の２８０ｎｍでの吸光度からの還元抗体濃度とＤＴＮＢとの反応によるチオール濃度とを測定し、４１２ｎｍ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ＰＢＳに溶解し、氷上で冷やす。ＤＭＳＯ中の例えばＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ（ｖｃ)-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ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ＰＢＳ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、ＰＢＳのＧ２５樹脂による溶出によって脱塩し、無菌条件下にて０．２μｍフィルターにて濾過し、貯蔵のために凍結させる。

【０４７２】

抗体薬剤コンジュゲート(本願明細書において記述される抗ＣＤ７９ｂ抗体を使用する)はアッセイ培地にて２×１０μｇ／ｍｌに希釈した。コンジュゲートはクロスリンカーＳＭＣＣにて結合させた(代替ジスルフィドリンカーがメイタンシノイドＤＭ１毒素に対するＳＰＰのために使われてもよい)(米国公開特許２００５／０２７６８１２及び米国公開特許２００５／０２３８６４９を参照)。さらに、コンジュゲートは、ＭＣ-バリン-シトルリン(ｖｃ)-ＰＡＢ又はＭＣにて、ドラスタチン１０誘導体、モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)毒素又はモノメチルアウリスタチンＦ(ＭＭＡＦ)毒素に結合させてもよい(２００５年3月３１日に出願の米国特許第１１／１４１３４４号、及び２００４年１１月５日に出願の米国特許第１０／９８３３４０号を参照のこと)。ネガティブコントロールには、ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)(抗ＨＥＲ２)ベースのコンジュゲート(ＳＭＣＣ-ＤＭ１又はＳＰＰ-ＤＭ１又はＭＣ-ｖｃ-ＭＭＡＥ又はＭＣ-ｖｃ-ＭＭＡＦ)が含まれた。ポジティブコントロールには、コンジュゲート負荷用量と等量の遊離Ｌ－ＤＭ１が含まれてもよい。試料はボルテックスをかけ、希釈の前に均一な混合物とした。

薬剤コンジュゲートのための抗ＣＤ７９ｂ抗体には、キメラＭＡ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)及びｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３抗体変異体及び本明細書中に記載のｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２が含まれた(実施例１を参照)。さらに、コンジュゲートのための抗体には、本願明細書中のいずれかの抗体が含まれてもよい(実施例１を参照)。

【０４７３】

実施例３：インビボ腫瘍細胞殺傷アッセイ

Ａ．異種移植片

ＨＶＲ-Ｌ２及びＨＶＲ-Ｈ３に変化を有するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３)のＩｇＧ変異体の有効性を試験するために、ｈｕＭＡ７９ｂ Ｌ２／Ｈ３変異体はＤＭ１にコンジュゲートさせ、マウスの腫瘍に対するコンジュゲート変異体の効果を分析した。

具体的には、複数の異種移植片モデルにおける抗体の腫瘍退行能が調べられうる。この異種移植片モデルには、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))、Ｇｒａｎｔａ５１９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 Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001))、Ｕ６９８Ｍ細胞(リンパ芽球性リンパ肉腫Ｂ細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)及びＤｏＨＨ２細胞(Ｉｇ重鎖によって作動されるＢｃｌ－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、Ｐ１６ＩＮＫ４Ａ欠失を含み、ｔ(８;１４)(ｑ２４;ｑ３２)(ＩＧＨ-ＭＹＣ)転位を含

み、ＥＢＶ陰性である濾胞性リンパ腫細胞株)(Drexler, H.G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)が含まれる。

【０４７４】

ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体の有効性の分析のために、雌ＣＢ17 ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス(６－８週齢、Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)の側腹部に、注射により２×１０^{7}のＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ細胞又はＧｒａｎｔａ－５１９細胞を皮下接種し、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２００ｍｍ^{2}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、カリパス用いて測定し、式：Ｖ＝０．５ａ×ｂ^{2}に従ってｍｍ^{3}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±ＳＥで表した。１０匹のマウス群は、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体又はコントロール抗体－薬剤コンジュゲートを含む、５０μｇから２１０μｇの間の抗体結合薬剤／ｍ^{2}マウス(およそ１～４ｍｇ／ｋｇマウス以下に相当する)の単回静脈内(ｉ．ｖ．)投与にて処置した。実験期間の間、週に１回又は２回腫瘍を測定した。実験期間の間、週に１回又は２回マウスの体重を測定した。腫瘍体積が３０００ｍｍ^{3}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ールは、Institutional Animal Care and Use Committee(ＩＡＣＵＣ)の承認を得た。

使われた抗体と毒素間のリンカーは、ＤＭ１ではチオエーテル架橋剤ＳＭＣＣであった。更なるリンカーには、ＤＭ１又はＭＣのためのジスルフィドリンカーＳＰＰ又はチオエーテル架橋剤ＳＭＣＣ、モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)又はモノメチルアウリスタチンＦ(ＭＭＡＦ)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(ＰＡＢ)自己犠牲的成分とを有するＭＣ－バリン－シトルリン(ｖｃ)－ＰＡＢ又は(バリン－シトルリン(ｖｃ))ジペプチドリンカー試薬が含まれうる。使用する毒素はＤＭ１であった。さらに毒素にはＭＭＡＥ又はＭＭＡＦが含まれうる。

この実験のためのＣＤ７９ｂ抗体には、２００６年８月３日に出願の米国特許第１１／４６２３３６号に記載のキメラＭＡ７９ｂ(ｃｈＭＡ７９ｂ)抗体、並びに本明細書中に記載のＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体(実施例１Ａを参照)が含まれた。更なる抗体には、市販される抗体、例えば抗ＣＤ７９ｂ抗体、及び１９９３年７月２０日にＨＢ１１４１３としてＡＴＣＣに寄託されたハイブリドーマから生成されるＭＡ７９ｂモノクローナル抗体が含まれうる。

ネガティブコントロールには、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)が含まれた。

【０４７５】

Ｂ．結果

１．ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ異種移植片

表９に示す薬剤コンジュゲート及び用量による３５日間の経過では、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体Ｌ２／Ｈ３(ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３変異体)(ＩｇＧとして再フォーマットされたもの)及びＤＭ１にコンジュゲートされたキメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)(それぞれｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)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(抗ＨＥＲ２-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９に示されるように)投与した。具体的には、ｈｕＭＡ７９ｂ　Ｌ２／Ｈ３-ＳＭＣＣ-ＤＭ１抗体(ＩｇＧとして再フォーマットされたもの)及びｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１は、有意に腫瘍成長を阻害した(図２０)。さらに、表９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０ｍｍ^{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９

投与された抗体 (処置)	PR	CR	用量 薬剤-DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ 抗HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	100	2	3.3
chMA79b-SMCC-DM1	3/10	3/10	100	2.4	2.9
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	50	1.2	2.9
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	2/10	0/10	100	2.9	2.4
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	0/10	0/10	50	1.4	2.4

【０４７６】

２．Ｇｒａｎｔａ-５１９異種移植片

表１０に示す薬剤コンジュゲート及び用量による１４日間の経過では、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体変異体１７、変異体１８、変異体２８及び変異体３２(それぞれ、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２)(ＩｇＧとして再フォーマットされたもの)及びＤＭ１にコンジュゲートされたキメラ抗ＣＤ７９ｂ抗体(ｃｈＭＡ７９ｂ)(それぞれ、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)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(抗ＨＥＲ２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)と比較して、Ｇｒａｎｔａ-５１９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１０に示されるように)投与した。具体的には、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１抗体(ＩｇＧとして再フォーマットされたもの)及びｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１は、有意に腫瘍成長を阻害した(図２１Ａ)。

さらに、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７-ＳＭＣＣ-ＤＭ１、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｃｈＭＡ７９ｂ-ＳＭＣＣ-ＤＭ１と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(抗ＨＥＲ２-ＳＭＣＣ-ＤＭ１)はマウスの体重の割合を減少させなかった(図２１Ｂ)。さらに、表１０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０mm^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１０

投与された抗体 (処置)	PR	CR	用量 薬剤-DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ 抗HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	208	4	3.4
chMA79b-SMCC-DM1	0/10	0/10	107	2	3.6
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	213	4	3.6
huMA79b.v17-SMCC-DM1	0/10	0/10	202	4	3.4
huMA79b.v18-SMCC-DM1	4/10	0/10	196	4	3.3
huMA79b.v28-SMCC-DM1	0/10	0/10	101	2	3.4
huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	2/10	202	4	3.4
huMA79b.v32-SMCC-DM1	0/10	0/10	172	4	2.9

異種移植片の腫瘍進行を有意に抑制するＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体ＡＤＣの能力を考慮すると、ＣＤ７９ｂ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)、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、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」ＡＤＣ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)、及び他の造血系細胞の癌などのＢ細胞関連の癌を含む、腫瘍のインビボ腫瘍増殖の低減に有用である。

【０４７７】

実施例４：ＣＤ７９ｂ抗体共局在

細胞内への内部移行の際にＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体及び抗体変異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ＣＤ７９ｂ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, 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、１μｇ／ｍｌ ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体及び抗体変異体、ＦｃＲブロック(Miltenyi)及び２５μｇ／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、１０μｇ／ｍｌ ロイペプチン(Roche)及び５μＭ ペプスタチン(Roche)の存在下で、３７℃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 ＮＨ４Ｃｌ(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、１μｇ／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MIIC(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。２０μｌ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)を有するカバーグラスをマウントする。MIIC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。

したがって、免疫蛍光によって評価される、ＭＡ７９ｂ－グラフト「ヒト化」抗体ないしは抗体変異体とＢ細胞株のMIIC又はライソソームとの共局在は、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)、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。

【０４７８】

実施例５：システイン操作抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体の調製を行った。

ＭＡ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：４、図４；及び重鎖、配列番号：５、図５)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、ＭＡ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡ(重鎖、配列番号：５；図５)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Ｆｃ領域を修飾してもよい。

ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７抗体をコードするＤＮＡ(重鎖、配列番号：３０４、図１５)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、重鎖を修飾した。また、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：３０３；図１５；及び重鎖、配列番号：３０４；図１５)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、軽鎖又は重鎖のＦｃ領域を修飾してもよい。

ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８抗体をコードするＤＮＡ(重鎖、配列番号：３０６、図１６)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、重鎖を修飾した。また、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：３０５；図１６；及び重鎖、配列番号：３０６；図１６)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、軽鎖又は重鎖のＦｃ領域を修飾してもよい。

ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８抗体をコードするＤＮＡ(重鎖、配列番号：３０８、図１７)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、重鎖を修飾した。また、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：３０７、図１７；及び重鎖、配列番号：３０８、図１７)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、軽鎖又は重鎖のＦｃ領域を修飾してもよい。

ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ３２抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：３１０、図１８；及び重鎖、配列番号：３０９、図１８)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てもよい。

抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡ(軽鎖、配列番号：２４１；図４５及び重鎖、配列番号：２４３、図４７)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ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ抗体をコードするＤＮＡ(重鎖、配列番号：２４３、図４７)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Ｆｃ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２７(ＭＡ７９ｂ ｔｈｉｏＭＡｂの軽鎖、配列番号：２３５)及び図４９(ｔｈｉｏＭＡｂ抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)の軽鎖、配列番号：３００)に示すように、軽鎖のカバット位置２０５(連続した位置２０９)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４８(ｔｈｉｏＭＡｂ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)抗体の重鎖、配列番号：２４４)、図２８(ＭＡ７９ｂ ｔｈｉｏＭＡｂの重鎖、配列番号：２３６)、図２４(ｔｈｉｏＭＡｂ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１７の重鎖、配列番号：２２８)、図２５(ｔｈｉｏＭＡｂ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８の重鎖、配列番号：２３０)及び図２６(ｔｈｉｏＭＡｂ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８の重鎖、配列番号：２３２)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２～４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。

【０４７９】

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ＣＤ７９ｂ抗体の調製

完全長のシステイン操作(engineered)抗ＣＤ７９ｂモノクローナル抗体(ＴｈｉｏＭａｂ)は、ＣＨＯ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、５００ｍＭ ホウ酸ナトリウム及び５００ｍＭ 塩化ナトリウムにておよそｐＨ８．０に再構成し、およそ５０～１００倍モル過剰量の１ｍＭ ＴＣＥＰ(トリス(２-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド；Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)にて、３７℃でおよそ１～２時間かけて還元させる。還元されたＴｈｉｏＭａｂを希釈し、１０ｍＭ 酢酸ナトリウム、ｐＨ５のＨｉＴｒａｐ Ｓカラムに流し、０．３Ｍ 塩化ナトリウムを含むＰＢＳにて溶出させる。溶出された稀釈ＴｈｉｏＭａｂは、ｐＨ７の２ｍＭ デヒドロアスコルビン酸(ｄｈＡＡ)にて３時間、又は２ｍＭ 水溶性硫酸銅($CuSO_4$)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、１ｍＭ ＤＴＰＡを含むＰＢＳにて溶

出する。チオール／Ａｂ値は、溶液の２８０ｎｍの吸光度からの還元抗体濃度とＤＴＮＢ(Aldrich, Milwaukee, WI)との反応及び４１２ｎｍ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。

【０４８０】

実施例６：システイン操作抗ＣＤ７９ｂ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ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲートの調製

実施例５の還元及び再酸化手順の後、システイン操作抗ＣＤ７９ｂ抗体は、ＰＢＳ(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、ＭＣ-ＭＭＡＥ（マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンＥ)、ＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ、又はＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ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ＤＭＳＯ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ＰＢＳ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ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲートは精製し、ＰＢＳのＧ２５樹脂による溶出によって脱塩し、無菌条件下で０．２μｍフィルターにて濾過し、貯蔵のために凍結する。

ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１の調製を以下のように行った。ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ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ＢＭ(ＰＥＯ)３(Pierce Chemical)にて修飾した。これは、５０％エタノール／水混合物に１０ｍＭの濃度になるまでＢＭ(ＰＥＯ)３を溶解し、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂをおよそ１．６ｍｇ／ｍｌ(１０マイクロモル)の濃度でリン酸緩衝生理食塩水に含む溶液に１０倍モル過剰量のＢＭ(ＰＥＯ)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ＢＭ(ＰＥＯ)３は、１５０ｍＭ ＮａＣｌバッファを含む３０ｍＭ クエン酸塩、ｐＨ６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(ＤＭＡ)に溶解したおよそ１０倍モル過剰量のＤＭ1を、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ-ＢＭＰＥＯ中間生成物に加えた。また、ジメチルホルムアミド(ＤＭＦ)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ＰＢＳへの透析を行い反応しなかった薬剤を除去した。ＰＢＳのＳ２００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ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１を供給した。

【０４８１】

同じプロトコールによって、ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏコントロール抗ＣＤ２２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ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ＣＤ７９ｂ抗体薬剤コンジュゲート(ＴＤＣ)を調製し、試験した。

１．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ；

２．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＢＭＰＥＯ-ＤＭ１とのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１；

３．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ；

４．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ；
５．ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＢＭＰＥＯ-ＤＭ１とのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１；
６．ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ；
７．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ；
８．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＢＭＰＥＯ-ＤＭ１とのコンジュゲートによるｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１；
９．Ａ１１８Ｃｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ；
１０．ｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)とＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ；そして、
１１．ｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ-ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)とＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲートによるｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ－ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ。

【０４８２】

実施例７：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ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８薬剤コンジュゲート及びｔｈｉｏ 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ｔｈｉｏ 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。

簡単にいうと、１００μｌ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、１．０μｇ、０．１μｇ又は０．０１μｇのＡｂ)の以下のいずれかの抗ＣＤ７９ｂ ｔｈｉｏＭａｂ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) ｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ－ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ又は(２) ｔｈｉｏ ＭＡ７９ｂ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ(それぞれ図２９Ａ－Ｂ)；(３) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、(４) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ、又は(５) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１(それぞれ図３０Ｂ－Ｄ)；(６) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、(７) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、又は(８) ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ(それぞれ図３１Ｂ－３１Ｄを参照)；又は(９) ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤｂ７９(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、(１０) ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、又は(１１) ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ(それぞれ図３２Ｂ－３２Ｄ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２９－３２のプロット線は、抗原結合が試験したｔｈｉｏＭＡｂ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。

【０４８３】

実施例８：抗ＣＤ７９ｂ 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ＣＤ７９ｂ ＴｈｉｏＭＡｂ-薬剤コンジュゲート(ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣＭＭＡＦ、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ１８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１を含む)のインビトロ作用強度は、細胞増殖アッセイにて測定した(図４１Ａ、ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ；図４１Ｂ、Ｇｒａｎｔａ-５１９；図４１Ｃ、ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２)。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ-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５５８３０２４号；同第５６７４７１３号；同第５７００６７０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. Meth o., 160: 81-88 (1993)；米国特許第６６０２６７７号)。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ-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(ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ-Ｇｌｏ(登録商標)試薬)を直接添加することを伴う。

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。基質であるカブ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。

【０４８４】

ｔｈｉｏＭＡｂ－薬剤コンジュゲートの有効性は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ 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、以下のプロトコー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、Ｇｒａｎｔａ-５１９又はＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞を培地に含む４０μｌ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)(１０μｌ)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１．５ｎｇ／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．ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ-Ｇｌｏ試薬(５０μｌ)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０．５１ｎｇ／ｍｌにプロットした。

培地：ＢＪＡＢ、Ｇｒａｎｔａ-５１９及びＷＳＵ-ＤＬＣＬ２細胞は、ＲＰＭＩ１６４０／１０％ＦＢＳ／２ｍＭ グルタミン中で生育させた。

【０４８５】
実施例９：抗ＣＤ７９ｂ 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．Ｇｒａｎｔａ-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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ－５１９異種移植片(ヒトマントル細胞リンパ腫)におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１１に示す。
コントロールＡｂは、ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＭＣ－ＭＭＡＦ又はＭＡ７９ｂ－ＭＣ－ＭＭＡＦとした。コントロールＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＭＡＦ ｔｈｉｏＭＡｂとした。結果を表１１及び図３３に示す。
図３３Ａは、表１１に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ又は軽鎖Ｖ２０５Ｃ 抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤ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、ｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ－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ｔｈｉｏ－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３３Ｂ)は、これらｔｈｉｏＭａｂ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０mm^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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)
表１１
インビボ腫瘍体積減少、
ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ－５１９異種移植片におけるｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)又はｔｈｉｏ ｃｈＭＡ７９ｂ-ＬＣ(Ｖ２０５Ｃ) ＭＭＡＦコンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤/Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6.8	4.0
Thio 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 chMA79b-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2.3	3.0
ｺﾝﾄﾛｰﾙ chMA79b-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6.8	3.0
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2.3	1.9
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	4/9	0/9	190	6.8	1.9
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	0/8	0/8	60	2.3	1.8
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	5/9	4/9	180	6.8	1.8

【０４８６】
Ｂ．ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ(バーキットリンパ腫)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３(上記)に開示したのと同じ異種移

植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ異種移植片(バーキットリンパ腫)における更なる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１２に示す。

コントロール抗体は、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８(ＳＭＣＣ-ＤＭ１にコンジュゲートされたもの)とした。コントロールＨＣ(Ａ１１８Ｃ)ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)抗体ｔｈｉｏＭＡｂ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ＭＣ－ＭＭＡＦ又はＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥにコンジュゲートされたもの)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ又はｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ(ＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)とした。結果を、以下の表１２及び図３４に示す。

図３４Ａは、表１２に示すｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートの投与は、ネガティブコントロールの抗体薬剤コンジュゲート(ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)と比較して、腫瘍増殖の阻害を示した。他のコントロールは、ｔｈｉｏ-ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ), ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ-ｈｕ-抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ＭＭＡＦとした。

さらに、同じ試験では、初めの７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ｔｈｉｏＭａｂ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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１２

インビボ腫瘍体積減少、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ異種移植片におけるＴｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤 /Ab)
Thio コントロール hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO -DM1	0/10	0/10	57	2	1.86
Thio コントロール hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	58	2	1.9
Thio コントロール hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB -MMAE	0/10	0/10	46	2	1.55
コントロール huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	3/10	101	2	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	2/10	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	10/10	57	2	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	54	2	1.87
Thio コントロール huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio コントロール hu-抗CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC -MMAF	1/10	4/10	59	2	1.96

【０４８７】

Ｃ．ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２(びまん性大細胞型リンパ腫)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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスの濾胞性リンパ腫ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２異種移植片(びまん性大細胞型リンパ腫)におけるｔｈｉｏＭＡｂ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は以下の表１３に示す。

コントロール抗体は、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８(ＳＭＣＣ-ＤＭ１に接合されたもの)とした。コントロールのＨＣ(Ａ１１８Ｃ)ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)抗体ｔｈｉｏＭＡｂ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ＭＣ－ＭＭＡＦ又はＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥにコンジュゲートされたもの)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ又はｔｈｉｏ 抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ(ＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)とした。結果を以下の表１３に示す。

図３５Ａは、表１３に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＷＳＵ-ＤＬＣＬ２(びまん性大細胞型リンパ腫)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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥの投与は、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ))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、ｔｈｉｏ-ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ ｈｕ-抗ＣＤ２２(１０Ｆ４ｖ３)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ＭＭＡＦが含まれた。

ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ ＴＤＣは、この試験において最も効果的な試験薬剤であるようである。

さらに、同じ試験では、初めの７日間の体重変化の割合を各投与群で測定した。結果(図３５Ｂ)は、これらｔｈｉｏＭａｂ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０ｍｍ^{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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１３

インビボ腫瘍体積減少、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＷＳＵ-ＤＬＣＬ２異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤/Ab)
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1.9
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	92	4	1.55
ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/10	0/10	202	4	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1.87
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1.96
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA

【０４８８】

Ｄ．ＤＯＨＨ２(濾胞性リンパ腫)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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＤＯＨＨ２異種移植片モデルにおけるｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートのＢ細胞腫瘍体積低減能を調べた。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１４に示す。

コントロールＡｂは、ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８(ＳＭＣＣ-ＤＭ１にコンジュゲートされたもの)とした。コントロールのＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)ｔｈｉｏＭＡｂ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ＭＣ－ＭＭＡＦ又はＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥにコンジュゲートされたもの)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭａｂ及びｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＣＤ２２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)(ＭＣ－ＭＭＡＦに接合された)であった。結果を表１４及び図３６に示す。

図３６Ａは、表１４に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＤＯＨＨ２細胞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、表１４に示される用量の、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ－(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートの投与は、ネガティブコントロールの薬剤コンジュゲート(ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、Ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、Ｔｈｉｏコントロールｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥと比較して、腫瘍増殖の抑制を示した。他のコントロールには、ＴｈｉｏコントロールｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)、Ｔｈｉｏコントロール抗ＣＤ２２-Ｈ

C(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ＭＭＡＦ及びＴｈｉｏコントロールｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)及びコントロールｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＳＭＣＣ-ＤＭ１が含まれた。

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０ｍｍ^{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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１４

インビボ腫瘍体積低減、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＤＯＨＨ２異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１、ＭＭＡＦ及びＭＭＡＥコンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF 又は DM1 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤 /Ab)
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1.9
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1.55
ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/8	1/8	202	4	3.4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1.87
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	NA	4	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ 抗CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1.96

【０４８９】

Ｅ．ＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ(バーキットリンパ腫)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３に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ異種移植片(バーキットリンパ腫)における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１５に示す。

コントロール抗体はベヒクル(バッファ(ＡＤＣのために)単独)とした。コントロールＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)抗体ｔｈｉｏＭＡｂ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ又はＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ又はｔｈｉｏ 抗ＣＤ２２ １０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ(ＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)とした。結果を、以下の表１５に示す。

図３７Ａは、表１５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-ルシフェラーゼ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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦの投与は、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ)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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)及びｔｈｉｏ-１０Ｆ４ｖ３-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ-ＭＭＡＦが含まれる。

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０ｍｍ^{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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１５

インビボ腫瘍体積低減、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ルシフェラーゼ異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤/Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ ﾍﾞﾋｸﾙ	0/10	0/10	NA	NA	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1.55
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	2/10	0/10	27	1	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/10	0/10	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/8	1/8	28	1	1.9
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	1	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	1/10	30	1	1.96

【０４９０】

Ｆ．Ｇｒａｎｔａ-５１９(ヒトマントル細胞リンパ腫)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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ－５１９異種移植片ヒトマントル細胞リンパ腫におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１６に示す。

コントロールＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ｔｈｉｏＭＡｂ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１又はＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)とした。結果を表１６及び図３８に示す。

図３８Ａは、表１６に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤ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、表１６に示される用量の、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ－(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ ｔｈｉｏＭＡｂ薬剤コンジュゲートの投与は、コントロール薬剤コンジュゲートと比較して、腫瘍増殖の阻害を示した。

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３８Ｂ)は、これらｔｈｉｏＭａｂ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０ｍｍ^{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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１６

インビボ腫瘍体積低減、
ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ-５１９異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１及びＭＭＡＦコンジュゲート投与

			MMAF 又は DM1 (μg/m^2)	(mg/kg)	(薬剤 /Ab)
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙhu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	342	12	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	346	12	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	5/8	329	12	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1.95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1.95

【０４９１】
Ｇ．ＷＳＵ-ＤＬＣＬ２(びまん性大細胞型リンパ腫)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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＷＳＵ-ＤＬＣＬ２異種移植片(びまん性大細胞型リンパ腫)におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１７に示す。
コントロール抗体はベヒクル(バッファ(ＡＤＣのために)単独)とした。コントロールｔｈｉｏ ＭＡｂｓは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)抗体ｔｈｉｏＭＡｂｓ(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ又はＭＣ－ＭＭＡＦにコンジュゲートされたもの)とした。結果を表１７及び図３９に示す。
図３９は、表１７に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＷＳＵ-ＤＬＣＬ２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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ(０．５、１．０ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ及び４．０ｍｇ／ｋｇのＡｂ用量で)の投与は、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ、ｔｈｉｏ－ｈｕ－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１７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０ｍｍ^{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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)
表１７
インビボ腫瘍体積低減、
ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＷＳＵ-ＤＬＣＬ２異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＭＭＡＥ、ＭＭＡＦ及びＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤 /Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ ﾍﾞﾋｸﾙ	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO -DM1	0/9	0/9	114	4	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB -MMAE	0/9	0/9	92	4	1.55
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	0/9	14	0.5	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	27	1.0	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	1/9	55	2.0	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	7/9	110	4.0	1.9

【０４９２】

Ｈ．Ｇｒａｎｔａ-５１９(ヒトマントル細胞リンパ腫)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３(上記参照)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ－５１９異種移植片(ヒトマントル細胞リンパ腫)におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１８に示す。

コントロールｔｈｉｏ ＭＡｂは、ｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)(ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１にコンジュゲートされたもの)及びｔｈｉｏ ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ－ＭＭＡＥ抗体ｔｈｉｏＭＡｂとした。結果を以下の表１８に示す。

図４０Ａは、表１８に示す用量の、重鎖Ａ１１８Ｃ 抗ＣＤ７９ｂ ＴＤＣにて処置したＣＢ１７ ＳＣＩＤ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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ(１．０ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ及び４．０ｍｇ／ｋｇのＡｂ用量で)の投与は、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１及びｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ)と比較して、腫瘍増殖の阻害を示した。

さらに、表１８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０mm^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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１８

インビボ腫瘍体積減少、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ-５１９異種移植片における、Ｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１及びＭＭＡＥコンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤/Ab)
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1.55
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	1/10	13	0.5	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	0/10	27	1.0	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	7/10	54	2.0	1.87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	108	4.0	1.87

【０４９３】

Ｉ．ＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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３(上記)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤのｃｙｎｏＣＤ７９ｂを発現するＢＪＡＢ(バーキットリンパ腫)細胞(ＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ)異種移植片におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１８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ｔｈｉｏ ＭＡｂは、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ及びｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ抗体ｔｈｉｏＭＡｂとした。結果を表１９及び図５０に示す。

図５０は、表１９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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦ、並びにｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣ－ＭＭＡＦは、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＭＣｖｃＰＡＢ-ＭＭＡＥ及びｔｈｉｏ－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１９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０mm^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し、ＮＡは不適用である。(ＤＡＲ＝抗体に対する薬剤比)

表１９

インビボ腫瘍体積減少、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ異種移植片における、Ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１、ＭＭＡＦ又はＭＭＡＥ又はＴｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８ ＤＭ１、ＭＭＡＦ又はＭＭＡＥコンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 (μg/m²)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤 /Ab)
ｺﾝﾄﾛｰﾙ ﾍﾞﾋｸﾙ	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1.86
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB -MMAE	0/9	0/9	23	1	1.55
Thio ｺﾝﾄﾛｰﾙ hu-抗HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1.9
Thio 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO -DM1	3/8	1/8	53	2	1.8
Thio 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB -MMAE	1/9	2/9	27	1	1.86
Thio 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1.9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1.9

【０４９４】

Ｊ．ＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ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３(上記)に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコールを用いた類似の試験において、ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのｃｙｎｏＣＤ７９ｂを発現するＢＪＡＢ(バーキットリンパ腫)(ＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ)異種移植片におけるｔｈｉｏＭＡｂ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１９に示す。

コントロールｔｈｉｏ ＭＡｂは、ｔｈｉｏ－ｈｕ－抗ＨＥＲ２－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１、ｔｈｉｏ－ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)及びｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)抗体ｔｈｉｏＭＡｂとした。結果を表２０及び図５１に示す。

図５１は、表２０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、ｔｈｉｏ ｈｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８－ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１並びにｔｈｉｏ－抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１は、ネガティブコントロール(ｔｈｉｏ－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、ｔｈｉｏ-ｈｕ-ＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)及びｔｈｉｏ-抗ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ)が含まれた。

結果を以下の表２０に示す。表２０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２０

インビボ腫瘍体積減少、

ＣＢ１７ ＳＣＩＤマウスのＢＪＡＢ-ｃｙｎｏＣＤ７９ｂ異種移植片における、Ｔｈｉｏ 抗ｃｙｎｏ ＣＤ７９ｂ(ｃｈ１０Ｄ１０)-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１又はｔｈｉｏ ＨｕＭＡ７９ｂ.ｖ２８-ＨＣ(Ａ１１８Ｃ) ＤＭ１コンジュゲート投与

投与された抗体	PR	CR	用量 MMAF, MMAE 又は DM1 ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	DAR (薬剤 /Ab)
Thio コントロール hu-抗HER2-HC(A118C)-BMPEO -DM1	0/10	0/10	57	2	1.86
Thio コントロール huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio コントロール 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1.85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1.85
Thio 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO -DM1	0/10	0/10	27	1	1.8
Thio 抗cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO -DM1	0/10	1/10	53	2	1.8

【０４９５】

上記の文書による明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。本発明は、寄託された実施品が本発明のある態様の一つの例証として意図されているため、寄託された作製物により範囲が制限されるのではなく、機能的に均等であるあらゆる作製物は本発明の範囲内にある。本明細書中の材料の寄託は、本明細書内に記載された説明が、その最良の態様を含む本発明の任意の態様の実施を可能にするのに不十分な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特許請求の範囲を制限するものであると解釈するべきではない。実際に、本明細書で示され記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が、上記の説明により当業者には明白であり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【図１】

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCCCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

【図２】

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

シグナル配列.
アミノ酸 1-28.

膜貫通ドメイン.
アミノ酸 5-25, 159-179.

イムノグロブリンドメイン.
アミノ酸 58-124.

イムノレセプターチロシン-ベースの活性化モチーフ.
アミノ酸 193-213.

N-グリコシル化部位.
アミノ酸 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

プロテインキナーゼＣリン酸化部位.
アミノ酸 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

カゼインキナーゼⅡリン酸化部位.
アミノ酸 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

チロシンキナーゼリン酸化部位.
アミノ酸 113-120.

N-ミリストイル化部位.
アミノ酸 40-45, 118-123.

【図３】

キメラ抗ヒトＣＤ79b(chＭＡ79b)軽鎖

CACTCCCAGCTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGT
ATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCGTGCTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA
GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTTGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
AAACTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAG
TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAACTC
AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGTTAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC

【図４】

キメラ抗ヒトＣＤ79b（chMA79b）軽鎖

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図５】

キメラ抗ヒトＣＤ79b（chMA79b）重鎖

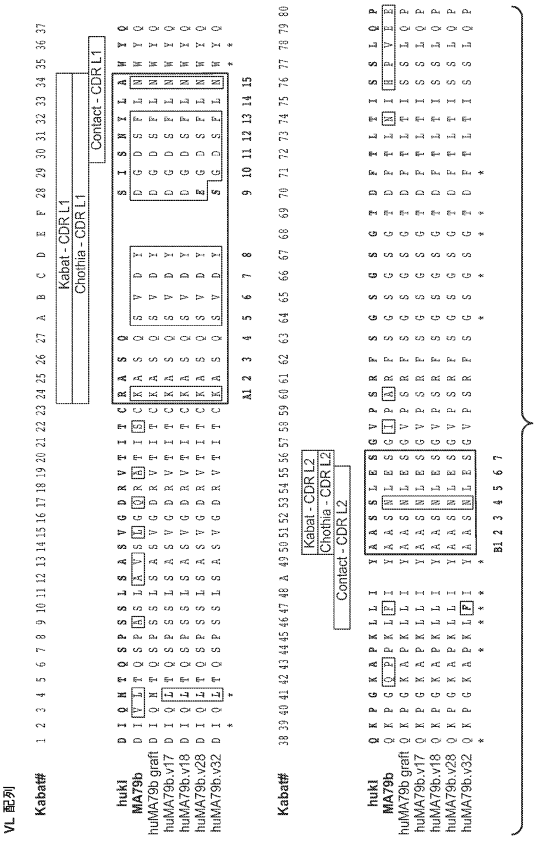
TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAA
CTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT
GGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGTTACTGGATAGA
GTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG
GTGATACTAACTACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCC
AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC
AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

【図６】

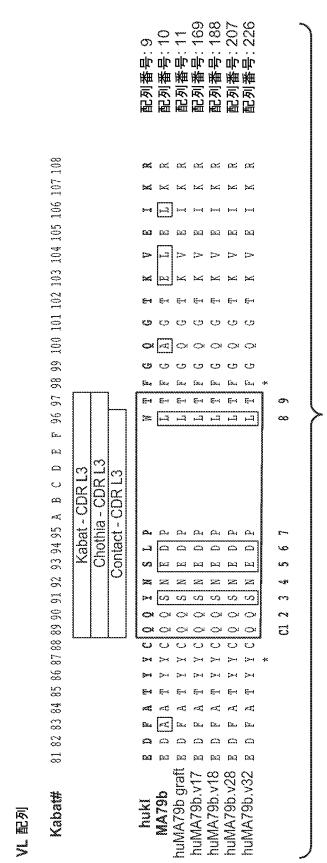
キメラ抗ヒトＣＤ79b（chMA79b）重鎖

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNY
NEIFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSASTT
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

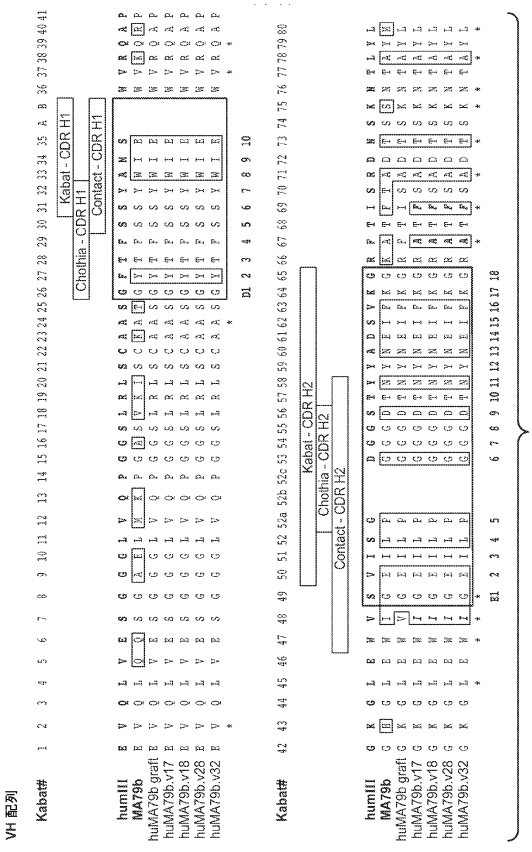
【図７Ａ】



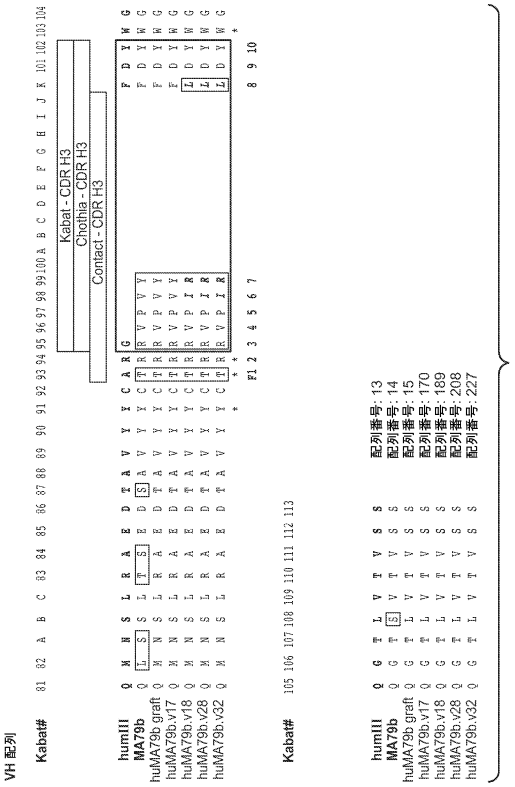
【図７Ｂ】



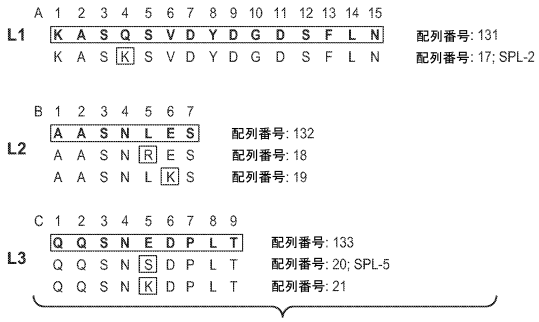
【図８Ａ】



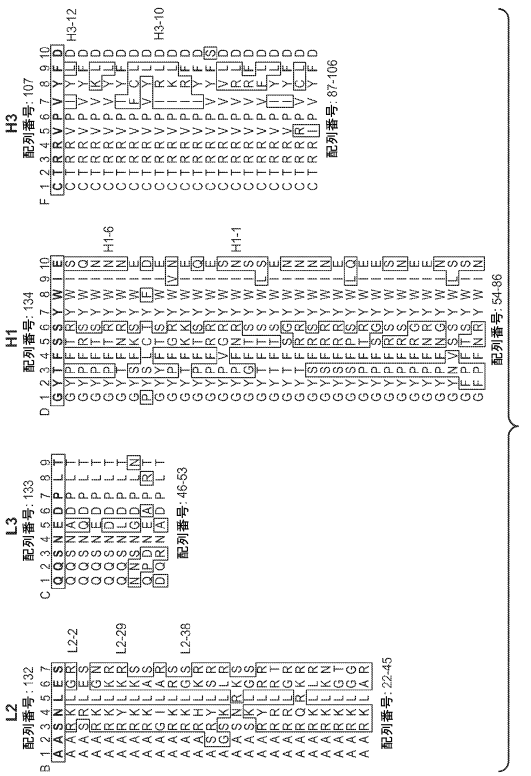
【図８Ｂ】



【図９】



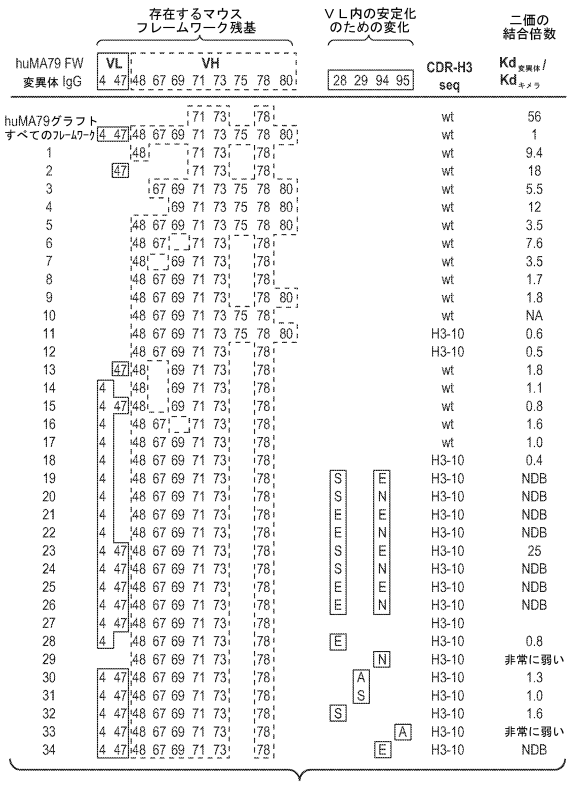
【図１０】



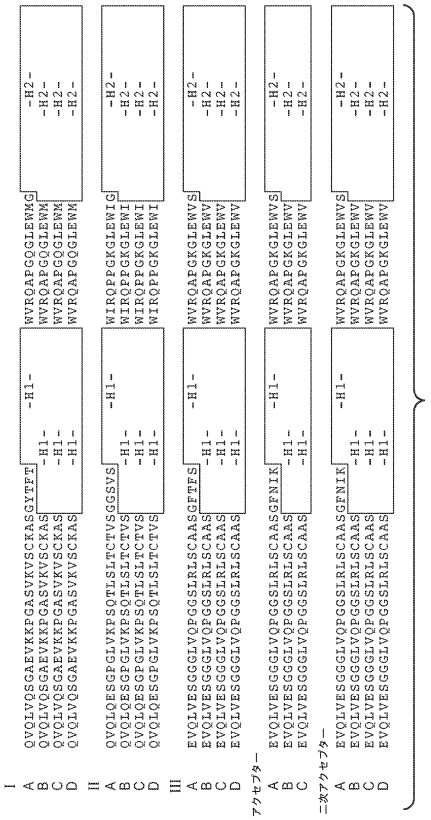
【図１１】

	Biacore KD (nM)		
MA79b 変異体 IgG	Fab	IgG	固定した抗原
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
hu MA79b graft		261	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2-2	44		hu CD79b.ecd-Fc
	39	43	hu CD79b.ecd
hu MA79b H3-10		29	hu CD79b.ecd
hu MA79b H1-6		42	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2/H3		2	hu CD79b.ecd-Fc
		3	hu CD79b.ecd
		1	16merペプチド

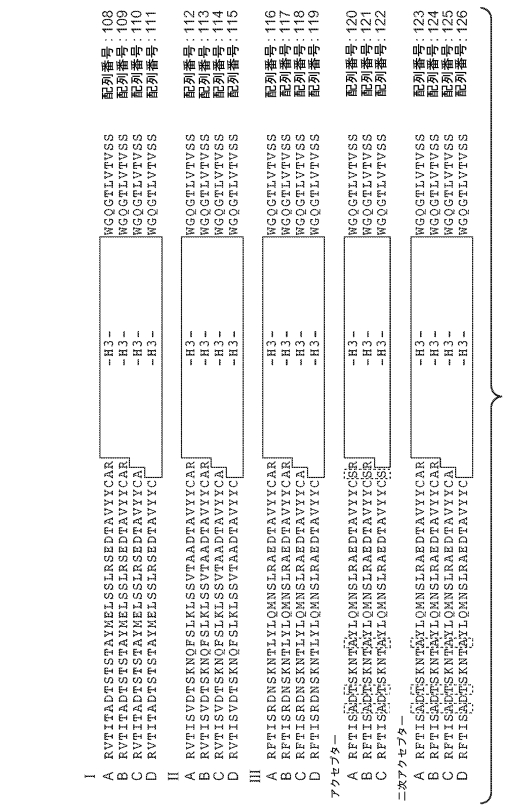
【図１２】



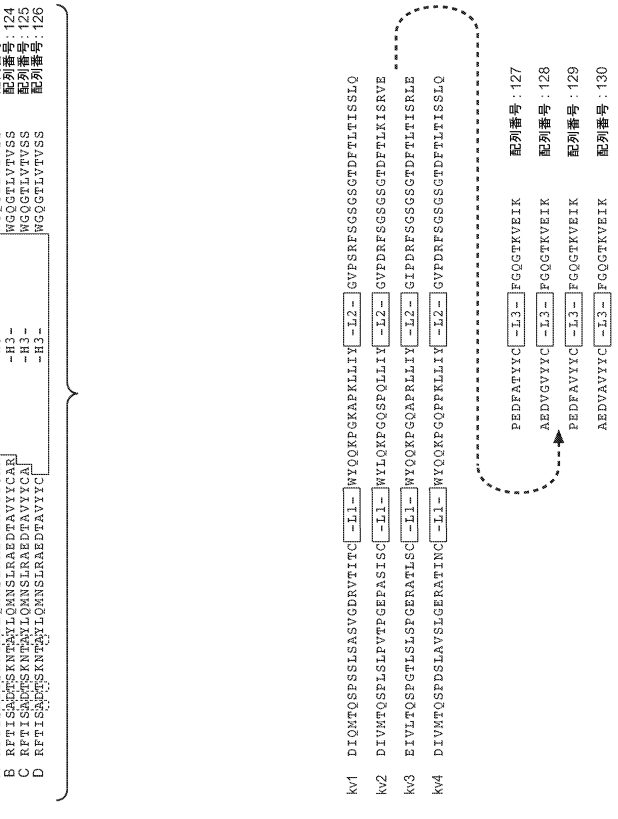
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【図１４】



【図１５】

A. huMA79b.v17 軽鎖

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号: 152)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号: 153)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号: 154)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (配列番号: 155)
HVR1-LC: KASQSVDYDGDSFLN (配列番号: 156)
HVR2-LC: AASNLES (配列番号: 157)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (配列番号: 158)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 159)

軽鎖:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (配列番号: 303)

LC-可変ドメイン:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (配列番号: 169)

B. huMA79b.v17 重鎖
FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号: 160)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (配列番号: 161)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号: 162)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (配列番号: 163)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (配列番号: 164)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号: 165)
HVR3-HC: TRRVPVYFDY (配列番号: 166)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (配列番号:167)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 168)

重鎖:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 304)

HC-可変ドメイン:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSS (配列番号: 170)

【図１６】

A. huMA79b.v18 軽鎖

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号: 171)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号: 172)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号: 173)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (配列番号: 174)
HVR1-LC: KASQSVDYDGDSFLN (配列番号: 175)
HVR2-LC: AASNLES (配列番号: 176)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (配列番号: 177)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 178)

軽鎖:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (配列番号: 305)

LC-可変ドメイン:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (配列番号: 188)

B. huMA79b.v18 重鎖
FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号: 179)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (配列番号: 180)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号: 181)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (配列番号: 182)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (配列番号: 183)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号: 184)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (配列番号: 185)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (配列番号: 186)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 187)

重鎖:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 306)

HC-可変ドメイン:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS (配列番号: 189)

【図１７】

A. huMA79b.v28 軽鎖

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号: 190)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号: 191)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号: 192)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (配列番号: 193)
HVR1-LC: KASQSVDYEGDSFLN (配列番号: 194)
HVR2-LC: AASNLES (配列番号: 195)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (配列番号: 196)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 197)

軽鎖:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 307)

B. huMA79b.v28 重鎖
FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号: 198)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (配列番号: 199)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号: 200)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (配列番号: 201)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (配列番号: 202)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号: 203)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (配列番号: 204)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (配列番号: 205)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 206)

重鎖:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRA TFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 308)

【図１８】

A. huMA79b.v32 軽鎖

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号: 209)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLFIY (配列番号: 210)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号: 211)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (配列番号: 212)
HVR1-LC: KASQSVDYSGDSFLN (配列番号: 213)
HVR2-LC: AASNLES (配列番号: 214)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (配列番号: 215)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 216)

軽鎖:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPKLFIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (配列番号: 309)

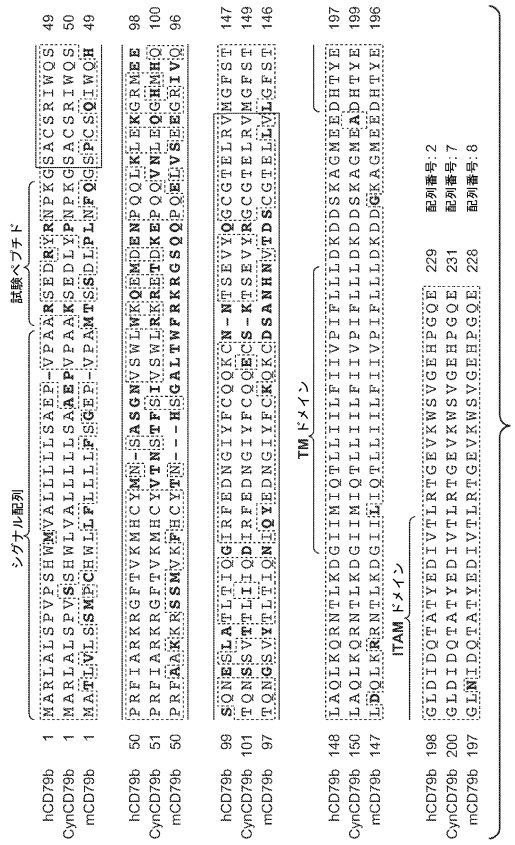
LC-可変ドメイン:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPKLFIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (配列番号: 226)

B. huMA79b.v32 重鎖
FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号: 217)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (配列番号: 218)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号: 219)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (配列番号: 220)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (配列番号: 221)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (配列番号: 222)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (配列番号: 223)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (配列番号: 224)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 225)

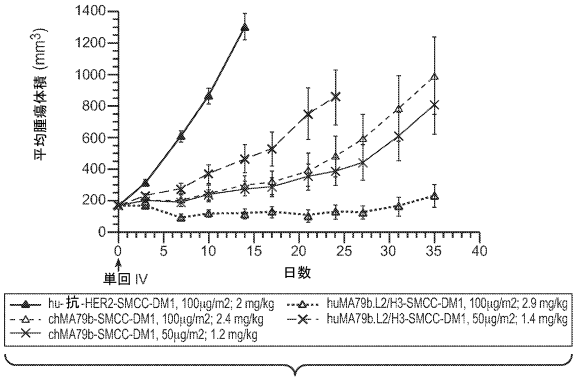
重鎖:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 310)

HC-可変ドメイン:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS (配列番号: 227)

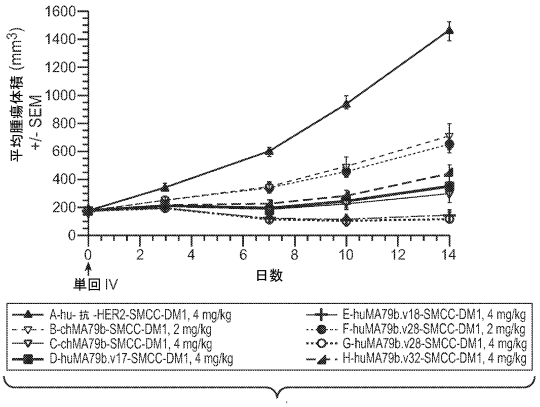
【図１９】



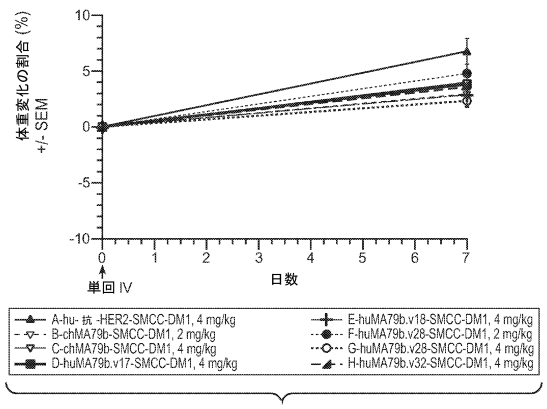
【図２０】



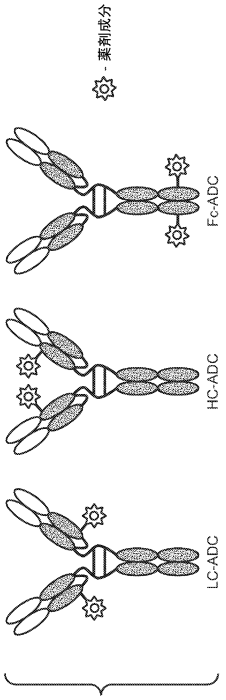
【図２１Ａ】



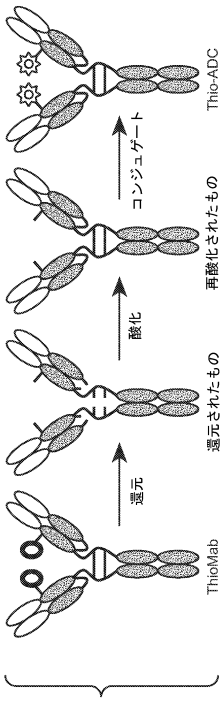
【図２１Ｂ】



【図２２】



【図２３】



【図２４】

抗-CD79b A118C huMA79b.v17 システイン改変重鎖ThioMab

A. 軽鎖配列
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC（配列番号：229）

B. 重鎖配列
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD
TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
（配列番号：228）

【図２５】

抗-CD79b A118C huMA79b.v18 システイン改変重鎖ThioMAb

A. 軽鎖配列
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC（配列番号：231）

B. 重鎖配列
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号：230）

【図２６】

抗-CD79b A118C huMA79b.v28 システイン改変重鎖ThioMAb

A. 軽鎖配列
Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC（配列番号：233）

B. 重鎖配列
Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号：232）

【図２７】

抗-CD79b V205C chMA79b システイン改変軽鎖ThioMAb

A. 軽鎖配列
Thio chMA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PCTKSFNRGEC（配列番号：235）

B. 重鎖配列
Thio chMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号：234）

【図２８】

抗-CD79b A118C chMA79b システイン改変重鎖ThioMAb

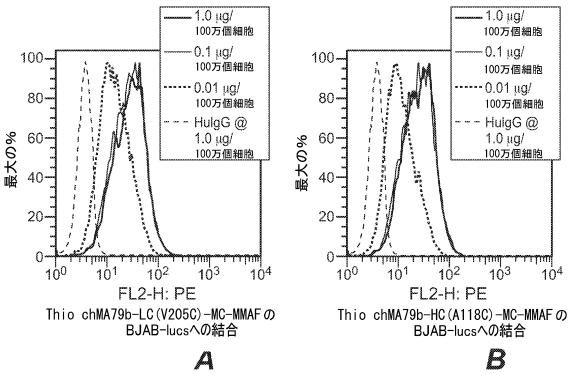
A. 軽鎖配列
Thio chMA79b-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC（配列番号：237）

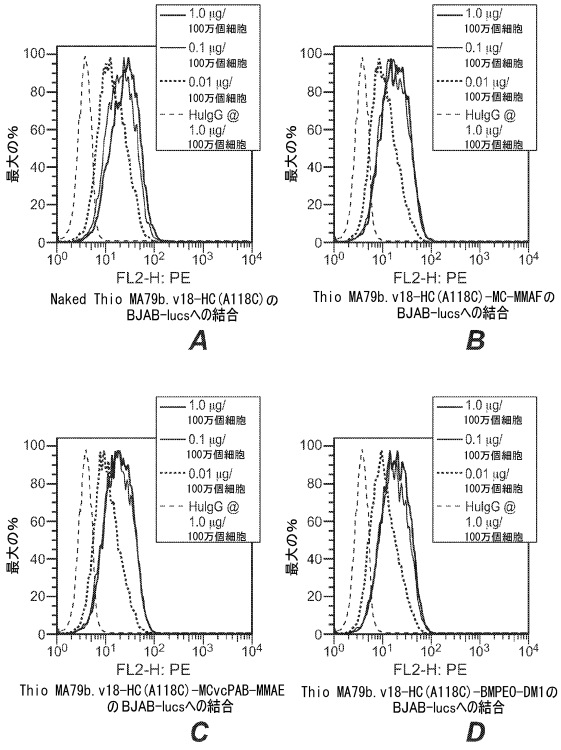
B. 重鎖配列
Thio chMA79b-HC-A118C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号：236）

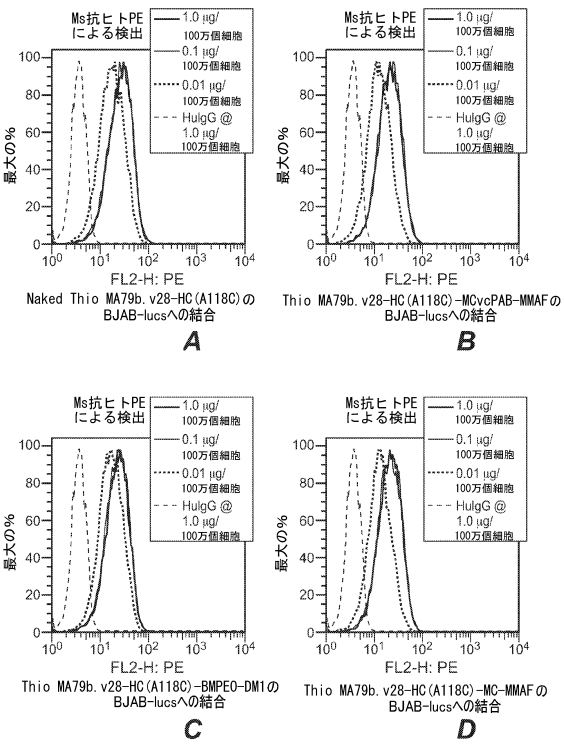
【図２９】



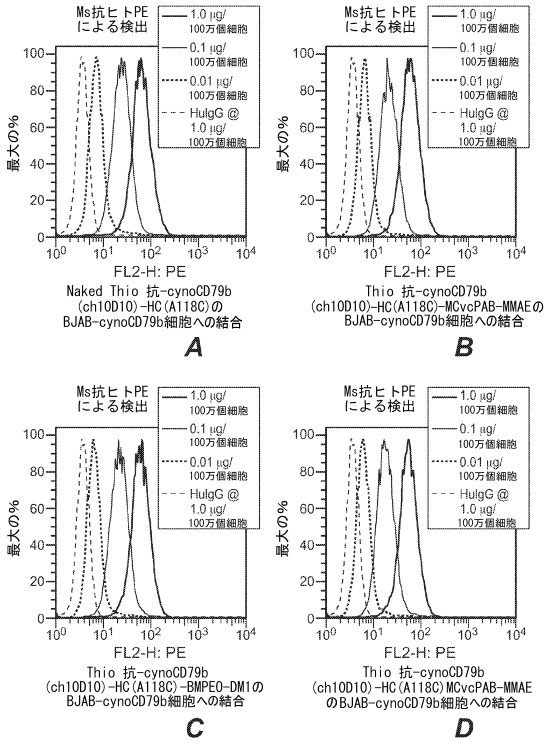
【図３０】



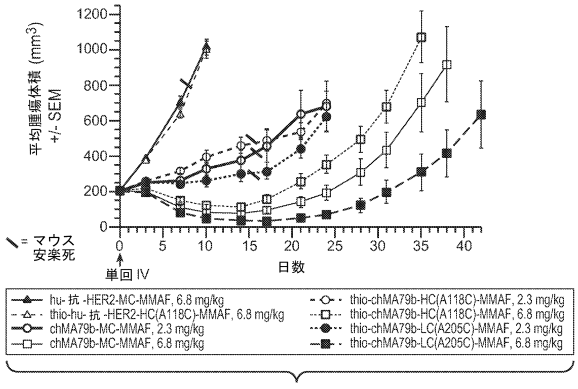
【図３１】



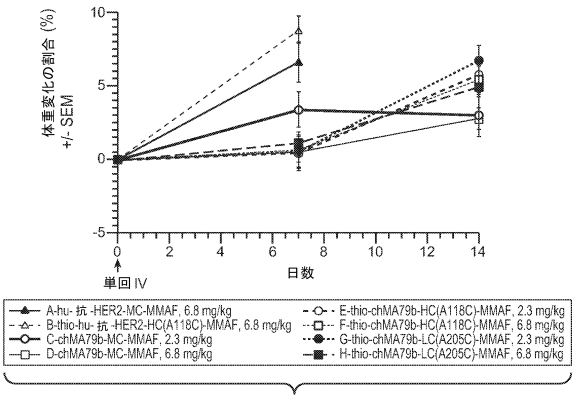
【図３２】



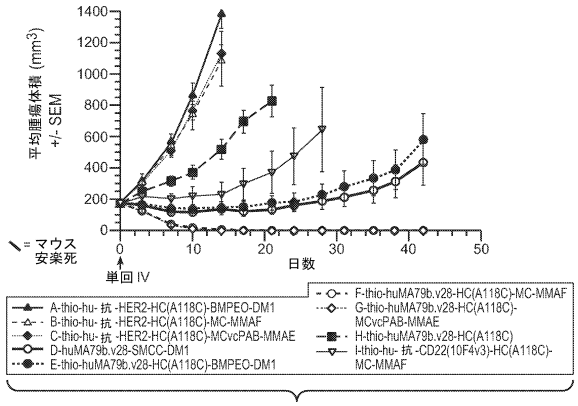
【図３３Ａ】



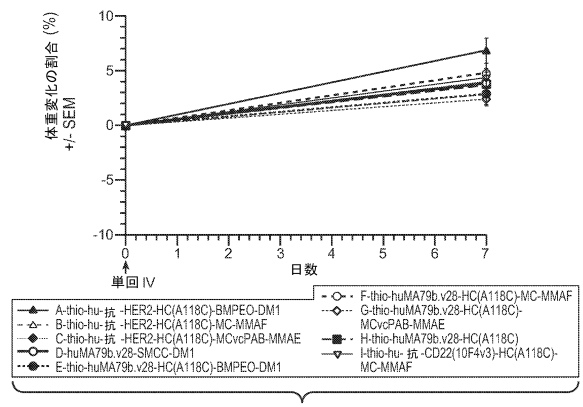
【図３３Ｂ】



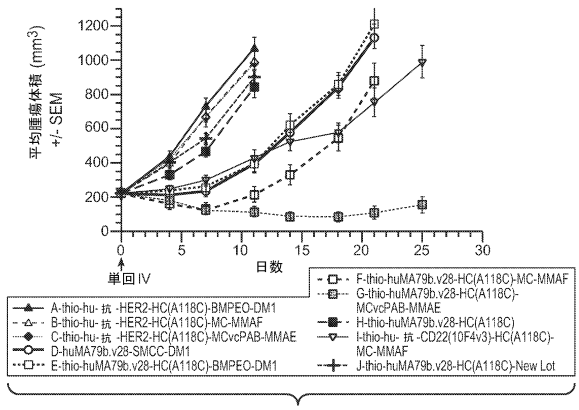
【図３４Ａ】



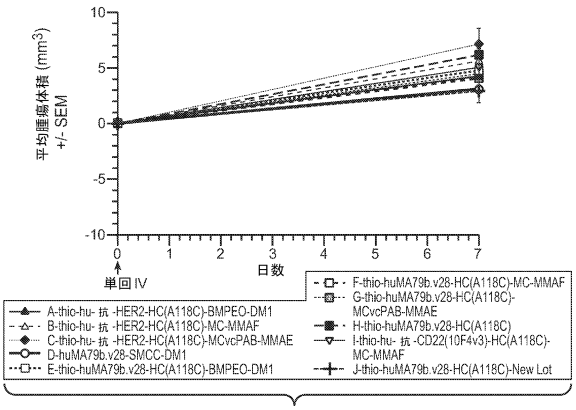
【図３４Ｂ】



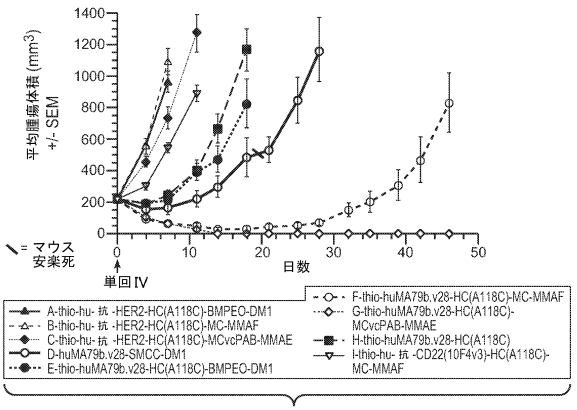
【図３５Ａ】



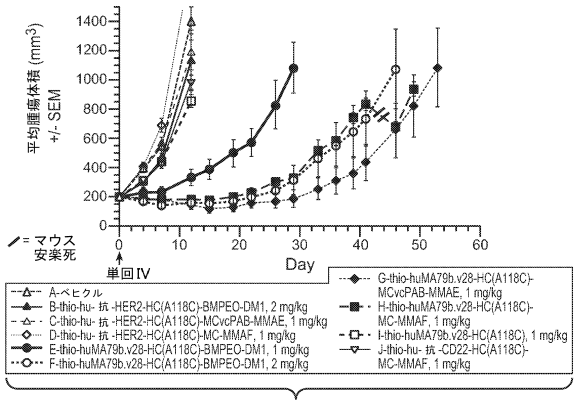
【図３５Ｂ】



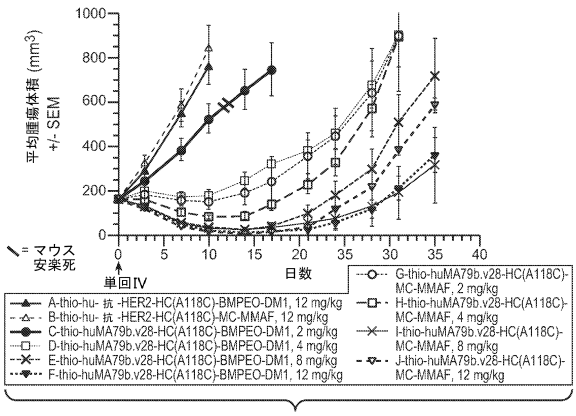
【図３６】



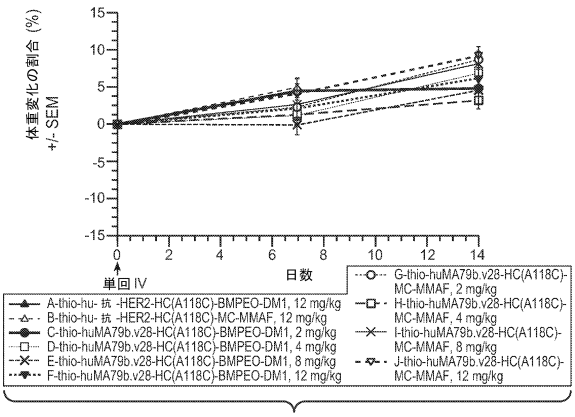
【図３７】



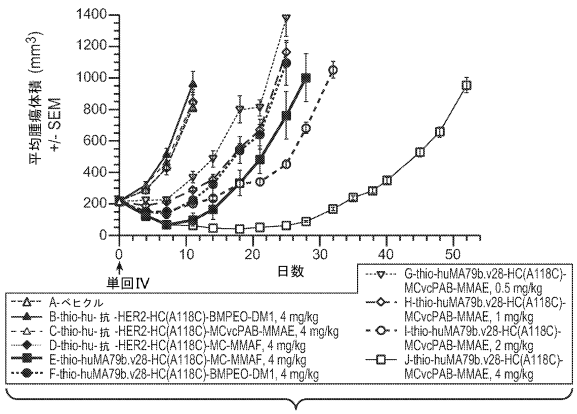
【図３８Ａ】



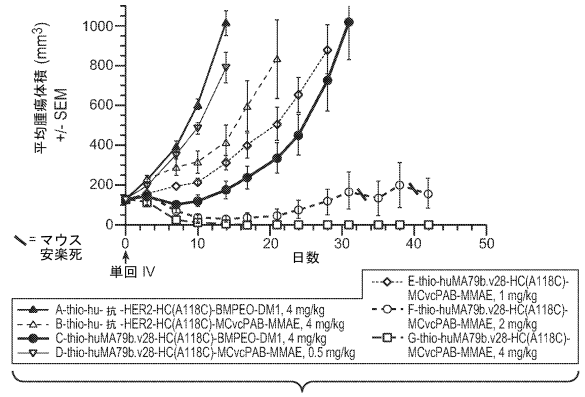
【図３８Ｂ】



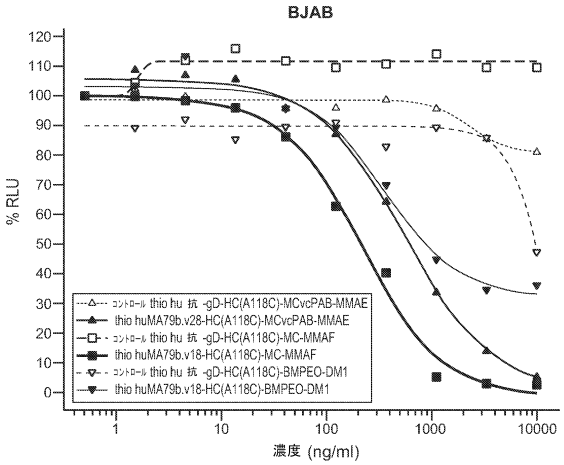
【図３９】



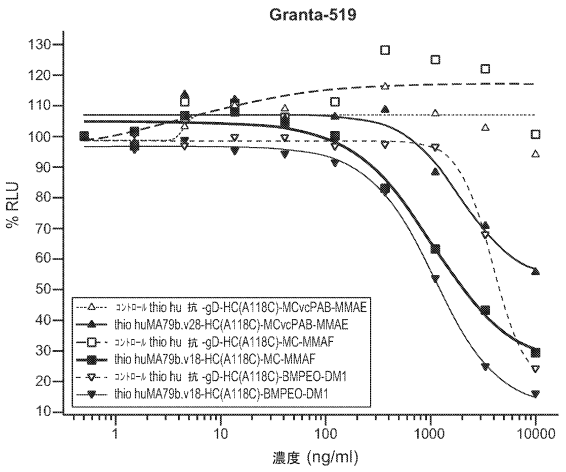
【図４０】



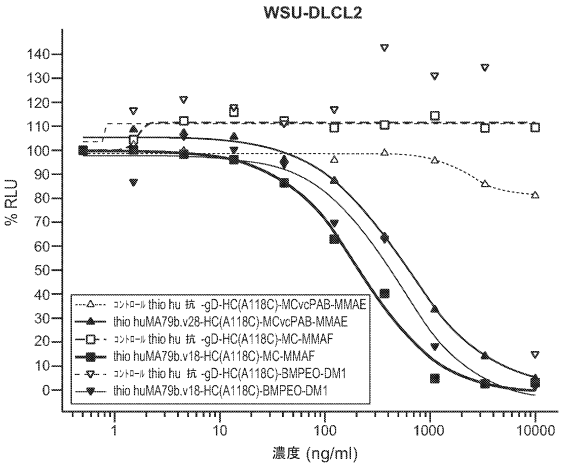
【図４１Ａ】



【図４１Ｂ】



【図４１Ｃ】



【図４２】

<p1.cynoCD79b

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG
CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT
TGCCCTTGGGGACAGAGCAGTGACC**ATG**GCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGCCACTGGC
TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG
TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCTCGGATCTGGCAGAGCCCACGTTTCATAGCCAGGAA
ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC
TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG
ACCCAAAACAGCTCTGTCACCACCCTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA
CTTCTGTCAGCAGGAGTGCAGCAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG
TCATGGGGTTCAGCACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG
ATCCAGACGCTGCTGATCATCCTCTTCATCATCGTGCCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA
CAGCAAGGCCGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT
ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG
GAG**TGA**GAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

【図４３】

<p1.cynoCD79b
DNA548455

MARLALSPVSSHWLVALLLLLSAAEPVPAAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIY
FCQQECSKTSEVYRGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL
DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

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.
イムノグロブリンドメイン
アミノ酸　59-126.
イムノレセプターチロシン-ベースの活性化モチーフ
アミノ酸　195-215.
イムノグロブリンV-setドメイン
アミノ酸　44-145.
N-グリコシル化部分
アミノ酸　70-73, 103-106.
cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸　81-84.
プロテインキナーゼCリン酸化部位
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４４】

キメラ　抗-CYNO CD79b (ch10D10) 軽鎖

ACCTCGGTTC TATCGATTGA ATTCCACCAT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTTCTAGT
AGCAACTGCA ACTGGAGTAC ATTCAGATAT CGTGCTGACC CAATCTCCAC CCTCTTTGGC
TGTGTCTCTA GGGCAGAGGG CCACCATATC CTGCAGAGCC AGTGAAAGTG TTGATAGTTA
TGGCAAAACT TTTATGCACT GGCACCAGCA GAAACCAGGA CAGCCACCCA AACTCCTCAT
CTATCGTGTA TCCAACCTAG AATCTGGGAT CCCTGCCAGG TTCAGTGGCA GTGGGTCAAG
GACAGACTTC ACCCTCACCA TTAATCCTGT GGAGGCTGAT GATGTTGCAA CCTATTACTG
TCAGCAAAGT AATGAGGATC CGTTCACGTT CGGTGGAGGC ACCAAGCTGG AAATCAAACG
GACCGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG
AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG
CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA
ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG
CTTCAACAGG GGAGAGTGTT AAGCTTGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA
TAATGGTTAC AAATAAAGCA

【図４５】

キメラ　抗-CYNO CD79b (ch10D10) 軽鎖

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図４６】

キメラ　抗-CYNO CD79b (ch10D10) 重鎖

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTTCTAG
TAGCAACTGC AACTGGAGTA CATTCAGAAG TTCAGCTGCA GGAGTCGGGA CCTGGCCTGG
TGAAACCTTC TCAGTCTCTG TCCCTCACCT GCACTGTCAC TGGCTACTCA ATCACCAGTG
ATTATGCCTG GAACTGGATC CGGCAGTTTC CAGGAAACAA ACTGGAGTGG ATGGGCAACA
TATGGTACAG TGGTAGCACT ACCTACAACC CATCTCTCAA AAGTCGAATC TCTATCACTC
GAGACACATC CAAGAACCAG TTCTTCCTGC AGTTGAATTC TGTGACTTCT GAGGACACAG
CCACATATTA CTGTTCAAGA ATGGACTTCT GGGGTCAAGG CACCACTCTC ACAGTCTCCT
CAGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT
CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA
CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
CCAAATCTTG TGACAAAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAAG
AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAGTGCG ACGGCCCTAG AGTCGACCTG
CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

【図４７】

キメラ　抗-CYNO CD79b (ch10D10) 重鎖

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【図４８】

抗-cyno CD79b ch10D10 A118C システイン改変重鎖ThioMAb

A. 軽鎖配列
Thio- 抗 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （ 配列番号 ： 245）

B. 重鎖配列
Thio- 抗 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (HC)

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG （ 配列番号 ： 244）

【図４９】

抗-cyno CD79b ch10D10 V205C システイン改変軽鎖 ThioMAb

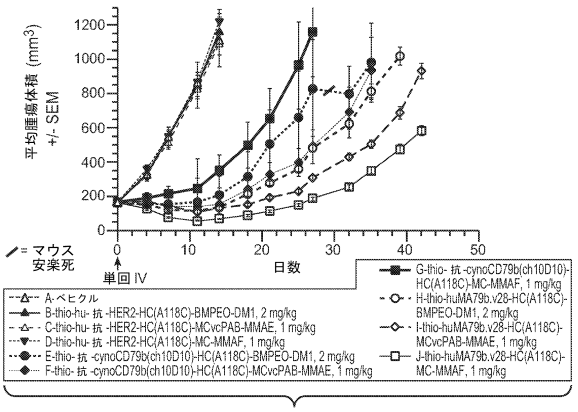
A. 軽鎖配列
Thio- 抗 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (LC)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC （ 配列番号 ： 300）

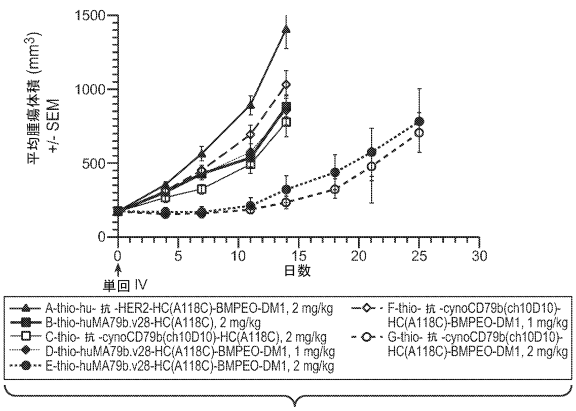
B. 重鎖配列
Thio- 抗 -cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (HC)

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG （ 配列番号 ： 299）

【図５０】



【図５１】



【配列表】
0006545643000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	T
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/02	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	L
A61K 31/537	*(2006.01)*	A61P	43/00	105
A61K 49/16	*(2006.01)*	A61K	31/537	
G01N 33/53	*(2006.01)*	A61K	49/16	
G01N 33/533	*(2006.01)*	G01N	33/53	D
G01N 33/534	*(2006.01)*	G01N	33/533	
G01N 33/566	*(2006.01)*	G01N	33/534	
		G01N	33/566	

(31)優先権主張番号 61/054,709
(32)優先日 平成20年5月20日(2008.5.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 12/173,465
(32)優先日 平成20年7月15日(2008.7.15)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US2008/070088
(32)優先日 平成20年7月15日(2008.7.15)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ドーナン, デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, サン マテオ, ショアライン ドライヴ 1058
(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 94080, サウス サン フランシスコ, メープル アヴェニュー 524
(72)発明者 ジュニュチュラ, ジャガス, レッディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, フレモント, トゥペロ ストリート 34391
(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 94131, サン フランシスコ, バークレイ ウェイ 281
(72)発明者 ジェン, ビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040, マウンテン ヴュー, モンテレナ コート 156

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第2006／034488（WO, A1）
BLOOD, 2007年, Vol.110, No.2, p.616-623
BLOOD, 1993年, Vol.81, No.1, p.84-94

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00
C12N 15/00
UniProt/GeneSeq
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)