

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-501163

(P2010-501163A)

(43) 公表日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D 4 B O 6 4
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 B O 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C O 8 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-524812 (P2009-524812)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成19年8月17日 (2007.8.17)		スイス国 ツェーハー-4002 バーゼル, リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月11日 (2009.3.11)	(71) 出願人	500570793
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/076160		ゾーマ テクノロジー リミテッド
(87) 國際公開番号	W02008/022295		アメリカ合衆国 カリフォルニア 947 10, パークレー, セブンス ストリート 2910
(87) 國際公開日	平成20年2月21日 (2008.2.21)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/838,648	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成18年8月18日 (2006.8.18)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/946,360		
(32) 優先日	平成19年6月26日 (2007.6.26)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P R L R特異的抗体およびその使用

(57) 【要約】

P R L R 特異的抗体を、このような抗体を含有す薬剤組成物、薬剤組成物を含有するキットおよび癌を予防および治療する方法とともに提供する。一実施形態において、本発明は、平衡解離定数 (K_D) が 10^{-6} M 以下であり、P R L Rとの結合について 75 % を超えて、抗体 c h X H A . 0 6 . 6 4 2 、 c h X H A . 0 6 . 2 7 5 、 h e . 0 6 . 6 4 2 - 1 、 h e . 0 6 . 6 4 2 - 2 、 h e . 0 6 . 2 7 5 - 1 、 h e . 0 6 . 2 7 5 - 2 、 h e . 0 6 . 2 7 5 - 3 、 h e . 0 6 . 2 7 5 - 4 、 X P A . 0 6 . 1 2 8 などのいずれかと競合する、P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

平衡解離定数 (K_D) が 10^{-6} M 以下であり、PRLRとの結合について 75 % を超えて、抗体

【化34】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1,
he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130,
XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159,
XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192,
XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212,
XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239,
XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189,
または XHA.06.907

10

のいずれかと競合する、PRLRの細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 2】

抗体

20

【化35】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1,
he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131,
XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163,
XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202,
XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217,
XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145,
XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

30

のいずれかと同じ PRLR のエピトープと結合する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体

【化36】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2,
he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131,
XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163,
XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202,
XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217,
XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145,
XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

40

のいずれかの 1、2、3、4、5 または 6 つの CDR を含む抗体。

【請求項 4】

キメラ抗体、ヒト化抗体、human engineered 抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体または抗体断片である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗体。

50

【請求項 5】

C D R 内の少なくとも 1 個のアミノ酸が、別の抗 P R L R 抗体の対応する C D R の対応する残基によって置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 6】

C D R 内の 1 または 2 個のアミノ酸が修飾されている、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 7】

以下：

【化 3 7】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-

10

2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129,

XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158,

XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181,

XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210,

XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235,

XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275,

XHA.06.189, または XHA.06.907

20

の抗体に対して、可変軽鎖または重鎖領域のいずれかにわたって、少なくとも 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 % 同一性を保持する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

ヒト抗体配列の定常領域と、ヒト抗体配列の 1 以上の重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域とを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 9】

前記ヒト抗体配列が、個々のヒト配列、ヒトコンセンサス配列、個々のヒト生殖系配列またはヒトコンセンサス生殖系配列である、請求項 8 に記載の抗体。

30

【請求項 10】

重鎖定常配列が、修飾または非修飾 Ig G、Ig M、Ig A、Ig D、Ig E、それらの断片またはそれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 11】

重鎖定常領域が、修飾または非修飾 Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3 または Ig G 4 である、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

P R L R に対して、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} または 10^{-9} M 以下の平衡解離定数を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 13】

前記 C D R 中に保存的置換を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の抗体。

40

【請求項 14】

低いおよび中程度の危険度の残基における保存的または非保存的変更を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 15】

軽鎖定常領域が、修飾または非修飾 軽鎖定常領域、軽鎖定常領域、それらの断片またはそれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 16】

P R L R 二量体化を阻害する、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 17】

50

P R L R 細胞内リン酸化を阻害する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 8】

M A P K リン酸化の誘導を阻害する、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 9】

S t a t 5 リン酸化の誘導を阻害する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 0】

A K T リン酸化の誘導を阻害する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 1】

P R L の P R L R との結合を阻害する、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 2】

V E G F 産生および / または血管形成を阻害する、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 3】

癌細胞の増殖を阻害する、請求項 1 ~ 2 2 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 4】

乳癌、前立腺癌または肺癌の細胞の増殖を阻害する、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

別の診断薬または治療薬とコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 6】

癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法であって、該方法は、

P R L R の E C D を含むポリペプチドを、抗体

【化 3 8】

chXHA.06.642,

chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-
4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147,
XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171,
XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206,
XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229,
XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642,
XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, および XHA.06.907

の少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 または 6 つの C D R を含む候補抗体と接触させるステップと、

該候補抗体の、該ポリペプチドに対する結合親和性を検出するステップと、

1 0 --^6 M 以下の平衡解離定数が検出される場合に、該候補抗体を、癌の治療に有用な抗体として同定するステップと

を含む方法。

【請求項 2 7】

抗体を系統的に変更し、癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法であって、該方法は、

抗体

10

20

30

40

【化 3 9】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1,
 he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129,
 XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158,
 XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181,
 XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210,
 XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235,
 XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275,
 XHA.06.189, および XHA.06.907

10

の C D R 内の 1 または 2 個のアミノ酸に対する修飾を含む候補抗体を調製するステップと

、
 P R L R の E C D を含むポリペプチドを、該候補抗体と接触させるステップと、
 該候補抗体の、該ポリペプチドに対する結合親和性を検出するステップと、

10^{-6} M 以下の平衡解離定数が検出される場合に、該候補抗体を、癌の治療に有用な
 抗体として同定するステップと

を含む方法。

20

【請求項 2 8】

癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法であって、該方法は、

乳房、肺または前立腺の細胞を、抗体

【化 4 0】

chXHA.06.642, chXHA.06.275,
 he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128,
 XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148,
 XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178,
 XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207,
 XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233,
 XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983,
 XHA.06.275, XHA.06.189, および XHA.06.907

30

の少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの C D R を含む候補抗体または 1 つ以上の C D R 内の 1 個または 2 個のアミノ酸の修飾を含む抗体と接触させるステップと、

該細胞の増殖または生存を検出するステップと、

40

細胞増殖または生存の低減が検出される場合に、該候補抗体を、癌の治療に有用な抗体として同定するステップと

を含む方法。

【請求項 2 9】

癌を患っている被験体を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 1 ~ 2 8 のいずれかに記載の抗体を投与するステップを含む、方法。

【請求項 3 0】

前記癌が乳癌、肺癌または前立腺癌である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

第 2 の治療薬を投与する、請求項 3 0 に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

前記第2の治療薬がドキソルビシンまたはダウノルビシンである、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記抗体がchXHA.06.642、chXHA.06.275、he.06.642-1、he.06.642-2、he.06.275-1、he.06.275-2、he.06.275-3、he.06.275-4である、請求項32に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記被験体がPRLR発現およびHER2-neu発現について陽性であり、前記の第2の治療薬が抗Her2-neu抗体である、請求項30に記載の方法。 10

【請求項 3 5】

前記被験体がPRLR発現およびER発現について陽性であり、前記第2の治療薬が抗ER抗体である、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記被験体を、放射線療法または手術で、さらに治療する、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 7】

PRLRを発現する腫瘍細胞をターゲッティングする方法であって、放射性核種またはその他の毒素とコンジュゲートしている、請求項1～36のいずれかに記載の抗体を投与するステップを含む方法。

【請求項 3 8】

前記被験体が哺乳類である、請求項30から37に記載の方法。 20

【請求項 3 9】

前記被験体がヒトである、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項1から23のいずれかに記載の抗体の重鎖または軽鎖をコードするスクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 4 1】

調節制御配列と作動可能に連結している、請求項40に記載の核酸分子を含む発現ベクター。 30

【請求項 4 2】

請求項41に記載のベクターまたは請求項40に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 4 3】

抗体を作製するために請求項42に記載の宿主細胞を用いる方法であって、請求項36に記載の宿主細胞を、適した条件下で培養するステップと、該抗体を回収するステップとを含む方法。

【請求項 4 4】

請求項43に記載の方法によって作製される抗体。

【請求項 4 5】

重量で少なくとも95%の均一性まで精製される、請求項1から23または44のいずれかに記載の抗体。 40

【請求項 4 6】

請求項45に記載の抗体と、製薬上許容される担体とを含む薬剤組成物。

【請求項 4 7】

容器にパッケージングされた、治療上有効な量の本発明の抗体を含む、請求項1～46のいずれかに記載の抗体を含むキットであって、該キットは、第2の治療薬を場合により含んでいてもよく、該容器に取り付けられた、またはともにパッケージングされたラベルをさらに含み、該ラベルが該容器の内容物を記載し、癌を治療するための該容器の内容物の使用に関する指示および/または使用説明書を提供する、キット。

【請求項 4 8】

前記容器がバイアルまたはピンまたはプレフィルドシリンジである、請求項47に記載の 50

キット。

【請求項 4 9】

配列番号

【化 4 1】

21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69,
71, 73, 75, 82, 84, 86, 88, 91, 95 および 96

からなる群から選択される可変軽鎖アミノ酸配列を含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 0】

配列番号

【化 4 2】

20, 2, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60,
62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 83, 85, 87, 89, 90, 93, 94, 97 および 98

からなる群から選択される可変重鎖アミノ酸配列を含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 1】

配列番号 8 8 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 8 9 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 2】

配列番号 8 8 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 0 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 3】

配列番号 9 1 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 3 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 4】

配列番号 9 1 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 4 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 5】

配列番号 9 2 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 3 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 6】

配列番号 9 2 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 4 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 7】

配列番号 9 5 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 7 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 8】

配列番号 9 5 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 8 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 5 9】

配列番号 9 6 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 7 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 6 0】

配列番号 9 6 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 8 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 6 1】

マウス P R L R の細胞外ドメインの多くとも 10、000 分の 1 ~ 15, 000 分の 1 の平衡解離定数 (K_D) を有する、ヒト P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

h e . 0 6 . 2 7 5 - 4 と同一のエピトープと結合する、請求項 6 1 に記載の抗体。

【請求項 6 3】

ヒト P R L R の細胞外ドメイン、マウス P R L R の細胞外ドメインおよびラット P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 6 4】

10^{-6} M 以下の平衡解離定数 (K_D) を有する、ヒト、マウスおよびラット P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

【請求項 6 5】

h e . 0 6 . 6 4 2 - 2 と同一のエピトープと結合する、請求項 6 4 に記載の抗体。

【請求項 6 6】

請求項 1 から 2 3 および 4 9 から 6 5 のいずれか一項に記載の抗 P R L R 抗体を用いる治療を必要とする被験体を同定する方法であって、該方法は、

(a) 該被験体からサンプルを得るステップと、
 (b) 該サンプルを、P R L R 、J a k 2 、M a p k 、S t a t 5 、E r k 1 / 2 および / または A k t のリン酸化のレベルについて分析するステップとを含み、

P R L R 、J a k 2 、M a p k 、S t a t 5 、E r k 1 / 2 および / または A k t のリン酸化のレベルが、抗 P R L R 抗体を用いる治療を必要としていることを示す方法。

【請求項 6 7】

癌に罹患した被験体において癌治療をモニタリングする方法であって、

(a) 該被験体から得た第 1 のサンプルを、癌治療薬を用いる治療の開始に先立って P R L R のリン酸化のレベルについて分析するステップと、

(b) 該癌治療薬を用いる治療の開始後の第 2 のサンプルを分析するステップとを含み、

該癌治療薬を用いた治療の開始後のリン酸化 P R L R のレベルの低減が、該患者が治療上有効な用量の該癌治療薬を受けていることを示す、方法。

【請求項 6 8】

前記癌治療薬が請求項 1 から 2 3 および 4 9 から 6 5 のいずれか一項に記載の抗体である、請求項 6 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願への相互参照**

この出願は、2 0 0 7 年 6 月 2 6 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 9 4 6 , 3 6 0 号および 2 0 0 6 年 8 月 1 8 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 8 3 8 , 6 4 8 号への優先権を主張する。

【0 0 0 2】

本発明は、P R L R 特異的抗体を投与することによって癌を予防および治療する方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

癌は、米国では第 2 位の死因である。「癌」は、多数の異なる種類の癌、すなわち、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌を記載するために用いられるが、各種類の癌は、表現型レベルおよび遺伝子レベルの両方で異なる。癌の未制御の増殖特徴は、1 種以上の遺伝子の発現が、突然変異のために調節不全になり、細胞増殖がもはや制御され得ない場合に生じる。

【0 0 0 4】

遺伝子は、2 つのクラス、発癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子に分類されることが多い。発癌遺伝子とは、その正常な機能が、特定の条件下のみで、細胞増殖を促進することであ

10

20

30

40

50

る遺伝子である。発癌遺伝子が突然変異を獲得すると、その制御を失い、すべての条件下で増殖を促進する。しかし、癌が本当に上手くいくには、癌が腫瘍抑制遺伝子において突然変異を獲得しなくてはならないということがわかっている。腫瘍抑制遺伝子の正常な機能は、細胞増殖を停止することである。腫瘍抑制遺伝子の例として、p53、p16、p21およびAPCが挙げられ、これらのすべては、正常に作用する場合には、細胞が、無制限に分裂し、増殖するのを停止する。腫瘍抑制遺伝子が突然変異されるか、失われると、細胞増殖に対する抑制も失われ、そして細胞が制限なく増殖することが可能となる。

【0005】

プロラクチン受容体(PRLR)は、サイトカインスーパーファミリーのメンバーの受容体、例えば、IL2、IL3、IL4、IL6、IL7、エリスロポエチンおよびGM-CSFの受容体と相同である、一回膜貫通型クラス1サイトカイン受容体である。PRLRは、複数の生物学的機能、例えば、細胞増殖、分化、発達、乳汁分泌および再生に関与している。内因性のチロシンキナーゼ活性はなく、リガンド結合は受容体二量体化、Jak2の交差リン酸化および下流シグナル伝達をもたらす。ヒトプロラクチン受容体cDNAは、最初、肝細胞腫および乳癌ライブラリーから単離された(非特許文献1)。又クレオチド配列から、ラット肝臓PRL受容体よりもかなり長い細胞質ドメインを有する、598個のアミノ酸の成熟タンパク質が予測された。プロラクチン受容体遺伝子は、5'；13-p12にマッピングされている成長ホルモン受容体遺伝子と同一染色体領域中に存在する(Arden、K.C.らCytogenet. Cell Gene 53:161~165頁、1990年; Arden, K.C.ら、(要約)AM.J.Hum.Genet. 45(付録):A129のみ、1989年)。成長ホルモンはまた、プロラクチン受容体とも結合し、この受容体を活性化する。

10

20

30

40

【0006】

ヒトPRLR遺伝子のゲノム構成は決定されている(非特許文献2)。PRLR遺伝子の5'-プライム-非翻訳領域は、2つの代替第1エキソン、E13、ラットおよびマウスE13のヒト対応物と、E1Nと呼ばれる代替第1エキソンの新規ヒト型とを含む。5'-プライム-非翻訳領域はまた、共通の非コードエキソン2および転写開始コドンを含むエキソン3の一部を含む。E13およびE1Nエキソンは、互いに800塩基対内にある。これら2種のエキソンは、ヒト乳房組織、乳癌細胞、生殖腺および肝臓において発現される。概して、E13を含有する転写物は、ほとんどの組織に広がっている。PRLR遺伝子産物は、エキソン3~10によってコードされ、そのうちエキソン10は、細胞内ドメインのほとんどをコードする。E13およびE1Nエキソンは、それぞれ、代替プロモーターP1IIおよびPNから転写される。P1IIプロモーターは、げっ歯類プロモーターにおけるものと同一であり、ラットおよびマウスにおける領域-480/-106と81%同様であるSp1およびC/EBPエレメントを含む。PNプロモーターは、ETSファミリータンパク質の推定結合部位および核受容体の半分の部位を含む。

【0007】

PRLRは、その細胞質ドメインの長さが異なる、いくつかの異なるアイソフォームで存在する。ヒト皮下腹部脂肪組織および乳房脂肪組織では、4種のPRLR mRNAアイソフォーム(L、I、S1aおよびS1b)が実証されている(非特許文献3)。さらに、彼らは、イムノプロット分析を用いて、ヒト皮下腹部脂肪組織および乳房脂肪組織において、L-PRLRおよびI-PRLRタンパク質発現を検出した。PRLRは、対照と比較して、ヒト脂肪組織においてリポタンパク質リバーゼ活性を低下させた。Lingらは、これらの結果は、ヒト脂肪組織におけるLPL活性の低減における、機能的PRLRを介したPRLの直接的効果を実証したことおよびこれらの結果が、LPLはまた、乳汁分泌の際に、この方法で低減され得ることを示唆したと示唆している。ラットにおけるこれらのPRLRアイソフォームの機能は解明されている(Perrot-Appelant, M.ら、Mol. Endocrinol. 11:1020~1032頁、1997年)。既知の長い形(591個のアミノ酸)と同様に、細胞質ドメインの198個のアミノ酸を欠くNb2の形も、乳腺刺激性シグナルを伝達できる。対照的に、細胞質ドメインの29

50

1個のアミノ酸を欠く短い形は、不活性である。短い形の機能は、長い形と短い形両方の同時トランスフェクション後に調べた。これらの結果は、短い形は、不活性なヘテロ二量体の形成によってドミナントネガティブ阻害剤として作用し、その結果、ヤヌスキナーゼ2活性化の阻害をもたらすことを示す。Perrot-Appalanaらは、PRLRのヘテロ二量体化は、PRL転写を正または負に活性し得るということを示唆している。

【0008】

最近の報告によれば、PRLRは、ヒト乳癌および前立腺癌組織において過剰発現されると示唆されている（非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6）。Liらは、Stat5活性化およびPRLR発現は、54%の前立腺癌試料において、高い組織学的グレードと関係していることを報告した（非特許文献4）。その他の報告は、原発性乳癌試料は、コロニー形成アッセイにおいてPRLに対して反応性であること、および血漿PRL濃度は、乳癌の危険と関連することを示唆している（非特許文献7；非特許文献8）。別の報告は、PRLトランスジェニックマウスは悪性乳癌または前立腺肥大を発症することを示した（非特許文献9；非特許文献10）。

10

【0009】

PRLRモノクローナル抗体は、マウスにおいて乳房腫瘍の罹患率を減少させた（非特許文献11）。さらに、PRLアンタゴニスト（S179D変異株PRL）は、*in vitro*においてヒト前立腺癌腫細胞株、DU-145、および*in vivo*においてDU-145誘導性腫瘍の増殖を阻害した（非特許文献12）。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Boutin、J.-M.ら、Molec. Endocrin. (1989年)3:1455~1461頁

30

【非特許文献2】Hu, Z.-Z.ら、J. Clin. Endocrin. Metab. (1999年)84:1153~1156頁

30

【非特許文献3】Ling, C.ら、J. Clin. Endocrin. Metab. (2003年)88:1804~1808頁

40

【非特許文献4】Liら、Cancer Res. (2004年)64:4774~4782頁

40

【非特許文献5】Gillilら、J. Clin. Pathol. (2001年)54:956~960頁

40

【非特許文献6】Touraineら、J. Clin. Endocrinol. Metab. (1998年)83:667~674頁

40

【非特許文献7】Tworogerら、Cancer Res. (2004年)64:6814~6819頁

40

【非特許文献8】Tworogerら、Cancer Res. (2006年)66:2476~2482頁

40

【非特許文献9】Wenboら、J. Clin. Invest. (1997年)100:2744~2751頁

40

【非特許文献10】Wenboら、Endocrinology (1997年)138:4410~4415頁

40

【非特許文献11】Sissomら、Am. J. Pathol. (1988年)133:589~595頁

40

【非特許文献12】Xuら、Cancer Res. (2001年)61:6098~6104頁

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、PRLRを調節する組成物および方法ならびにこのような癌におけるその

50

役割を同定する必要がある。本発明は、これらならびにその他の重要な必要性を対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

要旨

PRLR のヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されており、アミノ酸配列は、配列番号 2 に示されている。細胞外ドメイン (ECD) は、配列番号 2 のアミノ酸 25 ~ 234 からなり、これは 2 つの主要なドメイン、S1 (アミノ酸 25 ~ 122) および S2 (アミノ酸 123 ~ 234) に分けることができる。PRLR のいくつかの異なるアイソフォームが同定されている：長いもの (L) 中間のもの (I) 、S1、不活性可溶型 (PR-LBP) および不活性な短い型 S1a および S1b。各アイソフォーム内に含まれるエキソンおよびヌクレオチド領域は、図 1 に示されている。例示的実施形態では、本発明は、S1 ドメインおよび / または S2 ドメインと結合する抗体を考慮する。S2 ドメインと結合するこのような抗体は、すべての活性なアイソフォームをターゲッティングし得る。本発明はまた、1 種のアイソフォームと特異的に結合し、別のものとは結合しないか（例えば、中間のものとは結合し、S1a または S1b とは結合しない）、または活性なアイソフォーム（長いもの、中間のものもおよび S1）とは結合するが、不活性なアイソフォーム（S1a および S1b）とは結合しない抗体を考慮する。

10

【0013】

本発明の材料および方法は、前記の必要性および当技術分野におけるその他の関連する必要性を満たす。

20

【0014】

一実施形態では、 10^{-6} 以下の平衡解離定数 (K_D) を有し、PRLR との結合について、75 % を超えて、抗体

【0015】

【化1】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1,
he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131,
XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163,
XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202,
XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217,
XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145,
XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

30

のいずれかと競合する PRLR の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。用語「 10^{-6} 以下の平衡解離定数 (K_D)」とは、例えば、 10^{-6} 、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M または 10^{-12} M（すなわち、 10^{-6} よりも数字が小さい）の平衡解離定数を意味する。もう 1 つの実施形態では、抗体は、抗体

40

【0016】

【化2】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または XHA.06.907

10

のいずれかと同じ P R L R のエピトープと結合する。

【0017】

もう1つの実施形態では、前記の抗体は、抗体

【0018】

【化3】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

20

のいずれかの1、2、3、4、5または6つのC D Rを含む。もう1つの実施形態では、前記の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、human engineered抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体または抗体断片である。さらにもう1つの実施形態では、C D R内の少なくとも1個のアミノ酸が、別の抗P R L R抗体の対応するC D Rの対応する残基によって置換されている、前記の抗体が提供される。例示的実施形態では、

【0019】

【化4】

chXHA.06.642,
chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または XHA.06.907

30

から成る群から選択される抗体に由来するC D R内の少なくとも1個のアミノ酸が、別の抗P R L R抗体の対応するC D Rの対応する残基で置換されている、前記の抗体が提供さ

50

れる。もう 1 つの例示的実施形態では、

【0020】

【化5】

chXHA.06.642,

chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または XHA.06.907

10

からなる群から選択される抗体に由来する CDR 内の少なくとも 1 個のアミノ酸が、

【0021】

【化6】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または XHA.06.907

20

からなる群から選択される別の抗体の対応する CDR の対応する残基で、置換されている、前記の抗体が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、CDR 内の 1 個または 2 個のアミノ酸が修飾されている前記の抗体が提供される。

30

【0022】

本発明のもう 1 つの実施形態では、

【0023】

【化7】

chXHA.06.642,

chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または XHA.06.907

40

の抗体の可変軽鎖または重鎖領域にわたって、少なくとも 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 % の同一性

50

を保持する、前記の抗体が提供される。

【0024】

もう1つの実施形態では、前記の抗体は、ヒト抗体配列の定常領域と、ヒト抗体配列の1以上の重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域とを含む。本発明のさらにもう1つの実施形態では、ヒト抗体配列が、個々のヒト配列、ヒトコンセンサス配列、個々のヒト生殖系配列またはヒトコンセンサス生殖系配列である前記の抗体が提供される。

【0025】

さらにもう1つの実施形態では、重鎖定常領域が、修飾または非修飾IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、それらの断片または組み合わせである、前記の抗体が提供される。もう1つの実施形態では、重鎖定常領域が、修飾または非修飾IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4である、前記の抗体が提供される。もう1つの実施形態では、PRLRに対して、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} または 10^{-9} M以下の平衡解離定数を有する、前記の抗体が提供される。さらにもう1つの実施形態では、CDR中に保存的置換を含む、前記の抗体が提供される。もう1つの実施形態では、低いおよび中程度の危険度の残基における保存的または非保存的変更を含む、前記の抗体が提供される。さらにもう1つの実施形態では、軽鎖定常領域が、修飾または非修飾 軽鎖定常領域、 軽鎖定常領域、それらの断片またはそれらの組み合わせである、前記の抗体が提供される。

10

【0026】

さらにもう1つの実施形態では、PRLR二量体化を阻害する、PRLR細胞内リン酸化を阻害する、MAPKリン酸化の誘導を阻害する、Stat5リン酸化の誘導を阻害する、AKTリン酸化の誘導を阻害する、PRLのPRLRとの結合を阻害する、前記の抗体が提供される。

20

【0027】

その他の実施形態では、前記の抗体は、VEGF産生および/または血管形成をさらに阻害する。

【0028】

さらにもう1つの実施形態では、癌細胞の増殖を阻害する、前記の抗体が提供される。さらにもう1つの実施形態では、抗体は、乳癌、前立腺癌または肺癌の細胞の増殖を阻害する。

30

【0029】

癌に加え、本発明のもう1つの実施形態は、自己免疫および炎症性疾患または障害を予防および/または治療するために前記の抗体を提供する。抗体は、自己免疫および/または炎症性要素を含む疾患の予防、緩解(ameliorating)または治療において特に有用である。これらの疾患として、それだけには限らないが、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、円板状ループス、ループス腎炎、サルコイドーシス、炎症性関節炎、例えば、それだけには限らないが、若年性関節炎、リウマチ関節炎、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎および痛風性関節炎、臓器または組織移植の拒絶反応、超急性、急性または慢性拒絶反応および/または移植片対宿主病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病(グルテン過敏性腸症)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫不全症候群(CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓溶解、心筋症、尋常性天疱瘡、間質性肺纖維症、I型およびII型糖尿病、1、2、3および4型遅延型過敏症、アレルギーまたはアレルギー性障害、治療用タンパク質に対する不要な/意図せぬ免疫応答、喘息、チャーグ・ストラウス症候群(アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎、蕁麻疹、IgE媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性筋疾患、溶血性疾患、アルツハイマー病、慢性炎症性脱髓性多発ニューロパシーなどといった自己免疫および炎症性疾患が挙げられる。

40

【0030】

50

もう 1 つの実施形態では、別の診断薬または治療薬とコンジュゲートしている前記の抗体が提供される。

【 0 0 3 1 】

さらにもう 1 つの実施形態では、以下のステップを含む、癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法が提供される： P R L R の E C D を含むポリペプチドを、抗体

【 0 0 3 2 】

【 化 8 】

chXHA.06.642,

10

chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 および XHA.06.907

20

の少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 または 6 つの C D R を含む候補抗体と接触させるステップと、候補抗体の、ポリペプチドに対する結合親和性を検出するステップと、 10^{-6} M 以下の平衡解離定数が検出される場合に、前記候補抗体を、癌の治療に有用な抗体として同定するステップ。

【 0 0 3 3 】

もう 1 つの実施形態では、抗体

【 0 0 3 4 】

【 化 9 】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 および XHA.06.907

30

の C D R 内の 1 または 2 個のアミノ酸に対する修飾を含む候補抗体を調製するステップと、 P R L R の E C D を含むポリペプチドを、前記候補抗体と接触させるステップと、候補抗体の、ポリペプチドに対する結合親和性を検出するステップと、 10^{-6} M 以下の平衡解離定数が検出される場合に、前記候補抗体を、癌の治療に有用な抗体として同定するステップとを含む、抗体を系統的に変更し、癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体をスクリーニングする方法が提供される。

40

【 0 0 3 5 】

さらにもう 1 つの実施形態では、乳房、肺または前立腺の細胞を、抗体

【 0 0 3 6 】

【化 1 0】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1,
 he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129,
 XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158,
 XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181,
 XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210,
 XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235,
 XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275,
 XIIA.06.189 および XHA.06.907

10

の少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの C D R を含む候補抗体または 1 つ以上の C D R 内の 1 個以上のアミノ酸の修飾を含む抗体と接触させるステップと、前記細胞の増殖または生存を検出するステップと、細胞増殖または生存の低減が検出される場合に、前記候補抗体を、癌の治療に有用な抗体として同定するステップを含む、癌の治療に有用な P R L R タンパク質の細胞外ドメインについて抗体をスクリーニングする方法。

【0 0 3 7】

さらにもう 1 つの実施形態では、治療上有効な量の前記の抗体を投与するステップを含む、癌を患っている被験体、例えば、ステージ 0、I、II、III、IV または V の癌を患っている被験体を治療する方法。関連実施形態では、癌は、乳癌、肺癌または前立腺癌である。もう 1 つの実施形態では、第 2 の治療薬が投与される。例示的一実施形態では、第 2 の治療薬として、ドキソルビシン、ダウノルビシンまたはその他のアントラサイクリンまたはトポイソメラーゼ阻害剤がある。さらなる実施形態では、前記のトポイソメラーゼ阻害剤のうちいずれかが、chXHA.06.642、chXHA.06.275、he.06.642-1、he.06.642-2、he.06.275-3、he.06.275-4 とともに投与される。さらにもう 1 つの実施形態では、被験体は、放射線療法または手術で、さらに治療される。本発明のさらにもう 1 つの実施形態では、被験体は、P R L R 発現および H E R 2 - neu 発現について陽性であり、前記の第 2 の治療薬は抗 H e r 2 - n e u 抗体である。関連する一実施形態では、被験体は、P R L R 発現および E R 発現について陽性であり、前記の第 2 の治療薬は抗 E R 抗体である。さらなる一実施形態では、本発明は、医薬において使用するための、例えば、癌の治療において使用するための本発明の抗体を提供する。その他の実施形態では、本発明は、癌を治療するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。薬剤は、第 2 の治療薬と、および / または放射線療法と組み合わせて患者に投与してもよい。

20

30

【0 0 3 8】

本発明のもう 1 つの実施形態では、放射性核種またはその他の毒素とコンジュゲートしている前記の抗体を投与するステップを含む、P R L R を発現する腫瘍細胞をターゲッティングする方法が提供される。もう 1 つの実施形態では、被験体は哺乳類である。さらにもう 1 つの実施形態では、被験体はヒトである。

40

【0 0 3 9】

さらにもう 1 つの実施形態では、前記抗体の重鎖または軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、調節制御配列と作動可能に連結している前記の核酸分子を含む発現ベクターが提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、前記ベクターまたは前記核酸分子を含む宿主細胞が提供される。

【0 0 4 0】

さらにもう 1 つの実施形態では、宿主細胞を適した条件下で培養するステップと、前記抗体を回収するステップとを含む、抗体を作製するために前記宿主細胞を用いる方法が提

50

供される。さらにもう 1 つの実施形態では、前記方法によって作製された抗体が提供される。

【 0 0 4 1 】

さらにもう 1 つの実施形態では、重量で少なくとも 95 % の均一性まで精製されている前記抗体が提供される。もう 1 つの実施形態では、前記抗体と、製薬上許容される担体とを含む薬剤組成物が提供される。

【 0 0 4 2 】

さらにもう 1 つの実施形態では、容器にパッケージングされた、治療上有効な量の本発明の抗体を含む前記抗体を含むキットであって、第 2 の治療薬を場合により含んでいてもよく、容器に取り付けられた、またはともにパッケージングされたラベルをさらに含み、ラベルが容器の内容物を記載し、癌を治療するための容器の内容物の使用に関する指示および / または使用説明書を提供するキットが提供される。もう 1 つの実施形態では、容器がバイアルまたはピンまたはプレフィルドシリンジであるキットが提供される。

10

【 0 0 4 3 】

本発明のもう 1 つの実施形態では、配列番号

【 0 0 4 4 】

【 化 1 1 】

21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51,

20

53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 82, 84, 86, 88, 91, 95 および 96

からなる群から選択される可変軽鎖アミノ酸配列を含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。もう 1 つの実施形態では、配列番号

20

【 0 0 4 5 】

【 化 1 2 】

20, 2, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60,

62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 83, 85, 87, 89, 90, 93, 94, 97 および 98

30

からなる群から選択される可変重鎖アミノ酸配列を含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 88 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 89 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 88 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 90 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。

【 0 0 4 6 】

本発明のさらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 91 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 93 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。もう 1 つの実施形態では、配列番号 91 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 94 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 92 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 93 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。本発明のさらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 92 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 94 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体。

40

【 0 0 4 7 】

本発明のさらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 95 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 97 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。もう 1 つの実施形態では、配列番号 95 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 98 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。さらにもう 1 つの実施形態では、配列番号 96 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 97 の可変重鎖アミノ酸配列とを含む P R L R の細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。もう 1 つの実施形態では、配列番号 96 の可変軽鎖アミノ酸配列と、配列番号

50

98の可変重鎖アミノ酸配列とを含むPRLRの細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。

【0048】

本発明のもう1つの実施形態では、マウスPRLRの細胞外ドメインよりも少なくとも10~25、000倍、100~20,000倍、1,000~18,000倍、5,000~17,000倍、8,000~16,000倍、10,000~15,000倍、12,000~15,000倍または13,000~14,000倍低いKDを有する、ヒトPRLRの細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。関連実施形態では、前記抗体は、he.06.275-4と同一のエピトープと結合する。さらにもう1つの実施形態では、ヒトPRLRの細胞外ドメイン、マウスPRLRの細胞外ドメインおよびラットPRLRの細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。もう1つの実施形態では、 10^{-6} M以下の平衡解離定数(K_D)を有する、ヒト、マウスおよびラットPRLRの細胞外ドメインと結合する抗体が提供される。関連実施形態では、前記抗体は、he.06.642-2と同一のエピトープと結合する

さらにもう1つの実施形態では、上記方法を用いて、例えば、(a)被験体からサンプルを得、(b)サンプルを、PRLR、Jak2、Mapk、Stat5、Erk1/2および/またはAktのリン酸化のレベルについて分析し、PRLR、Jak2、Mapk、Stat5、Erk1/2および/またはAktのリン酸化のレベルが、抗PRLR抗体を用いる治療を必要としていることを示すことによって、抗PRLR抗体を用いた治療を必要とする被験体を同定できる。もう1つの実施形態では、(a)被験体から得た第1のサンプルを、癌治療薬を用いる治療の開始に先立ってPRLRのリン酸化のレベルについて分析するステップと、(b)癌治療薬を用いる治療の開始後の第2のサンプルを分析するステップとを含み、癌治療薬を用いた治療の開始後のリン酸化PRLRのレベルの低減が、患者が治療上有効な用量の癌治療薬を受けていることを示す、癌に罹患した被験体において癌治療をモニタリングする方法が提供される。関連する一実施形態では、癌治療薬は、上記の実施形態のいずれか1つの抗体である。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】PRLRの種々のアイソフォームにおける遺伝子配置およびエキソンを示す図である。

【図2】pERK1/2リン酸化に対する、選択されたPRLR特異的抗体の効果を示す図である。[mAb 1167は、対照マウス抗PRLRモノクローナル抗体である；R&D Systems、カタログ番号MAB1167]

【図3】pERK1/2リン酸化に対する、選択されたPRLR特異的抗体の効果を示す図である。[mAb 1167は、対照マウス抗PRLRモノクローナル抗体である；R&D Systems、カタログ番号MAB1167]

【図4】pERK1/2リン酸化に対する、選択されたPRLR特異的抗体の効果を示す図である。[mAb 1167は、対照マウス抗PRLRモノクローナル抗体である；R&D Systems、カタログ番号MAB1167]

【図5】PRL反応性腫瘍細胞株の増殖に対する、PRLR特異的抗体の効果を示す図である。

【図6】PRLR細胞内リン酸化に対する、PRLR特異的抗体の効果を示す図である。

【図7A】pERKアッセイにおいて80%を超える阻害を有していた、VHおよびVLアミノ酸配列、ならびに抗体

【0050】

10

20

30

40

【化13】

XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130,
 XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159,
 XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192,
 XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212,
 XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239

の CDR (下線) の位置を示す図である。

【図7B】pERKアッセイにおいて80%を超える阻害を有していた、VHおよびVL
アミノ酸配列、ならびに抗体 10

【0051】

【化13】

XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130,
 XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159,
 XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192,
 XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212,
 XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239

の CDR (下線) の位置を示す図である。

【図7C】pERKアッセイにおいて80%を超える阻害を有していた、VHおよびVL
アミノ酸配列、ならびに抗体

【0052】

【化13】

XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130,
 XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159,
 XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192,
 XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212,
 XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239

の CDR (下線) の位置を示す図である。

【図8】抗体XPA.06.145のVHおよびVLアミノ酸配列を示す図である。

【図9】抗体XHA.06.983、XHA.06.275およびXHA.06.642
のリーダーおよびVHおよびVLヌクレオチド配列を示す図である。

【図10】抗体XHA.06.983、XHA.06.275およびXHA.06.642
(CDR下線が引かかれている)のVHおよびVLアミノ酸配列を示す図である。

【図11】キメラ抗PRLR mAbs chXHA.06.642、chXHA.06.
.275およびchXHA.06.983が、BaF/PRLR細胞の増殖および生存を
強く阻害することを示す図である。KLH-G1は、非特異的アイソタイプに対応した対照抗体である。右のパネルは、対応するマウスマAbのIC50値を示す。

【図12】キメラ抗PRLR mAbが、T47D細胞におけるSTAT5シグナル伝達を阻害することを示す図である。細胞は、1 μg/mlのmAbで前処理し、その後、50 ng/mlのPRLを用いて30分刺激した。溶解物は、PRLRのホスホチロシン残基546および611に特異的な抗体を用いてホスホ-PRLRの存在について分析した。

【図13】pERK1/2リン酸化に対する、Human Engineered(商標)
抗体の効果を示す図である。

【図14】キメラ抗PRLR mAbによって媒介されたADCCを示す図である。T4

10

20

30

40

50

7 D - T 2 細胞は、カルセイン - AMで標識し、その後、mAb (1 µg / ml) を適用し、10 : 1 のエフェクター対標的の比でヒトNK細胞を精製した。4時間インキュベートした後、上清中へのカルセイン - AM放出を測定した。抗KLH抗体およびヘルセプチンを、それぞれ、負および正の対照として用いた。特異的溶解%は、(実験に基づく放出 - 自然発生による放出) / (最大放出 - 自然発生による放出) × 100として算出した。

【図15】組み合わせ研究において、抗PRLR mAbが、細胞傷害性薬と協力することを示す図である。ドキソルビシン(上のパネル)およびシスプラチニン(下のパネル)を、抗KLH対照Ab、抗PRLR mAb chXHA.06.642または抗PRLR mAb chXHA.06.275(すべて1 µg / mlで)と同時投与した。細胞生存は、CellTiter Glo分析によって調べ、RLU(y軸)として報告されている。

10

【図16】STAT5リン酸化アッセイにおいて、Human Engineered(商標)mAbが、抗PRLR機能的特徴を保持することを示す図である。T47D細胞を、1または10 µg / ml mAbとともにインキュベートし、次いで、PRL(50 ng / ml)とともに、または併わずに、さらに30分間インキュベートした。

【図17】図17AおよびBは、ヒト化抗PRLR抗体候補が、PRL依存性BaF3/PRLR細胞の増殖を強く阻害することを示す図である。BaF3/PRLR細胞は、PRL(50 ng / ml)の存在下、抗KLH対照抗体(上部の線)、キメラ抗体またはHuman Engineered(商標)型のいずれかとともに48時間増殖した。EC50値は、曲線適合の非線形回帰分析を用いて算出した。

20

【図18】図18AおよびBは、chXHA.06.642処理動物のNb2-C11腫瘍におけるp-STAT5の阻害を示す図である。皮下Nb2-c11腫瘍を有する胸腺欠損マウスに、chXHA.06.642またはKLH対照IgG1 mAbを腹膜内に注射した。2日後、20 µgのoPRLのボーラス腹膜内注射を投与した。対照動物には生理食塩水を注射した。2日後、20 µgのoPRLのボーラス注射を腹膜内に投与し、40分後、腫瘍を採取し、イムノプロットまたはIHCによってp-STAT5について評価した。図18A、80 µgのTyr694 p-STAT5のウェスタンプロット；図18B、Tyr694 p-STAT5のIHC。

【図19】図19AおよびBは、2つの異なる研究で、chXHA.06.642が、SCIDマウスにおけるNb2-c11ラットリンパ腫モデルにおいて有効であるということを示す図である。

30

【図20】図20AおよびBは、chXHA.06.642が、SCIDマウスにおいて確立されたNb2-C11ラットリンパ腫腫瘍を退行させることを示す図である。図20Aは、腫瘍量を示し、図20Bは、条件付き生存を示す。

【図21】図21AおよびBは、oPRLの腹膜内ボーラス注射が、p-STAT5を誘導し、chA64.1での処理が、T47Dヒト乳房異種移植片におけるp-STAT5誘導を阻害することを示す図である。chXHA.06.642またはKLH対照IgG1は、増殖を支援するために0.18 mg / 日のエストラジオール(E₂)ペレットが移植された、T47D腫瘍保有免疫不全マウスに腹膜内に注射した。2日後、20 µgのoPRLのボーラス注射を腹膜内に投与し、40分後、T47D腫瘍を採取し、イムノプロットまたはIHCによってp-STAT5について評価した。p-ERKまたはp-AKTレベルもイムノプロットによって評価した。図21A、80 µgのTyr694 p-STAT5のウェスタンプロット、図21B、Tyr694 p-STAT5のIHC。

40

【発明を実施するための形態】

【0053】

詳細な説明

本発明は、PRLR特異的抗体、このような抗体を含有する薬剤製剤、抗体および薬剤製剤を調製する方法および薬剤製剤および化合物を用いて患者を治療する方法を提供する。本発明の抗体は、PRLRとの結合および/またはPRLRの二量体化の阻害および/またはPRLR細胞内リン酸化の阻害および/または例えば、Jak2、Mapk、St

50

a t 5、E r k 1 / 2 および / または A k t のリン酸化による、P R L R 下流シグナル伝達の阻害および癌または腫瘍と関連している細胞増殖の阻害についての所望の生物活性を有し得る。このようにして、P R L R のリン酸化の検出による、またはその他の下流シグナル伝達パートナー、例えば、J a k 2、S t a t 5、E r k 1 / 2 および / または A k t のリン酸化状態の評価による、P R L R 活性化の直接分析が考慮される。したがって、下流シグナル伝達経路の分析を用いて、抗 P R L R 抗体を必要とする患者を同定でき、またはこれを用いて、抗 P R L R 抗体を用いて治療された患者をモニターできる。

【 0 0 5 4 】

あるいは（またはさらに）本発明の抗体は、癌細胞上で発現されたP R L Rとの結合についての所望の生物活性を有し、ひいては、細胞傷害性治療法を癌細胞にターゲッティングするよう働き得る。10

【 0 0 5 5 】

本発明は、さらに、P R L R 遺伝子または遺伝子産物およびその変異体のアンタゴニストまたはアゴニストを同定するためのスクリーニングアッセイに関する。したがって、本発明は、P R L R 遺伝子または遺伝子産物およびその変異体のアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法および本明細書に記載されるような癌を治療または予防するための前記アゴニストまたはアンタゴニストの使用に関する。さらに、本発明は、例えば、それだけには限らないが、肺、乳房および前立腺などの癌を含む、P R L R の異常な発現または活性を特徴とする障害を、スクリーニング、診断、予防および / または治療するための、P R L R 遺伝子によってコードされる遺伝子産物の、核酸分子、ポリペプチドおよび / またはアンタゴニストもしくはアゴニストの使用を考慮する。20

【 0 0 5 6 】

高親和性および効力を有することが i n v i t r o アッセイによって測定される、いくつかの好ましいマウスまたはキメラ抗体は、S t u d n i c k a らの H u m a n E n g i n e e r i n g (商標) 法に基づいて、ヒトにおいて免疫原性が低くなるよう修飾されている。手短には、抗原結合またはタンパク質フォールディングのいずれかに有害な影響を及ぼす可能性が高いと決定された位置において、表面に露出した重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸残基を、ヒト残基に修飾し、ヒト環境に関するその免疫原性を低減する。修飾重鎖および / または軽鎖可変領域を含有する合成遺伝子を構築し、ヒト 重鎖および / または 軽鎖定常領域と結合される。任意のヒト重鎖および軽鎖定常領域を、H u m a n E n g i n e e r e d (商標) 抗体可変領域と組み合わせて用いることができる。ヒト重鎖および軽鎖遺伝子が哺乳類細胞に導入され、得られた組換え免疫グロブリン産物が得られ、特性決定される。30

【 0 0 5 7 】

本発明の例示的抗体として、

【 0 0 5 8 】

【 化 1 4 】

chXHA.06.642,

chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-

40

4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147,

XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171,

XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206,

XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229,

XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642,

XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 および XHA.06.907

が挙げられる。以下の抗体分泌ハイブリドーマは、2 0 0 6 年 8 月 1 7 日に、ブタペスト

50

条約の条項に従って、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (USA) に寄託された。

【0059】

【化15】

<u>ハイブリドーマ名</u>	<u>ATCC 寄託番号</u>
XHA.06.567	PTA-7794
XHA.06.642	PTA-7795
XHA.06.983	PTA-7796
XHA.06.275	PTA-7797
XHA.06.189	PTA-7798
XHA.06.907	PTA-7799

10

以下の定義は、本発明をより完全に理解するための助けとして提供される。

20

【0060】

一般定義

本明細書において、標的抗原ヒト「PRLR」とは、配列番号2と実質的に同じアミノ酸配列を有するヒトポリペプチドならびにその天然に存在する対立遺伝子および／またはスプライス変異体を指す。本明細書において「PRLRのECD」とは、配列番号2のアミノ酸25～234によって表されるPRLRの細胞外部分を指す。

【0061】

本明細書において、「腫瘍」とは、悪性であろうと、良性であろうとすべての新生細胞成長および増殖、ならびにすべての前癌性および癌性細胞および組織を指す。

30

【0062】

用語「癌」および「癌性」とは、通常、未制御の細胞増殖を特徴とする哺乳類における生理学的状態を指すか説明する。癌の例として、それだけには限らないが、乳癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、リンパ系癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌または皮膚癌が挙げられる。

40

【0063】

「治療」とは、障害の発症を防ぐ、または障害の病状を変えるという意図をもって実施される介入である。したがって、「治療」とは、治療的処置および予防的（prophylactic）もしくは予防的（preventative）措置の両方を指す。治療を必要とするものとして、すでに障害を有するものならびに障害が予防されるべきものが挙げられる。腫瘍（例えば、癌）の治療では、治療薬は、腫瘍細胞の病状を直接低減する場合もあるし、腫瘍細胞を、その他の治療薬による治療、例えば、放射線および／または化学療法に対してより感受性にする場合もある。疾患の臨床症状、生化学的症状、放射線学的症状または自覚症状を患有患者の治療は、このような症状の一部もしくはすべてを軽減することまたは疾因素因を低減することを含み得る。癌の「病状」は、患者の幸福を損なうすべての現象を含む。これとしては、制限するものではないが、異常なまたは制御できない細胞増殖、転移、隣接細胞の正常な機能の干渉、異常なレベルでのサイトカインまたはその他の分泌産物の放出、炎症応答または免疫学的応答の抑制または増悪などが挙げられる。従って、治療後の改善は、腫瘍の大きさの減少、腫瘍増殖速度の減退、既存の腫瘍細胞もしくは転移細胞の破壊および／または転移の大きさもしくは数の減少として現れ得る。

50

【0064】

治療の目的上、「哺乳類」とは、哺乳類として分類される任意の動物、例えば、ヒト、家畜(*domestic animal*)および家畜(*farm animal*)および動物園の動物、スポーツ動物またはペット動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを指す。哺乳類はヒトであることが好ましい。

【0065】

本明細書において、語句「治療上有効な量」とは、所望の治療計画に従って投与された場合に、本発明の実施形態にとって適当であり、所望の治療もしくは予防効果もしくは反応、例えば、疾患のこのような症状の一部もしくはすべてを軽減することまたは疾患病因を低減することを引き出す治療抗体または予防抗体の量を指すものとする。

10

【0066】

抗体

「親和性」または「結合親和性」とは、平衡結合定数(K_A)または平衡解離定数(K_D)によって計られることが多い。用語「免疫特異的」または「特異的結合」とは、抗体がP R L RまたはそのE C Dと、約 $10^6 M^{-1}$ 以上、約 $10^7 M^{-1}$ 以上、約 $10^8 M^{-1}$ 以上または約 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ または $10^{12} M^{-1}$ 以上の平衡結合定数(K_A)で結合することを意味する。抗体は、その他の無関係の分子と比較して、標的抗原に対して実質的に高い親和性を有し得る。抗体はまた、相同分子種または相同体と比較して、標的抗原に対して実質的に高い親和性を、標的抗原に対して、例えば、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍以上高い相対親和性を有し得る。あるいは、抗体にとって、既知相同体または相同分子種と交差反応することが有用である場合もある。

20

【0067】

本発明の抗体はまた、平衡解離定数(K_D) $10^{-4} M$ 、 $10^{-6} M \sim 10^{-7} M$ または $10^{-8} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ または $10^{-12} M$ 以下によって特徴付けることができる。このような親和性は、従来技術を用いて、例えば、B I A c o r e 2000機器を用い、製造業者によって概説された一般手順を用いることによる平衡透析によって、放射性標識された標的抗原を用いるラジオイムノアッセイによって、または当業者に公知の別の方針によって容易に測定できる。親和性データは、例えば、S c a t c h a r dら、A n n N . Y . A c a d . S c i 、51 : 660 頁(1949年)の方法によって分析できる。

30

【0068】

「中和抗体」とは、結合する標的抗原のエフェクター機能を除去するか、大幅に低減する抗体分子を意味する。したがって、抗標的抗体を「中和すること」によって、酵素活性、リガンド結合または細胞内シグナル伝達などのエフェクター機能を除去または大幅に低減できる。

【0069】

用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、十分に構築された抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、抗原と結合できる抗体断片(例えば、F a b'、F' (a b) 2、F v、一本鎖抗体、ダイアボディー)、キャメルボディー(c a m e l b o d i e s)および所望の生物活性を示す限り前記のものを含む組換えペプチドを含む。抗体断片は、組換えD N A技術によって、または無傷の抗体の酵素的もしくは化学的切断によって作製でき、以下にさらに記載される。モノクローナル抗体の限定されない例として、以下に、各々さらに記載される、マウス、キメラ、ヒト化、ヒトおよびHuman Engineered(商標)免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリンに由来する配列を有するキメラ融合タンパク質、またはそれらの突然変異体もしくは誘導体が挙げられる。無傷の分子および/または断片のマルチマーまたは集合体、例えば、化学的に誘導された抗体も考慮される。本発明にしたがって、任意のアイソタイプクラスまたはサブクラスの抗体が考慮される。

40

【0070】

50

本明細書において、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に相同な抗体の集団から得られた抗体、すなわち、集団を含む個々の抗体が、天然に存在する、少量で存在し得る突然変異の可能性を除いて同一であることを指す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられる。さらに、通常、種々の決定基(エピトープ)に対して向けられる種々の抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられる。モノクローナル抗体は、その特異性に加え、それらが、異なる特異性および特徴を有するその他の免疫グロブリンによって汚染されていない、均一な培養によって合成されるという点で有利である。

【0071】

10

修飾語句「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られているというような抗体の特徴を示すものであって、任意の特定の方法による抗体の作製を必要とする解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature、256：495頁[1975]によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製してもよく、または組換えDNA法によって作製してもよい(例えば、米国特許第4,816,567号参照のこと)。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、組換え、キメラ、ヒト化、ヒト、Human Engineered(商標)または抗体断片であり得る。

【0072】

20

「単離」抗体とは、その天然環境の成分から同定、分離、回収されているものである。その天然環境の混入成分は、抗体の診断上または治療上の使用を干渉する物質であり、これとしては、酵素、ホルモンおよびその他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を挙げることができる。好ましい実施形態では、抗体は、(1)ローリー法によって測定される、抗体の95重量%を超えて、最も好ましくは、99重量%を超えて、(2)スピニングカップシーカーネーターの使用によって、少なくとも15残基のN末端または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度に、または(3)クーマシーブルーまたは、好ましくは、銀染色を用いて、還元または非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一性まで精製される。単離抗体は、抗体の天然環境の少なくとも1種の成分が存在しないので、組換え細胞内のその場の抗体を含む。しかし、通常、単離抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

30

【0073】

「免疫グロブリン」または「天然抗体」は、四量体の糖タンパク質である。天然に存在する免疫グロブリンでは、各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖の対からなり、各対は、1つの「軽」鎖(約25kDa)と、1つの「重」鎖(約50～70kDa)とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に、抗原認識に関与する約100～110またはそれより多いアミノ酸の「可変」領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関する定常領域を規定する。免疫グロブリンは、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて種々のクラスに割り当てられ得る。重鎖は、ミュー(μ)、デルタ(Δ)、ガンマ(γ)、アルファ(α)およびイプシロン(ε)として分類され、抗体のアイソタイプを、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして規定する。これらのうちいくつかは、サブクラスまたはアイソタイプにさらに分割できる、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有し、例えば、IgG1およびIgG3アイソタイプは、ADCC活性を有する。ヒト軽鎖は、カッパ(κ)およびラムダ(λ)軽鎖として分類される。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域が、約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって結合されており、重鎖はまた、約10個以上のアミノ酸の「D」領域も含む。全般的に、Fundamental Immunology、7章(Paul, W.編、第2版Raven Press, N.Y.(1989年))参照のこと。

40

【0074】

抗体の構造および生成の詳細な説明については、参照によりその全文が本明細書に組み

50

込まれる、R o t h , D . B . およびC r a i g , N . L . 、C e l l 、9 4 : 4 1 1 ~ 4 1 4 頁 (1 9 9 8 年) 参照のこと。手短には、重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子をコードするD N A が生成するプロセスは、主に、B 細胞の発生において起こる。種々の免疫グロブリン遺伝子セグメントの再編成および結合に先立って、V 、D 、J および定常 (C) 遺伝子セグメントが、通常、单一の染色体上に相対的に極接近して見られる。B 細胞分化の間に、V 、D 、J (または、軽鎖遺伝子の場合には、V およびJ のみ) 遺伝子セグメントの適当なファミリーのメンバーのうち各 1 種が組換えられて、機能的に再編成された重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子が形成される。この遺伝子セグメント再編成プロセスは、逐次的であると思われる。まず、重鎖D 対 J 結合が行われ、続いて、重鎖V 対 D 、J 結合および軽鎖V 対 J 結合が行われる。V 、D およびJ セグメントの再編成に加え、軽鎖中のV およびJ セグメントが結合される位置および重鎖のD およびJ セグメントが結合される位置での可変組み換えによる免疫グロブリン重鎖および軽鎖の初期レパートリーにおいてさらなる多様性が生じる。軽鎖中のこのような変動は、通常、V 遺伝子セグメントの最後のコドンおよびJ セグメントの最初のコドン内に生じる。D およびJ_H セグメント間の重鎖染色体上で結合において同様の不正確さが生じ、1 0 ヌクレオチドにもわたって及び得る。さらに、ゲノムD N A によってコードされていない、D およびJ_H 間およびV_H およびD 遺伝子セグメント間にいくつかのヌクレオチドが挿入され得る。これらのヌクレオチドの付加は、N 領域多様性として知られている。このような結合の際に生じ得る可変領域遺伝子セグメントおよび可変組換えにおけるこのような再編成の正味の効果は、初期抗体レパートリーの生成である。

10

20

30

【 0 0 7 5 】

「抗体断片」は、無傷の全長抗体（例えば、ヒト抗体を含む）の一部、好ましくは、無傷の抗体の抗原結合または可変領域を含み、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。抗体断片の限定されない例として、F a b 、F a b' 、F (a b') 2 、F v 、ドメイン抗体 (d A b) 、相補性決定領域 (C D R) 断片、一本鎖抗体 (s c F v) 、一本鎖抗体断片、ダイアボディー、トリアボディー (t r i a b o d i e s) 、テトラボディー (t e t r a b o d i e s) 、ミニボディー、線形抗体 (Z a p a t a l a 、P r o t e i n E n g . 、8 (1 0) : 1 0 5 7 ~ 1 0 6 2 頁 (1 9 9 5)) ；キレート化組換え抗体、トリボディー (t r i b o d i e s) またはビボディー (b i b o d i e s) 、イントラボディー (i n t r a b o d i e s) 、ナノボディー (n a n o b o d i e s) 、スマール・モジュラー・イミュノファーマシューティカルズ (s m a l l m o d u l a r i m m u n o p h a r m a c e u t i c a l s) (S M I P) 、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、キャメライズド (c a m e l i z e d) 抗体、V H H 含有抗体またはそれらの突然変異体もしくは誘導体、ならびに抗体が所望の生物活性を保持する限り、C D R 配列などのポリペプチドとの特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが挙げられる。

40

【 0 0 7 6 】

抗体のパパイン消化によって、「F a b 」断片と呼ばれ、各々、单一の抗原結合部位を含む、2つの同一の抗原結合断片と、残存する「F c 」断片とが得られ、この名称は、3 5 を容易に結晶化するその能力を反映する。ペプシン処理によって、2つの「F v 」断片を有するF (a b') 2 断片が得られる。「F v 」断片は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、緊密な、非共有結合にある、1つの重鎖と1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置では、各可変ドメインの3つのC D R が相互作用して、V H V L 二量体の表面上の抗原結合部位を規定する。まとめて、6 つのC D R が、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、单一の可変ドメイン（または抗原に特異的な、3つだけのC D R を含むF v の半分）は、抗原を認識および結合する能力を有する。

50

【 0 0 7 7 】

「一本鎖F v 」または「s F v 」または「s c F v 」抗体断片は、抗体のV H およびV L ドメインを含み、これらのドメインは、单一のポリペプチド鎖中に存在する。F v ポリ

50

ペプチドは、Fvが、抗原結合にとって所望の構造を形成するのを可能にする、VHおよびVLドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含むことが好ましい。sFvの総説については、The Pharmacology of Antibodies、第113巻、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、269～315頁（1994年）中、Pluckthunを参照のこと。

【0078】

Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を含む。Fab断片は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での2、3個の残基、例えば、抗体ヒンジ領域からの1個以上のシステインの付加によってFab'断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基（複数の残基）が遊離チオール基を保有するFab'の意味である。Fab(ab')2抗体断片は、元々は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として作製された。

10

【0079】

用語「超可変」領域とは、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」またはCDR[すなわち、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md。（1991年）によって記載される、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34（L1）、50～56（L2）および89～97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の31～35（H1）、50～65（H2）および95～102（H3）]および/または超可変ループに由来する残基（すなわち、[Chothiaら、J.Mol.Biol.196:901～917頁（1987年）によって記載される、軽鎖可変ドメイン中の残基26～32（L1）、50～52（L2）および91～96（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の26～32（H1）、53～55（H2）および96～101（H3）]に由来するアミノ酸残基を含む。

20

【0080】

「フレームワーク」またはFR残基とは、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

30

【0081】

語句「定常領域」とは、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分を指す。

【0082】

本明細書において、語句「キメラ抗体」とは、通常、異なる種を起源とする2種の異なる抗体に由来する配列を含有する抗体を指す（例えば、米国特許第4,816,567号参照のこと）。最も通常は、キメラ抗体は、ヒトおよびマウス抗体断片、通常、ヒト定常およびマウス可変領域を含む。

40

【0083】

用語「変異タンパク質」または「変異体」は、同義的に用いられることができ、変異タンパク質または変異体が、所望の結合親和性または生物活性を保持するという条件で、可変領域または可変領域と同等の部分中に少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入を含む抗体のポリペプチド配列を指す。変異タンパク質は、親抗体と実質的に相同であるか、または実質的に同一であり得る。

【0084】

用語「誘導体」とは、本発明の抗体に関連して用いられる場合には、ユビキチン化、治療薬または診断薬とのコンジュゲーション、標識化（例えば、放射性核種または種々の酵素を用いた）、ペグ化（ポリエチレンギリコールを用いた誘導体化）などの共有結合性ポリマー結合および非天然アミノ酸の化学合成による挿入または置換のような技術によって共有結合的に修飾された抗体を指す。本発明の誘導体は、本発明の非誘導体化分子の結合特性を保持する。

【0085】

本明細書において用いられる場合、用語「抗体」は、PRLRの細胞外部分と結合する

50

能力を保持する以下のうち任意の 1 種を具体的に含む：

1) 図 7 A ~ 7 C または図 8 に示されるアミノ酸配列を有する親抗体のアミノ酸変異タンパク質、例えば、相同性決定について類似のアミノ酸を考慮して、親アミノ酸配列と、少なくとも 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 % 相同である可変重鎖アミノ酸配列を含む、および / または親アミノ酸配列と、少なくとも 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 % 相同である可変軽鎖アミノ酸配列を含む変異タンパク質；

2) 図 7 A ~ 7 C または図 8 に示されるアミノ酸配列を有する親抗体の 1 以上の相補性決定領域 (CDR) を含む、好ましくは、少なくとも重鎖の CDR 3 を含む、好ましくは、2 以上または 3 以上または 4 以上または 5 以上または 6 つすべての CDR を含む PRLR 結合性ポリペプチド；

3) Studnicka ら、米国特許第 5,766,886 号および本明細書において実施例 5 に示される方法に従い、低い、中程度のおよび高い危険度の残基を同定するための Kabat 番号付けを用いて、親配列を変更することによって作製された Human Engineered (商標) 抗体；以下の重鎖のうち少なくとも 1 種と、以下の軽鎖のうち少なくとも 1 種とを含むこののような抗体：(a) ヒト参照免疫グロブリン配列中の対応する残基とは異なる、すべての低い危険度のげっ歯類残基が、ヒト参照免疫グロブリン配列中のヒト残基と同一であるよう修飾されている重鎖または (b) すべての低いおよび中程度の危険度のげっ歯類残基が、必要に応じて、ヒト参照免疫グロブリン配列中と同一残基であるよう修飾されている重鎖、(c) すべての低い危険度の残基が、必要に応じて、ヒト参照免疫グロブリン配列と同一残基であるよう修飾されている軽鎖または (b) すべての低いおよび中程度の危険度の残基が、必要に応じて、ヒト参照免疫グロブリン配列と同一残基であるよう修飾されている軽鎖

4) 元のげっ歯類軽鎖と、少なくとも 60 %、より好ましくは、少なくとも 80 %、より好ましくは、少なくとも 85 %、より好ましくは、少なくとも 90 %、最も好ましくは、少なくとも 95 %、のアミノ酸配列同一性、例えば、65 %、70 %、75 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % および 100 % の同一性を有する、重鎖もしくは軽鎖または重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域を含む前節 (3) の前記抗体の変異タンパク質；

5) げっ歯類抗体の 1 以上の CDR の高い危険度の残基を含む、好ましくは、2 以上、または 3 以上、または 4 以上、または 5 以上、または 6 つすべての CDR の高い危険度の残基を含み、場合により、危険度の低いまたは中程度の残基に 1 以上の変更を含んでもよい、PRLR 結合性ポリペプチド；

例えば、低い危険度の残基に 1 以上の変更と、中程度の危険度の残基に保存的置換とを含む、または

例えば、中程度および高い危険度のアミノ酸残基を保持し、低い危険度の残基に 1 以上の変更を含み、

この場合、変更は、挿入、欠失または置換を含み、保存的置換であり得、操作された抗体が配列において、ヒト軽鎖または重鎖配列、ヒト生殖系列軽鎖または重鎖配列、コンセンサスヒト軽鎖または重鎖配列、またはコンセンサスヒト生殖系列軽鎖または重鎖配列とより近くになるようにさせ得る。このように考慮された変更はまた、以下のように配列形式で示すこともできる。AKKLVHTPYYSFKEDF という仮定上の配列では、Studnicka ら、米国特許第 5,766,886 号に従って各残基に割り当てられた個々の危険は、HMLHMLHMLHMLHML (H = 高い、M = 中程度、L = 低い) であり、仮定上の配列の危険度の低い残基への例示的変更は、AKXLVXTPTXSFXEDEX (式中、X は任意のアミノ酸であり、あるいは、X はその位置での元の残基の保存的置換である) として示すことができ、危険度の低いまたは中程度の残基の例示的変更は、同様に示すことができる、例えば、AYXLYYXTYXSYXEYX (式中、X は、任意の

10

20

30

40

50

アミノ酸であり、Yは、その位置での元の残基の保存的置換である)。

【0086】

用語「競合抗体」とは以下を含む

1) 抗体

【0087】

【化16】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2,

he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130,

XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159,

10

XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192,

XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212,

XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239,

XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 または

XHA.06.907

と同じPRLRのエピトープと結合すると、例えば、X線結晶学によって調べられた、非マウスまたは非げっ歯類モノクローナル抗体；および／または

20

2) 抗体

【0088】

【化17】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2,

he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131,

XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163,

XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202,

XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217,

30

XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145,

XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

と、75%を超えて、80%を超えて、または81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%または95%を超えて競合する非マウスまたは非げっ歯類モノクローナル抗体；あるいは、

【0089】

40

【化18】

chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189, または XHA.06.907

10

の結合を、少なくとも2、3、4、5、6、10、20、50、100倍以上低減する非マウスまたは非げっ歯類モノクローナル抗体。一実施形態では、非マウスまたは非げっ歯類モノクローナル抗体は、50倍モル過剰である。

【0090】

本発明の抗体は、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M以下の平衡解離定数でPRLRのECDと結合することが好ましく、例えば、STAT5、MAPKまたはAKTの活性化によって、PRLR細胞内リン酸化および下流PRLRシグナル伝達の活性化を阻害することが好ましい。

20

【0091】

本明細書の出願日より前に公開された、または本明細書の出願日より前に出願された出願に公開された任意のキメラ、ヒトまたはヒト化抗体は、本発明の範囲から場合により排除される。

【0092】

「非げっ歯類」モノクローナル抗体とは、げっ歯類ハイブリドーマによって生成された完全な無傷のげっ歯類モノクローナル抗体ではない、本明細書において広く定義される、任意の抗体である。したがって、非げっ歯類抗体は、具体的には、それだけには限らないが、げっ歯類抗体の変異タンパク質、げっ歯類抗体断片、線形抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体s、Human Engineered（商標）抗体およびヒト抗体、例えば、トランジエニック動物から、またはファージディスプレイ技術によって產生されたヒト抗体を含む。同様に、非マウス抗体として、それだけには限らないが、マウス抗体の変異タンパク質、マウス抗体断片、線形抗体、キメラ、ヒト化、Human Engineered（商標）およびヒト抗体が挙げられる。

30

【0093】

標的抗原

抗体の作製に用いられる標的抗原は、例えば、PRLRの細胞外部分、またはエピトープがその天然コンホーメーションでディスプレイされるのを可能にする、別のポリペプチドと場合により融合していてもよい、所望のエピトープを保持する断片であり得る。あるいは、細胞の表面に発現された無傷のPRLRを用いて抗体を作製することができる。このような細胞は、PRLRを発現するよう形質転換してもよいし、またはPRLRを発現するその他の天然に存在する細胞であり得る。抗体を作製するのに有用なPRLRポリペプチドのその他の形は、当業者には明らかである。

40

【0094】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連抗原およびアジュvantの複数回の皮下(s.c.)または腹膜内(i.p.)注射によって動物において作製されることが好ましい。改善された抗体反応は、二官能性剤または誘導体化剤、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したコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミ

50

ド（リシン残基を介した）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当技術分野で公知のその他の薬剤を用いて、関連抗原を、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビターとコンジュゲートすることによって得ることができる。

【0095】

例えば、 $100\text{ }\mu\text{g}$ または $5\text{ }\mu\text{g}$ のタンパク質またはコンジュゲート（それぞれ、ウサギまたはマウスに対して）を、3容積のフロイントの完全アジュバントと組み合わせ、この溶液を複数の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または誘導体に対して動物を免疫化する。1カ月後、フロイントの完全アジュバント中、ペプチドまたはコンジュゲートの元の量の $1/5$ （割合 $(1/10)$ ）を用い、複数の部位に皮下注射することによって動物をブーストする。ブースター注射の7～14日後、動物を出血させ、血清を抗体力価についてアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物をブーストする。動物を同一抗原であるが異なるタンパク質と、かつ／または異なる架橋試薬によってコンジュゲートされているコンジュゲートを用いてブーストすることが好ましい。コンジュゲートはまた、組換え細胞培養においてタンパク質融合物として作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤も、免疫応答を増強するために適切に用いられる。

10

【0096】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature、256：495頁（1975年）によって最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製してもよく、または組換えDNA法によって作製してもよい。

20

【0097】

ハイブリドーマ法では、マウスまたはその他の適当な宿主動物、例えば、ハムスターまたはマカクザルを、本明細書に記載されるように免疫化して、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か、産生できるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、in vitroで免疫化してもよい。次いで、適した融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いてリンパ球を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を形成するか（Goding、Monoclonal Antibodies：principles and practice、59～103頁（Academic Press、1986年））、または電気細胞融合を用いて融合できる。

30

【0098】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を播種し、好ましくは、融合していない、親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1種以上の物質を含む適した培養培地で増殖させる。例えば、親骨髄腫細胞は、酵素ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHprt）を欠き、ハイブリドーマの培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン（HAT培地）含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

40

【0099】

好ましい骨髄腫細胞は、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産生を支援し、培地に対して感受性であるものである。ヒト骨髄腫およびマウス・ヒトヘテロローマ細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生についても記載されている（Kozbor、J. Immunol.、133：3001頁（1984年）；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51～63頁（Marcel Dekker、Inc.、New York、1987年））。例示的マウス骨髄腫株としては、Salk Institute Cell Distribution Center、San Diego、Calif. USAから入手可能であるMOP-21およびM.C.-11マウス腫瘍に由来するもの、およびAmerican Type

50

Culture Collection, Rockville, Md. USA から入手可能である SP - 2 または X 63 - Ag 8 - 653 細胞が挙げられる。

【0100】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地を、抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって產生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、または *in vitro* 結合実験、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって調べることが好ましい。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スキヤッチャード解析法 (Munsonら、Anal. Biochem., 107: 220 頁 (1980 年)) によって調べることができる。

10

【0101】

所望の特異性、親和性、および / または活性の抗体を產生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈手順によってサブクローニングし、標準法によって増殖させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59 ~ 103 頁 (Academic Press, 1986 年))。この目的上、適した培養培地として、例えば、D-MEM または RPMI - 1640 培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物において腹水腫瘍として *in vivo* で増殖させることができる。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテイン A - セファロース、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、透析またはアフィニティークロマトグラフィーなどによって培養培地、腹水または血清から分離する

20

モノクローナル抗体をコードする DNA は、従来手順を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と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って)、ハイブリドーマ細胞から単離および配列決定できる。配列決定には、通常、注目する遺伝子または cDNA の少なくとも一部の単離が必要となる。通常、これには、モノクローナル抗体をコードする DNA、好ましくは、mRNA (すなわち、cDNA) をクローニングすることが必要である。クローニングは、標準技術を用いて実施する (例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら (1989 年) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 1 ~ 3 卷、Cold Spring Harbor Press 参照のこと)。例えば、cDNA ライブラリーを、ポリ A + mRNA、好ましくは、膜結合型 mRNA の逆転写によって構築し、このライブラリーをヒト免疫グロブリンポリペプチド遺伝子配列に特異的なプローブを用いてスクリーニングしてもよい。しかし、好ましい実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、注目する免疫グロブリン遺伝子セグメント (例えば、軽鎖可変セグメント) をコードする cDNA (または全長 cDNA の一部) を増幅する。増幅された配列は、任意の適したベクター、例えば、発現ベクター、ミニ遺伝子ベクターまたはファージディスプレイベクターに容易にクローニングできる。当然のことではあるが、用いられた特定のクローニング方法は、注目する免疫グロブリンポリペプチドのいくつかの部分の配列を調べることが可能である限り、決定的なものではない。本明細書において、「単離」核酸分子または「単離」核酸配列とは、(1) 同定され、核酸の天然供給源中では通常関連している、少なくとも 1 種の夾雑核酸分子から分離されているか、または (2) クローニングされ、増幅され、タグがつけられるか、そうでなければ、注目する核酸の配列を決定することができるようバックグラウンド核酸と区別されているのいずれかである核酸分子が、単離されていると考えられる。単離核酸分子は、天然に見られる形または設定以外である。したがって、単離核酸分子は、天然の細胞中に存在するような核酸分子と区別される。しかし、単離核酸分子は、通常、天然細胞のものとは異なる染色体位置にある、抗体を発現する細胞中に含まれる核酸分子を含む。

30

【0102】

クローニングおよび配列決定に用いた RNA の 1 種の供給源として、トランスジェニックマウスから B 細胞を得、この B 細胞を不死細胞と融合することによって作製されたハイ

40

50

プリドーマがある。ハイブリドーマを用いることの利点は、それらを容易にスクリーニングでき、注目するヒトモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマが選択されることである。あるいは、RNAは、免疫化された動物のB細胞（または脾臓全体）から単離できる。ハイブリドーマ以外の供給源が用いられる場合には、特異的結合特性を有する免疫グロブリンまたは免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列をスクリーニングすることが望ましい場合がある。このようなスクリーニングのための1つの方法として、ファージディスプレイ技術の使用がある。ファージディスプレイは、例えば、各々、参照により本明細書に組み込まれる、Dowerら、WO 91/17271、McCafertryら、WO 92/01047ならびにCatonおよびKoprowski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6450~6454頁（1990年）に記載されている。ファージディスプレイ技術を用いる一実施形態では、免疫化されたトランスジェニックマウス（例えば、全脾臓cDNA）から得たcDNAを単離し、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、免疫グロブリンポリペプチドの一部、例えば、CDR領域をコードするcDNA配列を増幅し、増幅された配列をファージベクターに挿入する。所望の結合特性を有する、注目するペプチド、例えば、可変領域ペプチドをコードするcDNAを、パニングなどの標準技術によって同定する。

10

【0103】

次いで、増幅されるか、クローニングされた核酸の配列を調べる。通常、免疫グロブリンポリペプチドの全可変領域をコードする配列を調べるが、可変領域の一部のみ、例えば、CDRをコードする部分を配列決定することが適当である場合がある。通常、配列決定される部分は、少なくとも30塩基の長さであるが、コードに基づいて、可変領域の長さの少なくとも約1/3または少なくとも約1/2が配列決定されることがより多い。

20

【0104】

配列決定は、cDNAライブラリーから単離されたクローンで、またはPCRが用いられる場合には、増幅された配列をサブクローニングした後に、または増幅されたセグメントの直接PCR配列決定によって実施できる。配列決定は、標準技術を用いて実施する（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning: A Laboratory Guide、1~3巻、Cold Spring Harbor PressおよびSanger, F.ら（1977年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463~5467頁参照のこと）。クローニングされた核酸の配列を、ヒト免疫グロブリン遺伝子およびcDNAの公開された配列と比較することによって、当業者ならば、配列決定された領域に応じて、（i）ハイブリドーマ免疫グロブリンポリペプチド（重鎖のアイソタイプを含む）の生殖系列セグメント使用および（ii）N領域付加および体細胞突然変異の過程から得られた配列を含む、重鎖および軽鎖可変領域の配列を容易に決定することができる。免疫グロブリン遺伝子配列情報の1つの供給源として、National Center for Biotechnology Information、National Library of Medicine、National Institutes of Health、Bethesda、Mdがある。

30

【0105】

40

抗体断片

上記のように、抗体断片は、無傷の全長抗体の一部、好ましくは、無傷抗体の抗原結合または可変領域を含み、抗体断片から形成された線形抗体および多重特異性抗体を含む。抗体断片の限定されない例として、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、Fd、ドメイン抗体（dAb）、相補性決定領域（CDR）断片、一本鎖抗体（scFv）、一本鎖抗体断片、ダイアボディー、トリアボディー（triaabodies）、テトラボディー（tetrabodies）、ミニボディー、線形抗体、キレート化組換え抗体、トリボディー（tribodies）またはビボディー（ibodies）、イントラボディー（intrabodies）、ナノボディー（nanobodies）、スマート・モジュラー・イミュノファーマシューティカルズ（small modular imm

50

unopharmaceuticals) (S M I P)、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、キャメライズド(camelized)抗体、V H H含有抗体またはそれらの変異タンパク質もしくは誘導体、ならびに抗体が所望の生物活性を保持する限り、C D R配列などのポリペプチドとの特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが挙げられる。このような抗原断片は、全抗体の修飾によって作製してもよいし、または組換えD N A技術またはペプチド合成を用いてde novo合成してもよい。

【0106】

用語「ダイアボディー」とは、2つの抗原結合部位を含む小さな抗体断片を指し、この断片は、同一ポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(V L)と連結している重鎖可変ドメイン(V H)(V H V L)を含む。同一鎖上の2つのドメイン間に、短すぎて対形成できないリンカーを用いることによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成を強いられ、2つの抗原結合部位が作られる。ダイアボディーは、例えば、E P 4 0 4 , 0 9 7 ; W O 9 3 / 1 1 1 6 1 ; および 3 0 H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 9 0 : 6 4 4 4 ~ 6 4 4 8 頁(1993年)により十分に記載されている。10

【0107】

「一本鎖F v」または「sc F v」抗体断片は、抗体のV HおよびV Lドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在し、V HとV Lドメインの間に、F vが、抗原結合にとって所望の構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーを場合により含んでもよい(B i r d ら、S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 ~ 4 2 6 頁、1988年およびH u s t o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 ~ 5 8 8 3 頁、1988年)。Fd断片は、V HおよびC H 1ドメインからなる。20

【0108】

さらなる抗体断片は、V Hドメインからなるドメイン抗体(dAb)断片(W a r d ら、N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 ~ 5 4 6 頁、1989年)を含む。

【0109】

「線形抗体」は、1対のタンデムなFdセグメント(V H - C H 1 - V H - C H 1)を含み、これが1対の抗原結合領域を形成する。線形抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る(Z a p a t a ら、タンパク質E n g . 8 : 1 0 5 7 ~ 6 2 頁(1995年))。30

【0110】

ペプチドリンカー(ヒンジなし(h i n g e l e s s))を介して、またはI g Gヒンジを介してC H 3と融合しているsc F vからなる「ミニボディー」が、O l a f s e n ら、P r o t e i n E n g D e s S e l . 2 0 0 4 A p r ; 1 7 (4) : 3 1 5 ~ 2 3 頁に記載されている。

【0111】

軽鎖を欠く機能的重鎖抗体は、ナースシャーク(n u r s e s h a r k s)(G r e enberg ら、N a t u r e 3 7 4 : 1 6 8 ~ 7 3 頁、1995年)、ウォビゴンシャーク(w o b b e g o n g s h a r k s)(N u t t a l l ら、M o l I mmun o l . 3 8 : 3 1 3 ~ 2 6 頁、2001年)およびラクダ科、例えば、ラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびラマ(H a m e r s - C a s t e r m a n ら、N a t u r e 3 6 3 : 4 4 6 ~ 8 頁、1993年；N g u y e n ら、J . M o l . B i o l . 2 7 5 : 4 1 3 頁、1998年)では天然に存在する。抗原結合部位は、これらの動物では、単一のドメイン、V H Hドメインに減少している。これらの抗体は、重鎖可変領域のみを用いて抗原結合領域を形成する。すなわち、これらの機能的抗体は、重鎖のみのホモ二量体であり、構造H 2 L 2を有する(「重鎖抗体」または「H C A b s」と呼ばれる)。キャメライズド(c a m e l i z e d)V H Hは、ヒンジ、C H 2およびC H 3ドメインを含み、C H 1ドメインを欠くI g G 2およびI g G 3定常領域と再結合すると報告されている(H40
50

amers - Castermanら、前掲）。例えば、ラマ Ig G 1 は、V_H が、ヒンジ、CH1、CH2 および CH3 ドメインを含む定常領域と再結合する従来の (H₂L₂) 抗体アイソタイプであるが、ラマ Ig G 2 および Ig G 3 は、CH1 ドメインを欠き、軽鎖を含まない重鎖のみのアイソタイプである。従来の V_H のみの断片は、可溶性型を產生することが困難であるが、溶解度および特異的結合の改善は、フレームワーク残基がより VH_H 様であるよう変更される場合に得ることができる。（例えば、Reichmannら、J. Immunol. Methods 1999; 231: 25~38 頁参照のこと）。キャメライズド (camelized) VH_H ドメインは、高親和性を有する抗原と結合し (Desmyterら、J. Biol. Chem. 276: 26285~90 頁、2001 年)、溶液中で高い安定性を有すること (Ewert ら、Biochemistry 41: 3628~36 頁、2002 年) がわかっている。キャメライズド (camelized) 重鎖を有する抗体を作製する方法は、例えば、米国特許公報第 20050136049 号および同 20050037421 号に記載されている。10

【0112】

重鎖抗体の可変ドメインは、分子量がわずか 15 kDa である、最も小さい十分に機能的な抗原結合断片であるので、この実体はナノボディーと呼ばれる (Cortez - Retamozzo ら、Cancer Research 64: 2853~57 頁、2004 年)。ナノボディーライブリーは、Conrath ら (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807~12 頁、2001 年) に記載されるように免疫化されたヒトコブラクダから、またはに記載される組換え法を用いて作製できる。20

【0113】

イントラボディー (intrabodies) は、細胞内発現を示し、細胞内タンパク質機能を操作できる一本鎖抗体である (Biocca ら、EMBO J. 9: 101~108 頁、1990 年; Colby ら、Proc Natl Acad Sci USA. 101: 17616~21 頁、2004 年)。抗体構築物を細胞内領域に保持する細胞シグナル配列を含むイントラボディー (intrabodies) は、Mhashilkar ら (EMBO J. 14: 1542~51 頁、1995 年) および Wheeler ら (FASEB J. 17: 1733~5 頁、2003 年) に記載されるように作製できる。トランスポディー (Transbodies) は、タンパク質遺伝子導入ドメイン (PTD) が、一本鎖可変断片 (scFv) 抗体と融合している細胞透過性抗体である、Heng ら (Med Hypotheses. 64: 1105~8 頁、2005 年)。30

【0114】

さらに考慮されるものとして、標的タンパク質に特異的な SMI P または結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体がある。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を実施するのに必要な免疫グロブリンドメインと融合している抗原結合ドメインを含む一本鎖ポリペプチドである。例えば、WO 03/041600、米国特許公報第 20030133939 号および米国特許公報第 20030118592 参照のこと。

【0115】

多価抗体

いくつかの実施形態では、多価またはさらに多重特異性（例えば、二重特異性、三重特異性など）モノクローナル抗体を作製することが望ましい場合がある。このような抗体は、標的抗原の少なくとも 2 種の異なるエピトープに対して結合特異性を有し得るか、あるいは、2 種の異なる分子と、例えば、標的抗原とおよび細胞表面タンパク質または受容体と結合し得る。例えば、二重特異性抗体は、標的と結合するアームと、白血球に対する誘発分子、例えば、T 細胞受容体分子（例えば、CD2 または CD3）または IgG の Fc (Fc R)、例えば、Fc R I (CD64)、Fc R II (CD32) および Fc R III (CD16) 受容体と結合して、細胞防御機構を標的発現細胞に集中させるもう 1 つのアームとを含み得る。別の例として、二重特異性抗体を用いて、細胞傷害剤を、標的抗原を発現する細胞に局在化させることができる。これらの抗体は、標的結合アームと、細胞傷害剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン - 60、ビンカアルカロイド、40

10

20

30

40

50

リシンA鎖、メトレキサートまたは放射性同位元素ハプテン)と結合するアームとを有する。多重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片として調製できる。

【0116】

二重特異性抗体は、架橋または「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中の抗体の一方は、アビジンとカップリングでき、もう一方はビオチンとカップリングできる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合な架橋法を用いて作製できる。適した架橋剤は、当技術分野で周知であり、米国特許第4,676,980号に、いくつかの架橋技術とともに開示されている。

【0117】

二重特異性抗体を作製するためのもう1つのアプローチによれば、抗体分子対の間の界面を、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にするよう設計できる。好ましい界面は、少なくとも抗体定常ドメインのC_H3ドメインの一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面に由来する1以上の小さなアミノ酸側鎖を、大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)と置換する。大きな側鎖(複数の側鎖)と同一または類似の大きさの補整性「空洞」を、大きなアミノ酸側鎖を小さなもの(例えば、アラニンまたはトレオニン)と置換することによって第2の抗体分子の界面に作製する。これによって、その他の不要な最終産物、例えば、ホモ二量体を上回って、ヘテロ二量体の収率を増大する機序が提供される。1996年9月6日に公開されたWO96/27011参照のこと。

10

【0118】

抗体断片から二重特異性抗体を作製する技術は、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製できる。Brennanら、Science 229:81頁(1985年)には、無傷の抗体をタンパク質分解的に切断して、Fab'₂断片を作製する手順が記載されている。これらの断片を、ジチオール錯化剤亞ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して、隣接するジチオールを安定化し、分子内ジスルフィド形成を防ぐ。次いで、作製されたFab'₂断片を、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、Fab'₂-TNB誘導体の一方を、メルカプトエチルアミンを用いる還元によってFab'₂-チオールに再変換し、等モル量のもう一方のFab'₂-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。作製された二重特異性抗体を、酵素の選択的固定化のための物質として用いることができる。Bettlerら、Science 240:1041~1043頁(1988年)には、細菌からの機能性抗体断片の分泌が開示されている(例えば、Bettlerら、Skerraら。Science 240:1038~1041頁(1988年)参照のこと)。例えば、Fab'₂-SH断片は、大腸菌(E.coli)から直接回収し、化学的にカップリングして、二重特異性抗体を形成できる(Carterら、Bio/Technology 10:163~167頁(1992年); Shalabyら、J.Exp.Med.175:217~225頁(1992年))。

20

30

【0119】

Shalabyら、J.Exp.Med.175:217~225頁(1992年)には、十分にヒト化された二重特異性抗体Fab'₂分子の作製が記載されている。各Fab'₂断片を、大腸菌から別個に分泌させ、in vitroで定方向化学的カップリングに付し、二重特異性抗体を形成する。このように形成された二重特異性抗体は、HER2受容体を過剰発現する細胞および正常ヒトT細胞と結合でき、ならびに、ヒト乳腺腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発した

40

組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体を作製および単離するための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパー、例えば、GCN4を用いて作製されている(大まかには、Kostelnýら、J.Immunol.148(5):1547~1553頁(1992)参照のこと)。FossおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2種の異なる抗体のFab'部分と連結した。抗体ホモ二量体を、ヒンジ領域で還元して单量体を形成し、次いで、再酸

50

化して抗体ヘテロ二量体を形成する。この方法はまた、抗体ホモ二量体の作製のために利用できる。

【0120】

用語「ダイアボディー」とは、2つの抗原結合部位を含む小さい抗体断片を指し、この断片は、同一ポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン（VL）と連結している重鎖可変ドメイン（VH）（VH VL）を含む。同一鎖上の2つのドメイン間に、短すぎて対形成できないリンカーを用いることによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成を強いられ、2つの抗原結合部位が作られる。例えば、Hollingsheadら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444~6448頁（1993年）参照のこと。10

【0121】

二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Grublerら、J. Immunol. 152: 5368頁（1994年）参照のこと。

【0122】

あるいは、二重特異性抗体は、Zapataら、タンパク質 Eng. 8(10): 1057~1062頁（1995年）に記載されるとおりに作製された「線形抗体」であり得る。手短には、これらの抗体は、1対のタンデムなFdセグメント（V_H-C_H1-V_H-C_H1）を含み、これが1対の抗原結合領域を形成する。線形抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る。20

【0123】

2より多い結合価を有する抗体も考慮される。例えば、三重特異性抗体を調製できる（Tuttleら、J. Immunol. 147: 60頁（1991年））。

【0124】

「キレート化組換え抗体」とは、標的抗原の隣接するオーバーラップしていないエピトープを認識する二重特異性抗体であり、両エピトープと同時に結合するのに十分なよう曲がりやすい（Neriら、J. Mol. Biol. 246: 367~73頁、1995年）。

【0125】

二重特異性Fab-scFv（「ビボディー（biobody）」）および三重特異性Fab-（scFv）（2）（「トリボディー（tribody）」）の作製が、Schonjansら（J. Immunol. 165: 7050~57頁、2000年）およびWilllemsら（J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 786: 161~76頁、2003年）に記載されている。ビボディー（biobodies）またはトリボディー（tribodies）については、scFv分子を、VL-CL（L）およびVH-CH₁（Fd）鎖の一方または両方と融合する。例えば、トリボディー（tribody）を作製するために、2つのscFvsを、FabのC末端と融合するのに対し、ビボディー（biobody）では、1つのscFvをFabのC末端と融合する。30

【0126】

抗体の組換え製造

抗体は、当技術分野で周知の抗体発現系の1つを用いて組換えDNA法によって作製できる（例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory（1988年）参照のこと）。

【0127】

本発明の抗体をコードするDNAは、発現ベクターに入れることができ、次いで、これを、大腸菌細胞、サルCOS細胞、ヒト胚腎臓293細胞（例えば、293E細胞）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。抗体の組換え製造は、当技術分野では周知である4050

。抗体断片は、無傷の抗体のタンパク質消化によって得られてきた（例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107~117頁（1992年）およびBrennanら、Science 229: 81（1985年）参照のこと）。しかし、これらの断片は、今では、組換え宿主細胞によって直接產生され得る。ペプチド合成および共有結合をはじめとする抗体断片を作製するためのその他の技術は、当業者には明らかである。

【0128】

発現制御配列とは、特定の宿主生物における、機能し得る形で連結しているコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。原核生物に適している制御配列として、例えば、プロモーター、場合により、オペレーター配列およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することがわかっている。

10

【0129】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係におかれている場合に機能し得る形で連結している。例えば、プレ配列または分泌リーダーDNAは、ポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現される場合に、ポリペプチドのDNAと作動可能に連結しており；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合に、コード配列と作動可能に連結しており；リボソーム結合部位は、翻訳を促進するよう位置している場合に、機能し得る形で連結している。通常、DNA配列が連結している機能し得る形で連結している手段は、近接しており、分泌リーダーの場合には、近接しており、リーディング相にある。しかし、エンハンサーは、近接している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを、従来の実施にしたがって用いる。

20

【0130】

細胞、細胞株および細胞培養は、同義的に用いられることが多く、本明細書において、すべてのこのような表示は後代を含む。形質転換体および形質転換された細胞は、初代対象細胞および移動の数に関わらずそれに由来する培養物を含む。また、すべての後代は、意図的なまたは偶発的な突然変異のために、DNA含量において厳密には同一ではない可能性があるということも理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたものと同一の機能または生物活性を有する突然変異後代が含まれる。個々の表示が対象とされる場合には、文脈から明らかである。

30

【0131】

代替実施形態では、注目する免疫グロブリンのアミノ酸配列は、直接タンパク質配列決定によって調べることができる。適したコード化ヌクレオチド配列は、一般的なコドン表に従って設計できる。

40

【0132】

所望の抗体のアミノ酸配列変異タンパク質は、コード化DNAに適当なヌクレオチド変更を導入することによって、またはペプチド合成によって調製できる。このような変異タンパク質は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および/または抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入および/または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換を含む。最終構築物が所望の特徴を有するという条件で、任意の組み合わせの欠失、挿入および置換が最終構築物に達するよう作製される。アミノ酸の変更はまた、グリコシリ化部位の数または位置を変更するなど、モノクローナル、ヒト、ヒト化、Human Engineered（商標）または変異タンパク質抗体の翻訳後プロセスも変更し得る。

【0133】

抗体のアミノ酸配列変異タンパク質をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の種々の方法によって調製される。これらの方法として、それだけには限らないが、天然供給源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列変異タンパク質の場合には）またはオリゴヌクレオチド媒介性（または部位指定）突然変異誘発、PCR突然変異誘発および先に調製された変異タンパク質または非変異タンパク質型の抗体のカセット突然変異誘発による調製

50

が挙げられる。

【0134】

本発明はまた、宿主細胞によって認識される制御配列と作動可能に連結されている本発明の抗体をコードする単離核酸、核酸を含むベクターおよび宿主細胞ならびに核酸が発現されるよう宿主細胞を培養することおよび宿主細胞培養物または培養培地から抗体を場合により回収することを含み得る、抗体を作製するための組換え技術を提供する。

【0135】

抗体の組換え製造には、それをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング(DNAの増幅)のために、または発現のために複製ベクターに挿入する。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手順を用いて(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と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って)、容易に単離され、配列決定される。多数のベクターが利用可能である。ベクター成分は、通常、それだけには限らないが、以下のうち1種以上を含む:シグナル配列、複製起点、1種以上の選択マーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーターおよび転写終結配列。

10

【0136】

(1) シグナル配列成分

本発明の抗体は、直接的にだけでなく、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有するシグナル配列またはその他のポリペプチドであることが好ましい、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換えによって製造できる。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(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであることが好ましい。原核生物の宿主細胞が、天然抗体シグナル配列を認識およびプロセシングしない場合には、シグナル配列は、例えば、ペクチン酸リアーゼ(例えば、*p e l B*)アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、*l p p*または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーからなる群から選択されるシグナル配列によって置換されてもよい。酵母分泌には、天然シグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー(サッカロミセス(*S a c c h a r o m y c e s*)およびクリベロマイセス(*K l u y v e r o m y c e s*)-因子リーダーを含む)または酸性ホスファターゼリーダー、*C.アルビカンス*(*a l b i c a n s*)グルコアミラーゼリーダーまたはWO90/13646に記載されるシグナルによって置換されてもよい。哺乳類細胞発現では、哺乳類シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペス*g D*シグナルが利用可能である。

20

【0137】

このような前駆体領域のDNAを、リーディングフレームで、抗体をコードするDMAとライゲーションする。

【0138】

(2) 複製起点成分

発現およびクローニングベクターの両方とも、1種以上の選択された宿主細胞においてベクターが複製するのを可能にする核酸配列を含む。通常、クローニングベクターでは、この配列は、ベクターが、宿虫染色体DNAを独立に複製するのを可能にするものであり、複製起点または自立複製配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについて周知である。プラスミド*p B R 3 2 2*に由来する複製起点は、ほとんどのグラム陰性菌に適しており、2μのプラスミド起点が酵母に適しており、種々のウイルス起点が、哺乳類細胞におけるクローニングベクターにとって有用である。通常、複製起点成分は、哺乳類発現ベクター(通常、SV40起点が使用できるが、これは初期プロモーターを含むためである)には必要ではない。

40

【0139】

(3) 選択マーカー成分

発現およびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる、選択遺伝子を含み得る。通常の選択遺伝子は、(a)抗生物質およびその他の毒素、例えば、アンピシリン、

50

ネオマイシン、メトトレキサート、テトラサイクリン、G 4 1 8、ジェネティシン、ヒスチジノールまたはミコフェノール酸に対する耐性を付与する、(b) 栄養要求性の欠陥を補完する、(c) 複合培地からは利用できない重要な栄養、例えば、桿菌の D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

【 0 1 4 0 】

選択スキームの一例は、宿主細胞の増殖を停止する薬物を利用する。異種遺伝子を用いる形質転換に成功した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を產生し、したがって、選択計画を生き残る。このような優性選択には、薬物メトトレキサート、ネオマイシン、ヒスチジノール、ピューロマイシン、ミコフェノール酸およびハイグロマイシン使用する。

【 0 1 4 1 】

哺乳類細胞に適した選択マーカーの別の例として、抗体をコードする核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするもの、例えば、D H F R、チミジン キナーゼ、メタロチオネイン - I および - I I 、好ましくは、靈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などがある。

【 0 1 4 2 】

例えば、D H F R 選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず、すべての形質転換体を、メトトレキサート (M t x) 、D H F R の競合アンタゴニストを含む培養培地で培養することによって同定される。野生型D H F R が用いられる場合には、適当な宿主細胞として、D H F R 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞株がある。

【 0 1 4 3 】

あるいは、本発明の抗体をコードするD N A配列、野生型D H F R タンパク質およびアミノグリコシド3' - ホスホトランスフェラーゼ (A P H) などの別の選択マーカーを用いて形質転換された、または同時形質転換された宿主細胞（特に、内因性D H F R を含む野生型宿主）を、選択マーカーの選択物質、例えば、アミノグリコシド系抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシンまたはG 4 1 8 を含有する培地での細胞増殖によって選択できる。米国特許第4,965,199参照のこと。

【 0 1 4 4 】

酵母において使用するための適した選択遺伝子として、酵母プラスミドY R p 7 に存在するt r p 1 遺伝子がある (S t i n c h c o m b ら、N a t u r e 、2 8 2 : 3 9 頁 (1 9 7 9 年)) 。t r p 1 遺伝子は、トリプトファンにおいて増殖する能力を欠く酵母の突然変異株、例えば、A T C C 番号4 4 0 7 6 またはP E P 4 - 1 の選択マーカーを提供する。J o n e s 、G e n e t i c s 、8 5 : 1 2 頁 (1 9 7 7 年) 。酵母宿主細胞ゲノム中のt r p 1 破壊の存在は、次には、トリプトファンの不在下での増殖によって形質転換を検出するのに有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 に欠陥のある酵母株 (A T C C 2 0 , 6 2 2 または3 8 , 6 2 6) は、L e u 2 遺伝子を保有する既知プラスミドによって補完される。U r a 3 に欠陥のある酵母株は、u r a 3 遺伝子を保有するプラスミドによって補完される。

【 0 1 4 5 】

さらに、1 . 6 μ mの環状プラスミドp K D 1 に由来するベクターは、クリベロマイセス属酵母の形質転換に使用できる。あるいは、組換えウシキモシンの大規模製造のための発現系がK . l a c t i s . について報告された。V a n d e n B e r g 、B i o / T e c h n o l o g y 、8 : 1 3 5 頁 (1 9 9 0 年) 。クリベロマイセス属の工業用株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定なマルチコピー発現ベクターも、開示されている。F l e e r ら、B i o / T e c h n o l o g y 、9 : 9 6 8 ~ 9 7 5 頁 (1 9 9 1 年) 。

【 0 1 4 6 】

(4) プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗体をコードする核酸と作動可能に連結しているプロモーターを含む。原核生物宿主とともに用いるのに適したプロモーターとして、アラビノース (例えは、a r a B) プロモーター p h o A

10

20

30

40

50

プロモーター、 - ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーター系およびハイブリッドプロモーター、例えば、 t a c プロモーターが挙げられる。しかし、その他の既知細菌プロモーターも適している。細菌系において使用するためのプロモーターはまた、本発明の抗体をコードする DNA と作動可能に連結しているシャイン - ダルガノ (S . D .) 配列を含む。

【 0 1 4 7 】

プロモーター配列は真核生物についても知られている。事実上すべての真核細胞遺伝子は、転写が開始される部位から約 25 ~ 30 塩基上流に位置する A T リッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写の開始から 70 ~ 80 塩基上流に見られる別の配列として、 C N C A A T 領域 (式中、 N は任意のヌクレオチドであり得る) がある。ほとんどの真核細胞遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A テールの付加のためのシグナルであり得る A A T A A A 配列がある。これらの配列のすべては、真核細胞発現ベクターに適切に挿入される。

10

【 0 1 4 8 】

酵母宿主とともに用いるための適した促進配列の例として、 3 - ホスホグリセレートキナーゼまたはその他の解糖酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、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ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

20

【 0 1 4 9 】

増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導プロモーターである他の酵母プロモーターとして、アルコールデヒドロゲナーゼ 2 、イソチトクローム C 、酸性ホスファターゼ、窒素代謝と関連している分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼおよびマルトースおよびガラクトース利用に関する酵素のプロモーター領域がある。酵母発現において使用するための適したベクターおよびプロモーターは、 E P 73 , 657 にさらに記載されている。酵母エンハンサーはまた、酵母プロモーターとともに有利に用いられる。

【 0 1 5 0 】

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの抗体転写は、例えば、エイブルソン白血病ウイルス、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (例えは、アデノウイルス 2) 、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、最も好ましくは、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、サルウイルス 40 (S V 40) などのウイルスのゲノムから得られたプロモーター、異種哺乳類プロモーターから得られたプロモーター、例えは、アクチンプロモーターまた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から得られたプロモーターによって制御される (ただし、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合する) 。

30

【 0 1 5 1 】

S V 40 ウィルスの初期および後期プロモーターは、好都合なことに、 S V 40 ウィルス複製起点も含む S V 40 制限断片として得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、好都合なことに、 H i n d I I I 制限断片として得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを用いて哺乳類宿主において DNA を発現する系が、米国特許第 4 , 419 , 446 号に開示されている。この系の改変が、米国特許第 4 , 601 , 978 号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト - インターフェロン c DNA の発現については、 R e y e s ら、 N a t u r e 297 : 598 ~ 601 頁 (1982 年) も参照のこと。あるいは、プロモーターとして、ラウス肉腫ウイルス長い末端反復配列を使用できる。

40

【 0 1 5 2 】

(5) エンハンサー要素成分

高等真核生物による本発明の抗体をコードする DNA の転写は、ベクターにエンハンサ

50

ー配列を挿入することによって増大されることが多い。今では、哺乳類遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 β -フェトプロテインおよびインスリン）から、多数のエンハンサー配列が知られている。しかし、通常、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを用いる。例として、複製起点の後側（bp 100～270）のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核細胞のプロモーターの活性化のためのエンハンサー要素に関してはYaniv、Nature 297: 17～18頁（1982年）も参考のこと。エンハンサーは、抗体をコードする配列の5'または3'でベクターにスプライスされ得るが、プロモーターから5'の部位に位置することが好みしい。

10

【0153】

(6) 転写終結成分

真核細胞の宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたはその他の多細胞生物由来の有核細胞）において用いられる発現ベクターはまた、転写の終結に、およびmRNAを安定化するのに必要な配列も含む。このような配列は、通常、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'末端、場合により3'非翻訳領域から利用できる。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分において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。1つの有用な転写終結成分として、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域がある。WO 94/11026およびその中で開示される発現ベクターを参考のこと。もう1つとして、マウス免疫グロブリン軽鎖転写ターミネーターがある。

20

【0154】

(7) 宿主細胞の選択および形質転換

本明細書においてベクターにおいてDNAをクローニングまたは発現するのに適した宿主細胞として、上記の原核生物、酵母または高等真核生物細胞がある。この目的上、適した原核生物として、真正細菌、例えば、グラム陰性またはグラム陽性菌、例えば、エシエリキア属、例えば、大腸菌、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ菌属、例えば、ネズミチフス菌、セラチア属、例えば、セラチア・マルセスカン（*Serratia marcescans*）および赤痢菌属などの腸内細菌科ならびにバチルス属、例えば、枯草菌およびリケニホルミス菌（例えば、1989年4月12日に公開されたDD266,710に開示されるリケニホルミス菌41P）、シュードモナス属、例えば、緑膿菌およびストレプトマイセス属が挙げられる。1つの好みしい大腸菌クローニング宿主として、大腸菌294（ATCC31,446）があるが、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC31,537）および大腸菌W3110（ATCC27,325）などのその他の株も適している。これらの例は、制限というよりも、例示的なものである。

30

【0155】

原核生物に加え、真核細胞の微生物、例えば、糸状菌または酵母は、抗体をコードするベクターにとって適したクローニングまたは発現宿主である。サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）または一般的なパン酵母は、低級真核細胞の宿主微生物の中で最もよく用いられているものである。しかし、いくつかのその他の属、種および株、例えば、分裂酵母；クリベロマイセス属宿主、例えば、K.ラクチス（*Lactis*）、K. フラギリス（*fragilis*）（ATCC12,424）、K. ブルガリカス（*Bulgariacus*）（ATCC16,045）、K. ウィケラミー（*wickeramii*）（ATCC24,178）、K. ワルチー（*waltii*）（ATCC56,500）、K. ドロソフィラルム（*drosophilae*）（ATCC36,906）、K. サーモトレランス（*thermotolerans*）およびK. マルキシアナス（*marxiannus*）；ヤロウイア属（EP402,226）；ピキア・パストルス（*Pichia pastoris*）（EP183,070）；カンジダ；トリコデルマ・レーシア（*Trichoderma reesiae*）（EP24

40

50

4, 234); アカパンカビ; シュワニオマイセス (*Schwanniomyces*)、例えば、シュワニオマイセス・オシーデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*); および糸状菌、例えば、アカパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム属およびアスペルギルス属、例えば *A. nidulans* および *A. niger* は、一般に入手可能であり、本明細書において有用である。

【0156】

グリコシリ化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例として、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株および変異体ならびにヨトウガ(イモムシ)、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)およびカイコなどの宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV の L-1 変異体およびカイコNPV の Bm-5 株は、公的に入手可能であり、このようなウイルスは、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、本発明に従って本明細書においてウイルスとして使用できる。

【0157】

綿、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、タバコ、レムナ (*lemonia*) および他の植物細胞の植物細胞培養物も、宿主として利用できる。

【0158】

しかし、興味は、脊椎動物細胞において最大であり、脊椎動物細胞の培養(組織培養)における増殖は慣例の手順となっている。有用な哺乳類宿主細胞株として、チャイニーズハムスター卵巣細胞、例えば、CHO K1 細胞 (ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44 およびチャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Ur1au bら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 頁 (1980 年)) ; SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎臓株 (293 または懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた 293 細胞 [Grahamら、J. Gen. Virology 36: 59 頁 (1977 年)] ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL10) ; マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、Biol. Reprod. 23: 243~251 頁 (1980 年)) ; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34) ; バッファロー-ラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065) ; マウス乳房腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL51) ; TRI 細胞 (Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44~68 頁 (1982 年)) ; MRC5 細胞 ; FS4 細胞 ; およびヒト肝細胞腫株 (Hep G2) がある。

【0159】

宿主細胞は、抗体製造のために上記の発現またはクローニングベクターを用いて形質転換されるか、トランスフェクトされ、プロモーターを導入し、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、必要に応じて改変された従来の栄養培地で培養される。さらに、新規ベクターおよび選択マークによって分離される複数コピーの転写単位を用いてトランスフェクトされた細胞株は、特に有用であり、抗体の発現にとって好ましい。

【0160】

(8) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を製造するために用いられる宿主細胞は、種々の培地で培養できる。Ham's F10 (Sigma)、基礎培地 ((MEM)、(Sigma)、 RPMI-1640 (Sigma) およびダルベッコの改変イーグル培地 ((D MEM)、Sigma

10

20

30

40

50

)などの市販の培地は、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Hamら、Meth. Enz. 58: 44頁(1979年)、Barnesら、Anal. Biochem. 102: 255頁(1980年)、米国特許第4,767,704号；同4,657,866号；同4,927,762号；同4,560,655号；または同5,122,469号；WO 90103430；WO 87/00195；または米国特許再発行番号30,985に記載される培地のいずれも、宿主細胞の培養培地として使用してよい。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／またはその他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリンまたは上皮細胞増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびホスフェート）、バッファー（例えば、HEPES）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ゲンタマイシン（商標）薬）、微量元素（通常、マクロモル範囲の最終濃度で存在する、無機化合物として定義される）およびグルコースまたは同等のエネルギー供給源を補給され得る。任意のその他の必要な栄養補助剤はまた、当業者に公知である適当な濃度で含まれ得る。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞について先に用いたものであり、当業者には明らかである。

10

【0161】

(9) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合には、抗体は、原形質周辺空間において細胞内で産生され得るか、または、例えば、微生物培養物から培地中に直接分泌される。抗体が細胞内で産生される場合には、第1のステップとして、微粒子細片、宿主細胞または溶解した断片のいずれかを、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去する。BettlerらScience 240: 1041～1043頁(1988年)；ICSU Short Reports 10: 105頁(1990年)；およびProc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457～461頁(1993年)には、大腸菌の原形質周辺空間に分泌される抗体を単離する手順が記載されている。（[Carterら、Bio/Technology 10: 163～167頁(1992年)]も参照のこと。）

20

【0162】

微生物または哺乳類細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー陽イオンまたは鳥類交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製できるが、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。アフィニティーリガンドとしての、プロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに応じて変わる。プロテインAを用いて、ヒト1、2または4重鎖に基づく抗体を精製できる（Lindmarkら、J. Immunol. Methods 62: 1～13頁(1983年)）。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプに対して、およびヒト3に対して推奨される（Gussら、EMBO J. 5: 1567～1575(1986年)）。アフィニティーリガンドが結合しているマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、その他のマトリックスも利用可能である。細孔性（controlled pore）ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスによって、アガロースを用いて達成され得るものよりも速い流速および短い処理時間が可能となる。抗体がCH3ドメインを含む場合には、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J.T.Baker、Philipsburg、N.J.）は、精製にとって有用である。イオン交換カラム、エタノール沈殿法、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース（商標）でのクロマトグラフィー陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿での分画などのタンパク質精製のためのその他の技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

30

【0163】

キメラ抗体

単独またはコンジュゲートとしてのいずれかで、ヒトにおけるin vivo投与で反

40

50

復されたげっ歯類抗体は、げっ歯類抗体に対するレシピエントにおける免疫応答；いわゆるHAMA応答（ヒト抗マウス抗体）を引き起こす。HAMA応答は、反復投与が必要とされる場合に医薬品の有効性を制限し得る。抗体の免疫原性は、ポリエチレンギリコールなどの親水性ポリマーを用いる抗体の化学修飾によって、または抗体構造を、よりヒト様、例えば、キメラ、ヒト化、ヒトまたはHuman Engineered（商標）抗体にする遺伝子操作法を用いることによって低減され得る。このように操作された抗体は、親のマウスモノクローナル抗体よりもヒトにおいて免疫原性が低いので、アナフィラキシーの危険をかなり低くしてヒトの治療に用いることができる。したがって、これらの抗体は、ヒトへのin vivo投与を含む治療的適応において好ましいものであり得る。

【0164】

マウスモノクローナル抗体の可変Igドメインが、ヒト定常Igドメインと融合しているキメラモノクローナル抗体は、当技術分野で公知の標準手順を用いて作製できる。（Morrison, S. L.ら（1984年）Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841~6855頁；およびBoulianne, G. L.ら、Nature 312, 643~646頁（1984年）参照のこと）。例えば、CEAと結合するげっ歯類抗体の可変ドメインの遺伝子配列を、ヒト骨髄腫タンパク質の可変ドメインと置換し、このように組換えキメラ抗体を作製できる。これらの手順は、EP194276、EP0120694、EP0125023、EP0171496、EP0173494およびWO86/01533に詳述されている。いくつかのキメラモノクローナル抗体が、ヒトにおいて免疫原性が低いことが証明されているが、マウス可変Igドメインは、依然、相当なヒト抗マウス反応を導き得る。

10

20

30

40

【0165】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は、例えば、（1）非ヒト相補性決定領域（CDR）を、ヒトフレームワークおよび定常領域へグラフトすること（当技術分野で、「CDRグラフト」によるヒト化と呼ばれる工程）、あるいは、（2）全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様表面でそれらを「覆うこと（cloaking）」（「ベニア化」と当技術分野で呼ばれる工程）をはじめとする種々の方法によって達成できる。本発明では、ヒト化抗体は、「ヒト化」および「ベニア化」抗体の両方を含む。これらの方法は、例えば、各々、参照により本明細書に組み込まれる、Jonesら、Nature 321:522-525（1986年）；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、81:6851-6855（1984年）；MorrisonおよびOi、Adv. Immunol.、44:65-92（1988年）；Verhoeferら、Science 239:1534-1536（1988年）；Padlan、Molec. Immun. 28:489-498（1991年）；Padlan、Molec. Immunol. 31(3):169-217（1994年）；およびKettleborough、C.A.ら、Protein Eng. 4(7):773-83（1991年）に開示されている。

【0166】

例えば、げっ歯類抗体のCDRの遺伝子配列は、単離または合成し、相同ヒト抗体遺伝子の対応する配列領域と置換し、元のげっ歯類抗体の特異性を有するヒト抗体を作製できる。これらの手順は、EP023940、WO90/07861およびWO91/09967に記載されている。

【0167】

CDRグラフトは、マウス重鎖および軽鎖可変Igドメイン由来の6つのCDRのうち1つ以上を、ヒト可変Igドメインの適当な4つのフレームワーク領域に導入することを含み、CDRグラフトとも呼ばれる。この技術（Riechmann, L.ら、Nature 332, 323頁（1988年））は、主に抗原と接触するCDRループを支持す

50

るための足場として保存されたフレームワーク領域（F R 1 ~ F R 4）を利用する。しかし、CDRグラフトの不利点は、フレームワーク領域のアミノ酸が抗原結合に寄与し得るために、また、CDRループのアミノ酸が、2つの可変Igドメインの結合に影響を及ぼし得るために、元のマウス抗体よりも実質的に低い結合親和性を有するヒト化抗体をもたらし得るということである。ヒト化モノクローナル抗体の親和性を維持するために、CDRグラフト技術は、元のマウス抗体のフレームワーク領域と最も酷似するヒトフレームワーク領域を選択することによって、および抗原結合部位のコンピュータモデリングによって支援された、フレームワークまたはCDR内の単一のアミノ酸の位置指定突然変異誘発によって改善できる（例えば、C o , M . S . ら（1994年）、J . Immunol . 152、2968~2976頁）。

10

【0168】

抗体をヒト化する一方法は、ヒト重鎖および軽鎖配列に対して非ヒト重鎖および軽鎖配列をアラインすることと、ヒト化配列のコンホメーションを予測するためのこのようなアラインメント、分子モデリングに基づいて非ヒトフレームワークを選択および置換することと、親抗体のコンホメーションと比較することとを含む。この工程に、ヒト化配列モデルの予測されるコンホメーションが、親非ヒト抗体の非ヒトCDRのコンホメーションと密接に近似するまで、CDRの構造を妨げるCDR領域中の残基の反復逆突然変異を続ける。このようなヒト化抗体は、例えば、Ashwell 11受容体による取り込みおよびクリアランスを促進するよう、さらに誘導体化できる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,530,101号および同5,585,089号参照のこと）。

20

【0169】

いくつかの、合理的設計によるマウスモノクローナル抗体のヒト化が報告されている（例えば、2002年7月11日に公開された20020091240、WO92/111018および米国特許第5,693,762号、同5,766,866号参照のこと）。

【0170】

Human Engineered（商標）抗体

語句「Human Engineered（商標）抗体」とは、非ヒト抗体、通常、マウスモノクローナル抗体由来の抗体を指す。あるいは、Human Engineered（商標）抗体は、親の、非ヒト抗体の抗原結合特性を保持するか、実質的に保持するが、ヒトに投与された場合に、親抗体と比較して減少した免疫原性を示す、キメラ抗体に由来するものであり得る。

30

【0171】

抗体可変ドメインのHuman Engineering（商標）は、抗体分子の結合活性を維持しながら免疫原性を減少させる方法としてStudnickaによって記載されている[例えば、Studnickaら米国特許第5,766,886号；StudnickaらProtein Engineering 7:805~814頁（1994年）参照のこと]。この方法によれば、各可変領域アミノ酸に、置換の危険度が割り当てられている。アミノ酸置換は、3種の危険度カテゴリーのうちの1種によって区別されている：（1）低い危険度の変更とは、抗原結合を混乱させる見込みが最小で、免疫原性を減少させる最大の可能性を有するものであり；（2）中程度の危険度の変更とは、抗原結合またはタンパク質フォールディングに影響を及ぼす、より大きな見込みを有するが、さらに免疫原性を減少させるものであり；（3）高い危険度の残基とは、結合にとってまたは抗体構造の維持にとって重要であり、抗原結合またはタンパク質フォールディングが影響を受ける最高の危険を保持するものである。プロリンの三次元構造的役割のために、プロリンでの修飾は、位置が、通常、低い危険度の位置にあっても、一般に、少なくとも中程度の危険度の変更であると考えられる。

40

【0172】

げっ歯類抗体の軽鎖および重鎖の可変領域は、以下のとおり、抗原結合またはタンパク質フォールディングのいずれかに悪影響を及ぼす可能性が少ないが、ヒト環境において免疫原性を減少させる可能性が高いと決定された位置でヒトアミノ酸を置換するHuman

50

Engineered(商標)である。「低い危険度」の位置にあり、本方法による修飾の候補であるアミノ酸残基は、げっ歯類可変領域のアミノ酸配列を、ヒト可変領域配列とアラインすることによって同定される。個々のVHまたはVL配列またはヒトコンセンサスVHまたはVL配列または個々のもしくはコンセンサス生殖系配列を含む、任意のヒト可変領域を使用できる。低い危険度の位置の任意の数のアミノ酸残基または低い危険度の位置のすべてのアミノ酸残基を変更できる。例えば、アラインされたマウスおよびヒトアミノ酸残基が異なる、低い危険度の位置の各々で、げっ歯類残基をヒト残基で置換するアミノ酸修飾を導入する。あるいは、低い危険度の位置のすべてのアミノ酸残基および中程度の危険度の位置の任意の数のアミノ酸残基を変更できる。理想的には、最小の免疫原性を達成するために、低および中程度の危険度の位置のすべてを、げっ歯類からヒト配列に変更する。

10

【0173】

修飾された重鎖および/または軽鎖可変領域を含有する合成遺伝子を構築し、ヒト重鎖および/または軽鎖定常領域と連結する。IgA(任意のサブクラスのもの、例えば、IgA1またはIgA2)、IgD、IgE、IgG(任意のサブクラスのもの、例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)またはIgMをはじめとする、任意のヒト重鎖および軽鎖定常領域を、Human Engineered(商標)抗体可変領域と併用できる。ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を、哺乳類細胞などの宿主細胞に導入し、得られた組換え免疫グロブリン産物を獲得し、特性決定する。

20

【0174】

トランスジェニック動物由来のヒト抗体

抗原を標的とするヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生がなく、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むよう操作されたトランスジェニック動物を用いても作製できる。例えば、WO 98/24893には、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の不活性化のために機能的内因性免疫グロブリンを産生しない、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物が開示されている。WO 91/10741にはまた、免疫原に対する免疫応答を開始できるトランスジェニック非靈長類哺乳類宿主が開示されており、これでは、抗体は、靈長類定常領域および/または可変領域を有し、遺伝子座をコードする内因性免疫グロブリンは、置換または不活性化されている。WO 96/30498には、哺乳類において免疫グロブリン遺伝子座を修飾するため、例えば、定常領域または可変領域のすべてまたは一部を置換して修飾された抗体分子を形成するためのCre/Lox系の使用が開示されている。WO 94/02602には、不活性化された内因性Ig遺伝子座と機能性ヒトIg遺伝子座とを有する非ヒト哺乳類宿主が開示されている。米国特許第5,939,598号には、内因性重鎖を欠き、1種以上の異種定常領域を含む外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニックマウスを作製する方法が開示されている。

30

【0175】

上記のトランスジェニック動物を用いて、選択された抗原分子に対して免疫応答を引き起こすことができ、動物から抗体産生細胞を回収し、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために用いることができる。免疫化プロトコール、アジュvantなどは、当技術分野で公知であり、WO 96/33735に記載されるように、例えば、トランスジェニックマウスの免疫化に用いられる。この刊行物は、IL6、IL8、TNF_a、ヒトCD4、Lセレクチン、gp39および破傷風菌毒素をはじめとする種々の抗原分子に対するモノクローナル抗体を開示する。モノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物活性または生理学的效果を阻害または中和するその能力について試験できる。WO 96/33735には、IL-8で免疫化されたトランスジェニックマウスの免疫細胞に由来するIL-8に対するモノクローナル抗体が、好中球の、IL-8によって誘導される機能を妨げたことが開示されている。トランスジェニック動物を免疫化するため用いた抗原に対して特異性を有するヒトモノクローナル抗体も、WO 96/34096および米国特許出願第20030194404号；および米国特許出願第20030031667号に開示されている)。Jakobovitsら、Proc. Natl. Aca

40

50

d . S c i . U S A 、 9 0 : 2 5 5 1 頁 (1 9 9 3 年) ; Jakobovits ら、 N a t u r e 、 3 6 2 : 2 5 5 ~ 2 5 8 頁 (1 9 9 3 年) ; Bruggermann ら、 Y e a r i n I mmuno . 、 7 : 3 3 頁 (1 9 9 3 年) ; および米国特許第 5 , 5 9 1 , 6 6 9 号、米国特許第 5 , 5 8 9 , 3 6 9 号、米国特許第 5 , 5 4 5 , 8 0 7 号；および米国特許出願第 2 0 0 2 0 1 9 9 2 1 3 号、 W O 9 6 / 3 4 0 9 6 および米国特許出願第 2 0 0 3 0 1 9 4 4 0 4 号；および米国特許出願第 2 0 0 3 0 0 3 1 6 6 7 号も参照のこと。

【 0 1 7 6 】

モノクローナル抗体を作製するのに有用なさらなるトランスジェニック動物として、米国特許第 5 , 7 7 0 , 4 2 9 号および F i s h w i l d ら (N a t . B i o t e c h n o l . 1 4 : 8 4 5 ~ 8 5 1 頁、 1 9 9 6 年) に記載される、 M e d a r e x H u M A b - M O U S E (登録商標) が挙げられ、これは、ヒト抗体の重鎖および軽鎖をコードする再編成されたヒト抗体に由来する遺伝子配列を含む。 H u M A b - M O U S E (登録商標) は、標的タンパク質に対するモノクローナル抗体を產生できる。

10

【 0 1 7 7 】

また、 I sh i d a ら (C l o n i n g S t e m C e l l s . 4 : 9 1 ~ 1 0 2 頁、 2 0 0 2 年) は、ヒト D N A のメガ塩基対の大きさのセグメントを含む T r a n s C h r o m o M o u s e (T C M O U S E (商標)) を記載しており、これは全ヒト免疫グロブリン (h I g) 遺伝子座を取り込んでいる。 T C M O U S E は、 I g G (I g G 1 ~ G 4) のすべてのサブクラスを含む、 h I g の十分に多様なレパートリーを有する。種々のヒト抗原を用いる T C マウスの免疫化は、ヒト抗体を含む抗体反応を引き起こす。

20

【 0 1 7 8 】

米国特許出願第 2 0 0 3 0 0 9 2 1 2 5 号には、所望のエピトープに対する動物の免疫応答を偏らせるための方法が記載されている。ヒト抗体はまた、 i n v i t r o 活性化 B 細胞によって作製してもよい (米国特許第 5 , 5 6 7 , 6 1 0 号および同 5 , 2 2 9 , 2 7 5 号参照のこと) 。

【 0 1 7 9 】

ファージディスプレイ技術に由来する抗体

組換えヒト抗体遺伝子のレパートリーを作製する技術の開発および糸状バクテリオファージの表面上でのコードされる抗体断片のディスプレイが、ヒト抗体を直接作製および選択するための組換え手段を提供し、これはまた、ヒト化、キメラ、ネズミまたは変異タンパク質抗体にも当てはまり得る。ファージ技術によって作製された抗体は、細菌において抗原結合断片 - 通常、 F v または F a b 断片として產生され、したがって、エフェクター機能を欠く。エフェクター機能は、 1 以上の戦略によって導入できる。断片は、哺乳類細胞における発現のための完全抗体に、またはエフェクター機能を誘発できる第 2 の結合部位を有する二重特異性抗体断片に操作できる。

30

【 0 1 8 0 】

通常、抗体の F d 断片 (V H - C H 1) および軽鎖 (V L - C L) は、 P C R によって別個にクローニングし、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーにおいて無作為に組換えし、次いで、これを特定の抗原に対する結合について選択できる。 F a b 断片は、ファージ表面上に発現される、すなわち、それらをコードする遺伝子と物理的に結合される。したがって、抗原結合による F a b の選択は、 F a b をコードする配列を同時に選択し、続いて、これを増殖できる。数ラウンドの抗原結合および再増幅、パニングと呼ばれる手順によって、抗原に特異的な F a b が濃縮され、最終的に単離される。

40

【 0 1 8 1 】

1 9 9 4 年には、「誘導選択 (g u i d e d s e l e c t i o n) 」と呼ばれる抗体のヒト化のためのアプローチが記載された。誘導選択 (g u i d e d s e l e c t i o n) は、マウスモノクローナル抗体のヒト化のためにファージディスプレイ技術の力を利用する。 (J e s p e r s , L . S . ら、 B i o / T e c h n o l o g y 1 2 、 8 9 9 ~ 9 0 3 頁 (1 9 9 4 年) を参照のこと) 。このために、マウスモノクローナル抗体の F

50

d 断片を、ヒト軽鎖ライブラリーと組み合わせてディスプレイでき、次いで、得られたハイブリッド F a b ライブラリーを、抗原を用いて選択できる。それによって、マウス F d 断片は、選択を誘導する鑄型を提供する。続いて、選択されたヒト軽鎖を、ヒト F d 断片ライブラリーと組み合わせる。得られたライブラリーの選択によって完全なヒト F a b が生じる。

【0182】

ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を誘導するための種々の手順が記載されている（例えば、Hoogenboomら、J. Mol. Biol.、227:381 頁（1991年）；Marksら、J. Mol. Biol.、222:581～597 頁（1991年）；米国特許第5,565,332号および同5,573,905号；Clarkson, T. および Wells, J. A.、TIBTECH 12、173～184 頁（1994年）参照のこと）。特に、ファージディスプレイライブラリーから得られた抗体の *in vitro* 選択および発展は強力なツールとなった（Burton, D. R. および Barbash III, C. F. 、Adv. Immunol. 57、191～280 頁（1994年）；および Winter, G. ら、Annu. Rev. Immunol. 12、433～455 頁（1994年）；米国特許出願第20020004215 号およびWO92/01047；2003年10月9日に公開された米国特許出願第20030190317号および米国特許第6,054,287号；米国特許第5,877,293号参照のこと）。

10

【0183】

Watkins、「Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift」、Methods in Molecular Biology、Antibody phage Display: Methods and Protocols 178:187～193 頁および2003年3月6日に公開された米国特許出願第200120030044772号には、捕獲リフトによってファージによって発現された抗体ライブラリーまたは他の結合分子をスクリーニングする方法、固体支持体上での候補結合分子の固定化を含む方法が記載されている。

20

【0184】

抗体産物は、本明細書において「スクリーニング法」と題された項に記載されるアッセイを用いて、または当技術分野で公知の任意の適したアッセイを用いて本発明の処理方法における活性についておよび適合性についてスクリーニングできる。

30

【0185】

アミノ酸配列変異タンパク質

本発明の抗体は、親抗体の変異タンパク質または変異体を含み、これでは、親抗体のポリペプチド配列が、変異タンパク質または変異体が所望の結合親和性または生物活性を保持するという条件で、可変領域または可変領域と同等の部分、例えば、CDR内において、少なくとも1個のアミノ酸置換、欠失または挿入によって変更されている。変異タンパク質は、親抗体と実質的に相同または実質的に同一、例えば、少なくとも65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一または相同であり得る。この配列に関する同一性または相同性は、本明細書において、配列をアラインし、最大パーセント配列同一性を達成するために、必要に応じてギャップを導入した後の、保存的置換はいずれも、配列同一性の一部と考えない、親配列と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。抗体配列へのN末端、C末端または内部伸長、欠失または挿入のうち、配列同一性または相同性に影響を及ぼすと見なされるべきものはない。したがって、配列同一性は、2種のポリペプチドのアミノ酸の位置において類似性を比較するためによく用いられる標準法によって求めることができる。BLASTまたはFASTAなどのコンピュータプログラムを用いて、2種のポリペプチドを、それらの個々のアミノ酸の最適マッチングのた

40

50

めに（一方または両方の配列の全長に沿って、または一方または両方の配列の予め決定した部分に沿ってのいずれかで）アラインする。これらのプログラムは、デフォルト開始ペナルティおよびデフォルトギャップペナルティを提供し、PAM250 [標準スコアリングマトリックス；Dayhoffら、in Atlas of Protein Sequence and Structure、第5巻、付録3（1978年）参照のこと]などのスコアリングマトリックスをコンピュータプログラムとともに使用できる。例えば、次いで、同一性パーセントを、同一マッチの総数に100を乗じ、次いで、マッチされたスパン内により長い配列の長さと、2種の配列をアラインするためにより長い配列に導入されたギャップ数の合計で除したものとして算出できる。

【0186】

10

本発明の抗体はまた、結合親和性に影響を及ぼさないが、抗体依存性細胞毒性（ADC）、補体依存性細胞傷害（CDC）またはクリアランスおよび取り込み（および半減期に対する得られた効果）などのエフェクター機能を変更し得る定常領域のポリペプチド配列の変更を含み得る。

【0187】

挿入

アミノ酸配列挿入は、1残基～100個以上の残基を含むポリペプチドの長さにわたるアミノおよび／またはカルボキシル末端融合ならびに単一もしくは複数のアミノ酸残基、例えば、2、3またはそれより多くの配列内挿入を含む。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を含む抗体またはエピトープタグもしくはサルベージ受容体エピトープと融合している抗体（抗体断片を含む）が挙げられる。その他の抗体分子の挿入性変異タンパク質は、グリコシル化部位の付加、分子内または分子間結合のためのシステインの付加または例えば、N末端もしくはC末端での抗体の血清半減期を増大するポリペプチドとの融合を含む。例えば、抗体にシステイン結合（複数の結合）を付加して、その安定性を（特に、抗体がFv断片などの抗体断片である場合に）改善することができる。

20

【0188】

抗体のグリコシル化は、通常、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖との炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分の、アスパラギン側鎖との酵素的結合のための認識配列である。ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することで、グリコシル化部位の可能性が高まる。したがって、1以上のこれらのトリペプチド配列を含むようアミノ酸配列を変更することによって、N結合型グリコシル化部位を抗体に加えることができる。O結合型グリコシル化とは、N-アセイルガラクトサミン（acetyl galactosamine）、ガラクトースまたはキシロースのうちの1種の、ヒドロキシアミノ酸、通常は、セリンまたはトレオニンとの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用できる。O結合型グリコシル化部位は、1個以上のセリンまたはトレオニン残基を、元の抗体の配列に挿入または置換することによって抗体に加えることができる。

30

【0189】

40

用語「エピトープタグを受けた」とは、エピトープタグと融合している抗体を指す。エピトープタグポリペプチドは、それに対する抗体が作製され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、抗体の活性を干渉しないよう十分に短い。エピトープタグは、それに対する抗体が、他のエピトープと実質的に交差反応しないよう、十分に独特であることが好ましい。適したタグポリペプチドは、通常、少なくとも6個、通常、約8～50個の間のアミノ酸残基のアミノ酸残基（好ましくは、約9～30残基の間）を有する。例として、flu HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Fieldら、Mol. Cell. Biol. 8: 2159～2165頁（1988年）]；c-mycタグおよびそれへの8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体 [Evansonら、Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610～3616頁（1985年）]

50

] ; ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D (g D) タグおよびその抗体 [P a b o r s k y ら、 Protein Engineering 3 (6) : 547 ~ 553 頁 (1990 年)] が挙げられる。その他の例示的タグとして、ポリ - ヒスチジン配列、通常、約 6 個のヒスチジン残基があり、これは、ニッケルキレート化を用いてそのように標識された化合物の単離を可能にする。当技術分野でよく知られており、通常、用いられる FLAG (登録商標) タグ (Eastman Kodak, Rochester, NY) などのその他の標識およびタグは、本発明に包含される。

【 0190 】

本明細書において、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」とは、 IgG 分子の in vivo 血清半減期の延長に関する、 IgG 分子 (例えば、 IgG₁ 、 IgG₂ 、 IgG₃ または IgG₄) の Fc 領域のエピトープを指す。
10

【 0191 】

欠失

アミノ酸配列欠失は、標的抗原に対する結合親和性を保持する断片をもたらす、 1 ~ 100 個以上の残基の長さにわたるアミノおよび / またはカルボキシル末端欠失、ならびに单一もしくは複数のアミノ酸残基、例えば、 2 、 3 またはそれより多くの配列内欠失を含む。例えば、グリコシリ化部位は、トリペプチドの一部もしくはすべてまたはその他のグリコシリ化の認識配列を欠失することによって、欠失または別の位置に移動され得る。

【 0192 】

置換

もう 1 つの種類の変異タンパク質として、アミノ酸置換変異タンパク質がある。これらの変異タンパク質は、抗体分子中に、除去された少なくとも 1 個のアミノ酸残基と、その場所に挿入された異なる残基を有する。任意の超可変または CDR 領域またはフレームワーク領域内の置換的突然変異誘発が考慮される。保存的置換は、表 1 に示されている。最も保存的な置換は、「好ましい置換」という見出しの下に見られる。このような置換が生物活性の変化をもたらさない場合には、表 1 において「例示的置換」と命名された、またはアミノ酸のクラスに関連して以下にさらに記載されるような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングできる。
20

【 0193 】

【表1】

表 1

元	例示的	好ましい残基置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg	
Asp (D)	glu; asn	glu	10
Cys (C)	ser; ala	ser	
Gln (Q)	asn; glu	asn	
Glu (E)	asp; gln	asp	
Gly (G)	ala		
His (H)	asn; gln; lys; arg		
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu ノルロイシン	20
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		
Pro (P)	ala		
Ser (S)	thr		30
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	

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a) 例えば、シートまたはらせん状コンホメーションのような、置換の領域におけるポリペプチド主鎖の構、(b) 標的部位での分子の電荷または疎水性または(c) 側鎖のかさを維持することに対するその効果が大幅に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群にわけることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性の：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 鎌の配向に影響を及ぼす残基：gly、pro； および
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0194】

保存的置換は、アミノ酸を、そのクラスの別のメンバーと置換することを含む。非保存

的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのメンバーと置換することを含む。

【0195】

抗体の適切なコンホメーションの維持に関与していないシステイン残基もいずれも、分子の酸化的安定性を改善し、異常な架橋を防ぐために、通常、セリンで置換してよい。

【0196】

親和性成熟は、通常、親抗体のCDR内に置換を有する抗体変異体を調製することと、スクリーニングすること、ならびに結合親和性などの生物学的特性が、親抗体と比較して改善された変異体を選択することとを含む。このような置換変異体を作製するための従来法として、ファージディスプレイを用いる親和性成熟がある。手短には、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を突然変異させて、各部位で、すべてのあり得るアミノ酸置換を作製する。このように作製された抗体変異体は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合物として、糸状ファージ粒子から一価様式でディスプレイされる。次いで、ファージにディスプレイされた変異体を、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。例えば、WO92/01047、WO93/112366、WO95/15388およびWO93/19172参照のこと。

10

【0197】

現在の抗体親和性成熟法は、2つの突然変異誘発カタゴリー：確率的および非確率的に属する。エラープローンPCR、ミューターター細菌株（Lowら、J.Mol.Biol.1.260、359～68頁、1996年）および飽和突然変異誘発（Nishimiyら、J.Biol.Chem.275:12813～20頁、2000年；Chowdhury, P.S.Methods Mol.Biol.178、269～85頁、2002年）が、確率的突然変異誘発法の代表例である（Rajpalら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.102:8466～71頁、2005年）。非確率的技術は、アラニン-スキヤニングまたは位置指定突然変異誘発を用いて、特定の変異体の限定された収集物を作製することが多い。いくつかの方法が以下にさらに詳細に記載されている。

20

【0198】

パニング法による親和性成熟-組換え抗体の親和性成熟は、一般に、漸減量の抗原の存在下での候補抗体の数ラウンドのパニングによって実施される。ラウンドあたり抗原の量を漸減することで、抗原に対して最大の親和性を有する抗体が選択され、出発材料の大きなプールから高親和性の抗体が得られる。パニングによる親和性成熟は、当技術分野で周知であり、例えば、HuIsら（Cancer Immunol Immunother.50:163～71頁、2001年）に記載されている。ファージディスプレイ技術を用いる親和性成熟の方法は、本明細書において別の場所に記載されており、当技術分野で公知である（例えば、Daughertyら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.97:2029～34頁、2000年参照のこと）。

30

【0199】

ルック-スルーミュータジェネシス（Look-through mutagenesis）-ルック-スルーミュータジェネシス（Look-through mutagenesis）（LTM）（Rajpalら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.102:8466～71頁、2005年）は、抗体-結合部位を迅速にマッピングする方法を提供する。LTMには、20個の天然アミノ酸によって提供される主要側鎖化学を代表する9つのアミノ酸が、抗体の6つのCDRすべてにおける位置毎の結合に対する機能的側鎖寄与を精査するために選択される。LTMにより、CDR内に、各「野生型」残基が、9種の選択されたアミノ酸のうちの1種によって系統的に置換されている、单一の突然変異の位置シリーズが作製される。突然変異されたCDRは、すべての変異体の定量的ディスプレイに対して禁止的になることなく、複雑度および大きさの漸増したコンビナトリアル一本鎖可変断片（scFv）ライブラリーを作製するために組み合わされる。ポジティブ選択の後、結合が改善されたクローナーを配列決定し、有益な突然変異をマッ

40

50

ピングする。

【0200】

エラープローンPCR-エラープローンPCRは、異なる選択ラウンド間の核酸のランダム化を含む。ランダム化は、用いたポリメラーゼの内因性の誤り率によって低率で起こるが、転写の際に高い内因性の誤り率を有するポリメラーゼ(Hawkinsら、J.Mol.Biol.226:889~96頁、1992年)を用いるエラープローンPCRによって増大することができる(Zaccolioら、J.Mol.Biol.285:775~783頁、1999年)。突然変異サイクルの後、抗原に対する親和性が改善されたクローンが、当技術分野で慣例の方法を用いて選択される。

【0201】

DNAシャッフリング-DNAシャッフリングは、変異体ポリヌクレオチドを作製するための、より短い、またはより小さいポリヌクレオチドのin vitroまたはin vivo相同組換えのための方法である。DNAシャッフリングは、米国特許第6,605,449号、米国特許第6,489,145号、WO02/092780およびStemmer、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:10747~51頁(1994年)に記載されている。一般に、DNAシャッフリングは、3ステップ:DNAアーゼIでの、シャッフルされる遺伝子の断片化、断片のランダムハイブリダイゼーションおよびDNAポリメラーゼの存在下でのPCR(セクシャルPCR)による断片化された遺伝子の再構築または充填および従来のPCRによる再構築された生成物の增幅からなる。

【0202】

DNAシャッフリングは、逆鎖反応であるという点でエラー-プローンPCRとは異なる。エラー-プローンPCRでは、ポリメラーゼ開始部位の数および分子の数が、指数関数的に増える。対照的に、ランダムポリヌクレオチドの核酸再構築またはシャッフリングでは、開始部位の数およびランダムポリヌクレオチドの数(大きさではない)が経時に減少する。

【0203】

抗体の場合には、DNAシャッフリングによって、例えば、CDR1のすべての、CDR2のすべてとの、CDR3のすべてとの遊離コンビナトリアル結合が可能となる。同一反応において、複数のファミリーの配列をシャッフルできることが考慮される。さらに、通常、シャッフリングは、相対的な順序を保存し、その結果、例えば、CDR1はCDR2の位置には見られない。稀なシャッフルント(shuffleant)は、多数の最高の(例えば、最高の親和性)CDRを含み、これらの稀なシャッフルント(shuffleant)は、それらの優れた親和性に基づいて選択できる。

【0204】

DNAシャッフリングに使用できる鋳型ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり得る。再組み合わせされるか、再構築される、遺伝子またはより短いもしくはより小さいポリヌクレオチドの大きさに応じて種々の長さのものであり得る。鋳型ポリヌクレオチドは、50bp~50kbであることが好ましい。鋳型ポリヌクレオチドは、二本鎖であるべきことが多い。

【0205】

鋳型ポリヌクレオチドに対して同一性の領域および鋳型ポリヌクレオチドに対して異種性の領域を有する、一本鎖または二本鎖核酸ポリヌクレオチドを、遺伝子選択の最初のステップの間に鋳型ポリヌクレオチドに加えることができることが考慮される。また、2種の異なるが関連するポリヌクレオチド鋳型は、最初のステップの間に混合され得るということも考慮される。

【0206】

アラニンスキャニング-アラニンスキャニング突然変異誘発を実施して、抗原結合に大きく寄与する超可変領域残基を同定できる。CunninghamおよびWells、(Science 244:1081~1085頁、1989年)。残基または標的残基の

10

20

30

40

50

群が同定され（例えば、arg、asp、his、lysおよびgluなどの電荷を有する残基）、中性または負の電荷を有するアミノ酸（最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）によって置換され、アミノ酸と抗原の相互作用に影響を及ぼす。次いで、置換部位で、または置換部位に、さらなる、またはその他の変異体を導入することによって、機能的感受性を示すアミノ酸位置が正確にされる。したがって、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め定められるが、突然変異自体の性質は予め定められる必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を分析するために、標的コドンまたは領域でalaスキャニングまたはランダム突然変異誘発を実施し、発現された抗体変異タンパク質を所望の活性についてスクリーニングする。

【0207】

10

コンピュータを使った設計 - あるいは、またはさらに、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原の間の接触点を同定すること、またはコンピュータソフトウェアを用いて、このような接触点に倣って作ることが有益であり得る。このような接触残基および隣接する残基は、本明細書に詳しく述べられる技術による置換の候補である。ひとたび、このような変異体が作製されると、変異体のパネルを、本明細書に記載されるようなスクリーニングに付し、1以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択できる。

【0208】

20

親和性成熟は、親抗体のCDR内に置換を有する抗体変異タンパク質を調製することと、スクリーニングすること、ならびに結合親和性などの生物学的特性が、親抗体と比較して改善された変異タンパク質を選択することとを含む。このような置換変異タンパク質を作製するための従来法として、ファージディスプレイを用いる親和性成熟がある。手短には、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を突然変異させて、各部位ですべてのあり得るアミノ酸置換を作製する。このように作製された抗体変異タンパク質は、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合物として、糸状ファージ粒子から一価様式でディスプレイされる。次いで、ファージにディスプレイされた変異タンパク質を、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

【0209】

30

アラニンスキャニング突然変異誘発を実施して、抗原結合に大きく寄与する超可変領域残基を同定できる。あるいは、またはさらに、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原の間の接触点を同定することは有益であり得る。このような接触残基および隣接する残基は、本明細書に詳しく述べられる技術による置換の候補である。ひとたび、このような変異タンパク質が作製されると、変異タンパク質のパネルを、本明細書に記載されるようなスクリーニングに付し、1以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択できる。

【0210】

40

変更されたエフェクター機能

抗体のその他の修飾が考慮される。例えば、癌の治療における抗体の有効性を増強するよう、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾することが望ましいものであり得る。例えば、Fc領域にシスティン残基（複数の残基）を導入し、それによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にしてもよい。このように作製されたホモ二量体抗体は、改善された内部移行能および/または増大された媒介性細胞死滅および補体依存性細胞傷害（ADCC）を有し得る。Caronら、J. Exp. Med. 176: 1191～1195頁（1992年）およびShopes、B.J. Immunol. 148: 2918～2922頁（1992年）参照のこと。活性の増強されたホモ二量体抗体はまた、Wolfら、Cancer Research 53: 2560～2565頁（1993年）に記載されるような、ヘテロ二機能性架橋剤を用いて調製できる。あるいは、二重のFc領域を有し、それによって、増強された補体溶解およびADCC能を有し得る抗体を設計できる。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3: 219～230頁（1989年）参照のこと。さらに、CDR内の配列

50

は、抗体をMHCクラスIIと結合させ、望まれていないヘルパーT細胞応答を誘発し得るということがわかっている。保存的置換は、抗体が、望まれていないT細胞応答を誘発する能力を失ってもなお結合活性を保持するのを可能にし得る。マウス可変領域がヒト1、2、3および4定常領域と結合しているキメラ抗体を記載した、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Steplewskiら、Proc Natl Acad Sci U S A. 1988年；85(13)：4852～6頁も参照のこと。

【0211】

本発明の特定の実施形態では、例えば、腫瘍浸透を増大するために、無傷の抗体よりもむしろ抗体断片を用いることが望ましいことであり得る。この場合には、抗体断片を、例えば、半減期を延長するために、抗体断片に、PEGまたは多糖ポリマーをはじめとする他の水溶性ポリマーなどの分子を付加して、その血清半減期を延長するよう修飾することが望ましいことであり得る。これはまた、例えば、抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを（例えば、抗体断片中の適当な領域の突然変異によって、または例えば、DNAまたはペプチド合成によって、ペプチドタグにエピトープを組み込み、次いで、それが、末端または中央のいずれかで抗体断片と融合されることによって）組み込むことによって達成できる（例えば、WO96/32478参照のこと）。

【0212】

サルベージ受容体結合エピトープは、Fcドメインの1つまたは2つのループから、任意の1個以上のアミノ酸残基が、抗体断片の類似の位置に移されている領域を構成することが好ましい。Fcドメインの1つまたは2つのループから3個以上の残基が移されていることが、いっそうより好ましい。エピトープがFc領域の（例えば、IgGの）CH2ドメインからとられて、抗体のCH1、CH3またはVH領域、または1を超えるこのような領域に移されていることがさらに好ましい。あるいは、エピトープは、Fc領域のCH2ドメインからとられ、抗体断片のCL領域またはVL領域または両方に移される。Fc変異体およびサルベージ受容体とのそれらの相互作用を記載する国際出願WO97/34631およびWO96/32478も参照のこと。

【0213】

したがって、本発明の抗体は、ヒトFc部分、ヒトコンセンサスFc部分またはFcサルベージ受容体と相互作用する能力を保持するその変異タンパク質、例えば、ジスルフィド結合に含まれるシステインが修飾または除去されている、かつ/またはN末端にmetが付加されており、N末端の20個のアミノ酸のうち1個以上が除去されている、かつ/または補体と相互作用する領域、例えば、C1q結合部位が除去されている、かつ/またはADC C部位が除去されている変異タンパク質を含み得る[Moléc. Immunol. 29(5)：633～9頁(1992年)参照のこと]。IgGクラスの抗体はまた、異なる定常領域を含み得る。例えば、IgG2抗体は、IgG1またはIgG4定常領域をディスプレイするよう修飾され得る。

【0214】

IgG1の場合には、定常領域、特に、ヒンジまたはCH2領域への修飾は、エフェクター機能、例えば、ADCCおよび/またはCDC活性を増大または低減し得る。その他の実施形態では、IgG2定常領域は、抗体-抗原凝集体形成を低減するよう修飾される。IgG4の場合には、定常領域、特に、ヒンジ領域への修飾は、半抗体の形成を誘導し得る。特定の例示的実施形態では、IgG4ヒンジ配列Cys-Pro-Ser-Cysを、IgG1ヒンジ配列Cys-Pro-Pro-Cysに突然変異することが提供される。

【0215】

これまでの研究によって、FcRのヒトおよびマウスIgG上の結合部位は、主に、IgG残基233～239からなる下部ヒンジ領域にマッピングされた。その他の研究は、さらなる広いセグメント、例えば、ヒトFc受容体IのGly316～Lys338、ヒトFc受容体IIIのLys274～Arg301およびTyr407～Arg416を提案し、またはマウスFc受容体IIと相互作用する下部ヒンジの外側の数個の特定の残

10

20

30

40

50

基、例えば、マウス IgG2b の Asn297 および Glu318 見い出した。ヒト Fc 受容体 IIIA を含むヒト IgG1 Fc 断片の 3.2 結晶構造の報告には、Fc 受容体 IIIA との結合に関する、IgG1 残基 Leu234 ~ Ser239、Asp265 ~ Glu269、Asn297 ~ Thr299 および Ala327 ~ Ile332 が描かれていた。結晶構造に基づいて、下部ヒンジ (Leu234 ~ Gly237) に加え、IgG CH2 ドメインループ FG 中の残基 (残基 326 ~ 330) および BC 中の残基 (残基 265 ~ 271) も、Fc 受容体 IIIA との結合において役割を果たす可能性があるということが示唆されている。参照によりその全文が組み込まれる、Shieldsら、J. Biol. Chem., 276 (9) : 6591 ~ 6604 頁 (2001 年) 参照のこと。Fc 受容体結合部位内の残基の突然変異は、エフェクター機能の変更、ADCC もしくは CDC 活性の変更または半減期の変更をもたらし得る。上記のように、可能性ある突然変異として、1 個以上の残基の挿入、欠失または置換、例えば、アラニンでの置換、保存的置換、非保存的置換または異なる IgG サブクラスに由来する同一位置の対応するアミノ酸残基での置換 (例えば、IgG1 残基を、その位置で対応する IgG2 残基で置換) が挙げられる。

【0216】

Shieldsらは、すべてのヒト Fc 受容体との結合に関する IgG1 残基は、ヒンジの近位にある CH2 ドメイン中に位置し、以下の 2 つのカテゴリー : 1) すべての FcR と直接相互作用し得、Leu234 ~ Pro238、Ala327 および Pro329 (およびおそらく Asp265) を含む位置 ; 2) 炭水化物性に影響を及ぼす位置、Asp265 および Asn297 を含む位置に入ると報告した。Fc 受容体 III との結合に影響を及ぼしたさらなる IgG1 残基は、以下のとおりである : (最大の効果) Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298 および (弱い効果) His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378 および Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A および D270A は、結合を低減させた。すべての FcR について、上記で同定された残基に加え、Fc 受容体 IIIA との結合を 40% 以上低減させたさらなる IgG1 残基は、以下のとおりである : Ser239、Ser267 (Glyのみ)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338 および Asp376。FcRIIIA との結合を改善した変異タンパク質として、T256A、K290A、S298A、E333A、K334A および A339T が挙げられる。Lys414 は、FcRIIIA および FcRIIB に対する結合において 40% の低減、Arg416 は、FcRIIIA および FcRIIIA に対して 30% の低減、Gln419 は、FcRIIIA に対して 30% の低減および FcRIIB に対して 40% の低減、ならびに Lys360 は、FcRIIIA に対して 23% の改善を示した。Prestaら、Biochem. Soc. Trans. (2001 年) 30、487 ~ 490 頁も参照のこと。

【0217】

例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6,194,551 号には、ヒト IgG Fc 領域中、アミノ酸位置 329、331 または 322 (Kabat 番号付を用いて) に突然変異を含有する、エフェクター機能が変更された変異タンパク質が記載されており、そのうちいくつかは C1q 結合または CDC 活性の低減を示している。別の例として、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6,737,056 号には、ヒト IgG Fc 領域中、アミノ酸位置

【0218】

10

20

30

40

【化 1 9】

238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268,
 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303,
 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338,
 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 または 439

(Kabat 番号付けを用いて)に突然変異を含有する、エフェクターまたはFc-受容体結合が変更された変異タンパク質が記載されており、そのうちいくつかは、ADCまたはCDC活性の低減と関連している受容体結合プロファイルを示している。これらのうち、アミノ酸位置 238、265、269、270、272、276、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 または 439

10

【0 2 1 9】

【化 2 0】

238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416,
 419, 435, 438 または 439

での突然変異は、FcRIIとの結合を低減すると記載されており、アミノ酸位置

【0 2 2 0】

【化 2 1】

20

238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296,
 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 または 437

での突然変異は、FcRIIIとの結合を低減すると記載されている。

【0 2 2 1】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる米国特許第 5,624,821 号は、マウス抗体の C1q 結合活性は、重鎖のアミノ酸残基 318、320 または 322 を突然変異することによって変更できることおよび残基 297 (Asn) を置換することは、溶解活性の除去をもたらすことを報告している。

30

【0 2 2 2】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 20040132101 号には、アミノ酸位置

【0 2 2 3】

【化 2 2】

240,
 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, または 332 (Kabat 番号付けを用いて)
 あるいは位置 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296,
 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, または 332

40

(Kabat 番号付けを用いて)に突然変異を含む変異タンパク質が記載されており、そのうち、位置

【0 2 2 4】

【化 2 2 a】

234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266,
 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 または 332

での突然変異は、ADC/C 活性を低減し、Fc 受容体との結合を低減し得る。

【0 2 2 5】

50

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる Chappleら、 Proc Natl Acad Sci USA. 1991年; 88(20): 9036~40頁には、 Ig G1の細胞親和性活性は、その重鎖CH2ドメインの内因性の特性であると報告されている。Ig G1のアミノ酸残基234~237のいずれかでの單一点突然変異は、その活性を大幅に低下させるか、または無効にした。全結合活性を回復させるには、Ig G1残基234~237(LLGG)すべてのIg G2およびIg G4への置換が必要とされた。全ELLGGP配列(残基233~238)を含むIg G2抗体は、野生型Ig G1よりも活性であることが観察された。

【0226】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる Isaacsら、 J Immunol. 1998; 161(8): 3862~9頁には、Fc R結合にとって重要なモチーフ内の突然変異(グルタミン酸233のプロリンへ、ロイシン/フェニルアラニン234のバリンへ、およびロイシン235のアラニンへ)が、標的細胞の枯渇を完全に妨げたと報告されている。グルタミン酸318のアラニンへの突然変異は、マウスIg G2bのエフェクター機能を排除し、また、ヒトIg G4の効力も低減させた。

10

【0227】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Armourら、 Mol Immunol. 2003; 40(9): 585~93頁では、活性化受容体Fc RI Iaと、野生型Ig G1よりも少なくとも10倍効率悪く反応するが、抑制性受容体、Fc RI Ibとのその結合は4倍低減されているだけである、Ig G1変異タンパク質が同定された。突然変異は、アミノ酸233~236の領域で、および/またはアミノ酸位置327、330および331で行われた。参照によりその全文が本明細書に組み込まれるWO99/58572も参照。

20

【0228】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれるXuら、 J Biol Chem. 1994; 269(5): 3469~74頁には、Ig G1 Pro331をSerに突然変異させることによって、C1q結合が著しく低下し、溶解活性が実質的に排除されたと報告されている。対照的に、Ig G4におけるSer331のProの置換は、Ig G4 Pro331変異タンパク質に部分溶解活性(40%)を与えた。

30

【0229】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Schuurmanら、Mol Immunol. 2001; 38(1): 1~8頁には、重鎖間結合形成に関与しているヒンジシステインの1個、Cys226をセリンに突然変異させることによって、より安定な重鎖間結合が得られたと報告されている。Ig G4ヒンジ配列Cys-Pro-Ser-Cysを、Ig G1ヒンジ配列Cys-Pro-Pro-Cysに突然変異させることも、重鎖間の共有結合性相互作用を著しく安定化させる。

【0230】

参照によりその全文が本明細書に組み込まれるAngalら、Mol Immunol. 1993; 30(1): 105~8頁には、Ig G4中、アミノ酸位置241のセリンをプロリン(Ig G1およびIg G2においてその位置で見られる)に突然変異させることによって均一な抗体の製造ならびに血清半減期の延長および元のキメラIg G4と比較して組織分布の改善がもたらされたと報告されている。

40

【0231】

本発明はまた、炭水化物構造が変更され、その結果、エフェクター活性が変更され抗体分子、例えば、ADCC活性の改善を示す、フコシル化が異常な、またはフシコル化が減少した抗体分子の製造も考慮する。これを達成するための、種々の方法が当技術分野で公知である。例えば、ADCCエフェクター活性は、抗体分子の、Fc RI II受容体との結合によって媒介され、これはCH2ドメインのAsn297でのN結合型グリコシル化の炭水化物構造に応じて変わることがわかっている。非フコシル化抗体は、この受容体と増大した親和性で結合し、Fc RI II媒介性エフェクター機能を、天然のフコシル

50

化抗体よりも効率的に誘発する。例えば、 - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ酵素がノックアウトされている C H O 細胞における非フコシル化抗体の組換え製造は、 100 倍増大された A D C C 活性を有する抗体をもたらす [Y amane - Ohnukiら、 B i o t e c h n o l B i o e n g . 2 0 0 4 年 9 月 5 日 ; 8 7 (5) : 6 1 4 ~ 2 2 頁] 。同様の効果は、例えば、 s i R N A またはアンチセンス R N A 処理によって、フコシル化経路においてこの酵素またはその他の酵素の活性を低下させること、酵素（複数の酵素）をノックアウトする細胞株を設計すること、または選択的グリコシル化阻害剤とともに培養することによって達成できる [Rothmannら、 M o l I mm u n o l . 1 9 8 9 年 12 月 ; 2 6 (1 2) : 1 1 1 3 ~ 2 3 頁] 。いくつかの宿主細胞株、例えば、 L e c 1 3 またはラットハイブリドーマ Y B 2 / 0 細胞株は、天然に、フコシル化レベルの低い抗体を產生する。 S h i e l d s ら、 J B i o l C hem . 2 0 0 2 年 7 月 2 6 日 ; 2 7 7 (3 0) : 2 6 7 3 3 ~ 4 0 頁 ; S h i n k a w a ら、 J B i o l C hem . 2 0 0 3 年 1 月 3 1 日 ; 2 7 8 (5) : 3 4 6 6 ~ 7 3 頁。例えば、 G n T I I I 酵素を過剰発現する細胞における抗体の組換え製造による二分された炭水化物レベルの増大もまた、 A D C C 活性を増大すると決定されている。 U man a ら、 N a t B i o t e c h n o l . 1 9 9 9 年 2 月 ; 1 7 (2) : 1 7 6 ~ 8 0 頁。 2 個のフコース残基のうち 1 個のみがないことが A D C C 活性を増大させるのに十分であり得ると予測されている。 F errara ら、 J B i o l C hem . 2 0 0 5 年 1 2 月 5 日 ; [印刷に先行して E pub] 。

【 0 2 3 2 】

10

他の共有結合性修飾

抗体の共有結合性修飾もまた本発明の範囲内に含まれる。それらは、必要に応じて、化学合成によって行ってもよく、または抗体の酵素的もしくは化学的切断によって行ってもよい。その他の種類の抗体の共有結合性修飾は、標的とされる抗体のアミノ酸残基を、選択された側鎖または N もしくは C 末端残基と反応できる有機誘導体化剤と反応させることによって分子に導入される。

20

30

【 0 2 3 3 】

システイニル残基は、通常、 - ハロアセテート（および対応するアミン）、例えば、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドと反応して、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 - プロモ - - (5 - イミドゾイル) プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、 N - アルキルマレイミド、 3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル 2 - ピリジルジスルフィド、 p - クロロメルクリベンゾエート、 2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノールまたはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

40

【 0 2 3 4 】

ヒスチジル残基は、 p H 5 . 5 ~ 7 . 0 でジエチルピロカルボネートとの反応によって誘導体化されるが、これは、この薬剤が、ヒスチジル側鎖に比較的特異的であるためである。パラ - プロモフェナシルプロミドも有用である；この反応は、 0 . 1 M カコジル酸ナトリウム中、 p H 6 . 0 で実施されることが好ましい。

40

【 0 2 3 5 】

リシニル残基およびアミノ末端残基を、コハク酸または他の無水カルボン酸と反応させる。これらの薬剤を用いる誘導体化は、リシニル残基の変更を逆転させる効果を有する。 - アミノ含有残基を誘導体化するのに適したその他の試薬として、イミドエステル、例えば、メチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、 O - メチルイソウレア、 2 , 4 - ペンタンジオンおよびトランスアミナーゼによって触媒されるグリオキシレートとの反応が挙げられる。

50

【 0 2 3 6 】

アルギニル残基は、 1 種または数種の従来試薬、中でも、フェニルグリオキサル、 2 ,

3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサンジオンおよびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化には、グアニジン官能基の高pK_aのために、反応がアルカリ条件下で実施されることが必要である。さらに、これらの試薬は、リシンの基ならびにアルギニン - アミノ基と反応させてもよい。

【0237】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基へのスペクトル標識の導入に特に注目して行うことができる。通常、N - アセチルイミジゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、それぞれ、O - アセチルチロシル種および3 - ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基を、^{1 2 5}Iまたは^{1 3 1}Iを用いてヨード化し、ラジオイムノアッセイに用いるための標識されたタンパク質を調製する。

【0238】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミドとの反応によって選択的に修飾され（R - N . d b d . C . d b d . N - R'）、式中、RおよびR'は、異なるアルキル基、例えば、1 - シクロヘキシリル - 3 - (2 - モルホリニル - 4 - エチル)カルボジイミドまたは1 - エチル - 3 - (4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル)カルボジイミドである。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基を、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換する。

【0239】

グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、それぞれ、対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に脱アミド化されることが多い。これらの残基は、中性または塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化型は、本発明の範囲内に入る。

【0240】

その他の修飾として、プロリンおよびリシンの水酸化、セリルのヒドロキシル基またはトレオニル残基のリン酸、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化が挙げられる（T . E . Creighton, Proteins : Structure and Molecular Properties, W . H . Freeman & Co ., San Francisco, 79 ~ 86 頁 (1983年)）、N - 末端アミンのアセチル化および任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0241】

共有結合性修飾のもう1つの種類は、グリコシドを抗体と化学的または酵素的カップリングすることを含む。これらの手順は、NまたはO結合型グリコシル化のグリコシル化能を有する宿主細胞における抗体の産生を必要としないという点で有利である。用いるカップリング様式に応じて、糖（複数の糖）を（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離スルフヒドリル基、例えば、システインのもの（d）遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンのもの、（e）芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシンもしくはトリプトファンのものまたは（f）グルタミンのアミド基と結合できる。これらの方法は、1987年9月11に公開されたWO 87 / 05330に、ならびにApplinおよびWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259 ~ 306 頁 (1981年) に記載されている。

【0242】

抗体上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的に達成してもよいし、または酵素的に達成してもよい。化学的脱グリコシル化には、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物に対する抗体の曝露が必要である。この処理は、連結している糖（N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたはすべての糖の切断をもたらすが、抗体は無傷で残す。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinら、Arch. Biochem. Biophys. 259 : 52 頁 (1987年) によって、およびEdgarらAnal. Biochem., 118 : 131 頁 (1981) によって記載されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotaku

10

20

30

40

50

から Meth. Enzymol. 138 : 350 頁(1987年)に記載されるように、種々のエンド-およびエキソ-グリコシダーゼの使用によって達成できる。

【0243】

抗体の共有結合性修飾のもう1つの種類は、抗体を種々の非タンパク質性ポリマーの1種、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシアルキレンまたはデキストランなどの多糖ポリマーと連結することを含む。このような方法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,640,835号；同4,496,689号；同4,301,144号；同4,670,417号；同4,791,192号、同4,179,337号、同4,766,106号、同4,179,337号、同4,495,285号、同4,609,546号またはEP315456参照のこと。10

【0244】

各抗体分子は1以上(すなわち、1、2、3、4、5以上)のポリマー分子と結合できる。ポリマー分子は、リンカー分子によって抗体と結合することが好ましい。ポリマーは、通常、合成または天然に存在するポリマー、例えば、場合により置換されていてもよい直鎖または分岐鎖ポリアルケン、ポリアルケニレンまたはポリオキシアルキレンポリマーまたは分岐もしくは非分岐多糖、例えば、ホモ-もしくはヘテロ-多糖であり得る。好ましいポリマーとして、ポリオキシエチレンポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)がある。PEGは、室温で水溶性であり、一般式： $R(O-O-CH_2-CH_2)_nO-O-R$ (式中、Rは水素またはアルキルまたはアルカノール基などの保護基であり得る)を有する。保護基は、1～8個の間の炭素を有することが好ましく、メチルであることがより好ましい。記号nは、好ましくは、1～1,000の間、より好ましくは、2～500の間の正の整数である。PEGは、1000～40,000の間の、好ましい平均分子量を有し、より好ましくは、2000～20,000の間、最も好ましくは、3,000～12,000の間である。PEGは、少なくとも1個のヒドロキシ基を有することが好ましく、末端ヒドロキシ基であることがより好ましい。活性化され、阻害剤上の遊離アミノ基と反応するのが好ましいのは、このヒドロキシ基である。しかし、共有結合によってコンジュゲートされた本発明のPEG/抗体を達成するためには、反応基の種類および量は変わり得るということは理解される。それらをペプチドと結合するのに好ましいポリマーおよび方法は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、米国特許第4,766,106号；同4,179,337号；同4,495,285号；および同4,609,546号に示されている。20

【0245】

遺伝子療法

治療用抗体の、適当な細胞への送達は、当技術分野で公知の任意の適したアプローチの使用によって、例えば、物理的DNA導入法(例えば、リポソームまたは化学処理)によって、またはウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルス)の使用によって、遺伝子療法を介して、ex vivo、in situまたはin vivoで達成できる。例えば、in vivo治療には、所望の抗体をコードする核酸を、単独またはベクター、リポソームまたは沈殿物とともにのいずれかで、被験体に直接注射してもよく、いくつかの実施形態では、抗体化合物の発現が望まれる部位に注射してもよい。ex vivo治療には、被験体の細胞を摘出し、これらの細胞に核酸を導入し、修飾された細胞を被験体に直接戻すか、または、例えば、多孔質膜内にカプセル化し、これを患者に移植する。例えば、米国特許第4,892,538号および同5,283,187号参照のこと。核酸を生存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in vitroで培養細胞に導入されるか、またはin vivoでの哺乳類細胞への核酸の導入に適した技術として、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-デキストランおよびリン304050

酸カルシウム沈殿の使用が挙げられる。核酸の *ex vivo* 送達のためによく用いられるベクターとして、レトロウイルスがある。

【0246】

その他の *in vivo* 核酸導入技術として、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス I 型またはアデノ隨伴ウイルス）を用いるトランスフェクションおよび脂質ベースの系が挙げられる。核酸およびトランスフェクション剤は、微粒子と場合により結合していてもよい。例示的トランスフェクション剤として、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、第四級アンモニウム両親媒性物質 DOTMA ((ジオレオイルオキシプロビル)トリメチルアンモニウムプロミド、GIBCO-BRL によってリポフェクチンとして市販されている) (Felgnerら、(1987年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84、7413~7417頁; Maloneら (1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、6077~6081頁); ペンダントトリメチルアンモニウムヘッドを有する親油性グルタミン酸ジエステル (Itōら (1990年) Biochem. Biophys. Acta 1023、124~132頁); カチオン性脂質ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS、Transfectam、Promega) およびジパルミトイールホスファチジルエタノールアミルスペルミン (DPPES) などの代謝可能親脂質 (J. P. Behr (1986年) Tetrahedron Lett. 27、5861~5864頁; J. P. Behrら (1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、6982~6986頁); 代謝可能な第四級アンモニウム塩 (DOTB、N-[1-[2,3-ジオレオイルオキシ]プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート (DOTAP) (Boehringer Mannheim)、ポリエチレンイミン (PEI)、ジオレオイルエステル、ChotB、ChoSC、DOSC) (Leventisら (1990年) Biochim. Interc. 22、235~241頁); 1対1混合物で、3-[N-(N'、N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) / 3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール DC-Chol (Gaora、(1991年) Biochim. Biophys. Acta 1065、8~14頁)、スペルミン、スペルミジン、リポポリアミン (Behrら、Bioconjugate Chem. 1994、5:382~389頁)、親油性ポリリシン (LPLL) (Zhouら、(1991年) Biochim. Biophys. Acta 939、8~18頁)、過剰のホスファチジルコリン/コレステロールとともに [[(1,1,3,3-テトラメチルブチル)クレ-ソキシ]エトキシ]エチル]ジメチルベンジル水酸化アンモニウム (DEBDAヒドロキシド) (Ballalasら、(1988年) Biochim. Biophys. Acta 939、8~18頁)、セチルトリメチルアンモニウムプロミド (CTAB) / DOPE混合物 (Pinnaduwageら、(1989年) Biochim. Biophys. Acta 985、33~37頁)、ホスファチジルエタノールアミンとの混合物中、DOPE、CTAB、DEBDA、ジドデシルアンモニウムプロミド (DDAB) およびステアリルアミンとのグルタミン酸の親油性ジエステル (TMAG) (Roseら、(1991年) Biotechnique 10、520~525頁)、DDAB / DOPE (TransfectACE、BRL) およびオリゴガラクトース保有脂質が挙げられる。導入の効率を高める例示的トランスフェクションエンハンサー剤として、例えば、DEAE-デキストラン、ポリブレン、リソソーム破壊性 (lysosomal-disruptive) ペプチド (Ohmori N Iら、Biochem. Biophys. Res. Commun. Jun. 27、1997年; 235(3):726~9頁)、コンドロイタン (chondroitan) ベースのプロテオグリカン、硫酸プロテオグリカン、ポリエチルイミン、ポリリジン (Pollard Hら J. Biol. Chem. 1998年 273(13):7507~11頁)、インテグリン結合ペプチド CYGGRGDTp、直鎖デキストランノナサッカライド、グリセロール、オリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドの3' - 末端ヌクレオシド間結合で結合されているコレステリル基 (Leitunger, R. L. 1989年 Proc Natl Acad Sci USA 86 : (17) : 6553 ~ 6頁)、リソホスファチド、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミンおよび1-オレオイルリソホスファチジルコリンが挙げられる。

【0247】

いくつかの状況では、核酸を含有するベクターを標的細胞へ向ける薬剤を用いて核酸を送達することが望ましいことであり得る。このような「ターゲッティング」分子として、標的細胞に対する細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、または標的細胞上の受容体のリガンドが挙げられる。リポソームが用いられる場合には、ターゲッティングに、および／または取り込みを促進するために、エンドサイトーシスと関係している細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質を用いることができる。このようなタンパク質の例として、特定の細胞種に向性のキャプシッドタンパク質およびその断片、循環においてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在を標的とし、細胞内半減期を増大するタンパク質が挙げられる。その他の実施形態では、受容体媒介性エンドサイトーシスを使用できる。このような方法は、例えば、Wuら、1987年またはWagnerら、1990年に記載されている。現在知られている遺伝子マーキングおよび遺伝子療法プロトコールの概説については、Anderson 1992年参照のこと。WO 93/25673およびそれに引用される参考文献も参照のこと。遺伝子療法技術のさらなる概説については、Friedmann, Science, 244 : 1275 ~ 1281頁(1989年); Anderson, Nature, 第392巻の付録、6679号、25 ~ 30頁(1998年); Verma, Scientific American : 68 ~ 84頁(1990年); およびMiller, Nature, 357 : 455460頁(1992年)参照のこと。

10

20

30

40

50

【0248】 スクリーニング法

本発明のもう1つの態様は、PRLRを抗体と接触させることと、抗体がPRLRの活性を修飾するかどうかを調べることを含む、PRLRの活性を調節する(すなわち、低減する)抗体を同定する方法を対象とする。試験抗体の存在下での活性を、試験抗体の不在下での活性に対して比較する。試験抗体を含有するサンプルの活性が、試験抗体を欠くサンプルにおける活性よりも低い場合に、抗体は阻害された活性を有する。有効な治療薬は、大きな毒性のない効果的な薬剤を同定することによって決まる。抗体は、当技術分野で公知の方法によって結合親和性についてスクリーニングできる。例えば、ゲル-シフトアッセイ、ウェスタンプロット、放射性標識競合アッセイ、クロマトグラフィーによる同時分画、共沈殿、架橋、ELISA、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標))、時間分解蛍光測定(例えば、DELFIA)などを使用でき、これらは、例えば、参考によりその全文が本明細書に組み込まれる、Current Protocols in Molecular Biology(1999年)、Current Protocols in Immunology(2007年)John Wiley & Sons、NYに記載されている。さらに、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標))を用いて、2種の抗体間の競合を評価できる(例えば、以下の実施例7参照のこと)。また、時間分解蛍光測定(例えば、DELFIA)を用いて、2種の抗体間の競合のレベルを評価できる。例えば、マイクロプレートに基づく競合スクリーニングDELFIA(登録商標)アッセイ(Perkin Elmer)を、製造業者によって提供されるプロトコールに従って実施できる。

【0249】

標的抗原上の所望のエピトープと結合する抗体を最初にスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, HarlowおよびDavid Lane編(1988)に記載されるものなどの通常の架橋アッセイを実施できる。未知の抗体が、

標的の、本発明の標的特異的抗体との結合を阻害するその能力によって特性決定される、通常の競合結合実験も使用できる。無傷の抗原、その断片、例えば、細胞外ドメインまたは線形エピトープを使用できる。エピトープマッピングは、Champ eら、J. Biol. Chem. 270: 1388~1394頁(1995年)に記載されている。

【0250】

in vitro 結合アッセイの1つの変法では、本発明は、(a)固定化されたPRLRを、候補抗体と接触させるステップと、(b)候補抗体の、PRLRとの結合を検出するステップとを含む方法を提供する。一代替実施形態では、候補抗体を固定化し、PRLRの結合を検出する。固定化は、当技術分野で周知の方法、例えば、支持体、ビーズまたはクロマトグラフィー樹脂との共有結合形成、ならびに抗体結合形成などの非共有結合高親和性相互作用またはストレプトアビジン/ビオチン結合の使用(これでは、固定化される化合物はビオチン部分を含む)のいずれかを用いて達成される。結合の検出は、(i)固定化されていない化合物上の放射性標識を用いて、(ii)固定化されていない化合物上の蛍光標識を用いて、(iii)固定化されていない化合物に対して免疫特異的な抗体を用いて、(iv)固定化された化合物が結合している蛍光支持体を励起する固定化されていない化合物上の標識ならびに当技術分野で周知であり、通常実施されるその他の技術を用いて達成できる。

10

【0251】

標的抗原の調節(すなわち、増大、低減または遮断)する抗体は、候補抗体を、標的抗原(または標的抗原を発現する細胞)とともにインキュベートすることと、候補抗体の、標的抗原の活性または発現に対する効果を調べることによって同定できる。試験抗体の存在下での活性を、試験抗体の不在下での活性に対して比較する。試験抗体を含有するサンプルの活性が、試験抗体を欠くサンプルにおける活性よりも低い場合に、抗体は阻害された活性を有する。標的抗原ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調節する抗体の選択性は、標的抗原に対するその効果を、他の関連化合物に対するその効果に対して比較することによって評価できる。

20

【0252】

特定の例示的実施形態では、抗体が、STAT5および/またはMAPKおよび/またはAKTリン酸化を誘導すること、またはPRLRシグナル伝達の他の指標において、PRLR二量体化を妨げるその能力および/またはPRLRを中和するその能力を調べるための培養細胞系におけるその効果について試験されることが考慮される。さらに、本明細書に記載される、増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび/または細胞傷害性アッセイをはじめとする細胞アッセイを用いて、個々のPRLR抗体を評価できる。

30

【0253】

個々の抗体または抗体の組み合わせの生物活性は、適した動物モデルを用いて*in vivo*で評価できる。例えば、SCIDマウスなどの免疫低下動物に、ヒト癌細胞が導入されている異種間癌モデルを使用できる。有効性は、腫瘍形成の阻害、腫瘍退縮または転移などを測定するアッセイを用いて予測できる。

【0254】

本発明はまた、標的抗原の生物活性と相互作用するか、阻害する(すなわち、酵素活性、結合活性、細胞内シグナル伝達などを阻害する)抗体を同定するためのハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイも包含する。HTSアッセイによって、効率的な多数の化合物のスクリーニングが可能となる。標的抗原とその結合パートナー間の相互作用を調べるための細胞ベースのHTS系が考慮される。HTSアッセイは、所望の特性を改善するよう設計され得る修飾に由来する、所望の特性を有する「ヒット」または「リード化合物」を同定するよう設計される。

40

【0255】

本発明のもう1つの実施形態では、標的抗原ポリペプチドに対して適した結合親和性を有する、CDR内に、1、2、3またはそれより多いアミノ酸の修飾を含む、抗体断片またはCDRのハイスループットスクリーニングが用いられる。

50

【0256】

併用療法

動物モデルにおいて有効である、1種を超える抗体が同定されると、2種以上のこのような抗体（同一または異なる標的高原と結合する）と一緒に混合して、さらに改善された有効性を提供することがさらに有利であり得る。1種以上の抗体を含む組成物を、癌を患う、または癌にかかりやすくなったりヒトまたは哺乳類に投与できる。2種の治療薬の同時投与には、薬剤がその治療効果を発揮している間の間に重複がある限り、薬剤が同時にまたは同一の経路によって投与されることは必要ではない。異なる日または週での投与のように、同時または逐次投与が考慮される。

【0257】

抗体治療は、すべてのステージの癌に有用であり得るが、抗体治療は、進行癌または転移癌において特に適当であり得る。抗体治療法を、化学療法薬または放射線投与計画と組み合わせることは、化学療法薬治療を受けていない患者において好ましいことであり得るが、抗体治療での治療は、1種以上の化学療法を受けている患者に適応され得る。さらに、抗体治療はまた、特に、化学療法薬の毒性にあまり耐容性を示さない患者における、併用化学療法の減少された投与量の使用を可能にし得る。

【0258】

本発明の方法は、単一の抗体ならびに組み合わせまたは種々の抗体の「カクテル」の投与を考慮する。このような抗体カクテルは、異なるエフェクター機構を用いる抗体を含む、または細胞傷害性抗体と免疫エフェクター機能に頼る抗体を直接組み合わせるので、特定の利点を有し得る。組み合わせた、このような抗体は、相乗治療効果を示し得る。例として、本発明の方法は、M-CSF、RANKLに対する抗体、タキソール（商標）、ヘルセプチン（商標）、アバスチン（商標）、アービタックス（商標）または抗EGFR抗体およびタモキシフェンを投与することを考慮する。

【0259】

細胞傷害性薬とは、細胞の機能を阻害する、または妨げる、かつ／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰およびRe¹⁸⁶）、化学療法薬および細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素または合成毒素またはその断片を含むものとする。非細胞傷害性薬とは、細胞の機能を阻害しない、または妨げない、かつ／または細胞の破壊を引き起こさない物質を指す。非細胞傷害性薬は、細胞傷害性であるよう活性化されうる薬剤を含み得る。非細胞傷害性薬は、ビーズ、リポソーム、マトリックスまたは粒子を含み得る（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公報第2003/0028071号および同2003/0032995号参照のこと）。このような薬剤は、本発明の抗体とコンジュゲート、カップリング、連結または結合させてもよい。

【0260】

癌化学療法薬としては、それだけには限らないが、アルキル化剤、例えば、カルボプラチニンおよびシスプラチニン；ナイトロジエンマスターードアルキル化剤；ニトロソ尿素アルキル化剤、例えば、カルムスチン（BCNU）；代謝拮抗物質、例えば、メトトレキサート；フォリン酸；プリン類似体代謝拮抗物質、メルカブトプリン；ピリミジン類似体代謝拮抗物質、例えば、フルオロウラシル（5-FU）およびゲムシタビン（ジェムザール（登録商標））；抗腫瘍性ホルモン薬、例えば、ゴセレリン、ロイプロリドおよびタモキシフェン；天然抗悪性腫瘍薬、例えば、アルデスロイキン、インターロイキン-2、ドセタキセル、エトボシド（VP-16）、インターフェロン、パクリタキセル（タキソール（登録商標））およびトレチノイン（ATRA）；抗生素質天然抗悪性腫瘍薬、例えば、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ダウノマイシンおよびマイトマイシンCをはじめとするマイトマイシン；およびビンカアルカロイド天然抗悪性腫瘍薬、例えば、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン；ヒドロキシ尿素；アセグラトン、アドリアマイシン、イフオスファミド、エノシタビン、エピチオスタノール、アクラルビシン、アンシタビン、ニムスチン、塩酸プロカルバジン、カルボコン、カ

10

20

30

40

50

ルボプラチン、カルモフルール、クロモマイシンA3、抗腫瘍性多糖、抗腫瘍性血小板因子、シクロホスファミド(サイトキシン(登録商標))、シゾフィラン、シタラビン(シトシンアラビノシド)、ダカルバジン、チオイノシン、チオテパ、テガフルール、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、例えば、オーリスタチン、CPT-I1(イリノテカン)、ミトザントロン(mitozantrone)、ビノレルビン、テニボシド、アミノブテリン、カルミノマイシン、エスペラミシン(例えば、米国特許第4,675,187号参照のこと)、ネオカルチノスタチン、OK-432、ブレオマイシン、フルツロン、ブロクスウリジン、ブスルファン、ホンバン、ペプロマイシン、ベスタチン(ウベニメクス(登録商標))、インターフェロン- α 、メピチオスタン、ミトブロニトール、メルファラン、ラミニンペプチド、レンチナン、カワラタケ(Coriolus versicolor)抽出物、テガフルール/ウラシル、エストラムスチン(エストロゲン/メクロレタミン)が挙げられる。

10

【0261】

さらに、癌患者のための治療として用いられるさらなる薬剤として、EPO、G-CSF、ガンシクロビル；抗生物質、ロイプロリド；メペリジン；ジドブジン(AZT)；突然変異体および類似体を含むインターロイキン1～18；インターフェロンまたはサイトカイン、例えば、インターフェロン- α 、およびホルモン、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)および類似体、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)；増殖因子、例えば、トランスフォーミング増殖因子- α (TGF- α)、纖維芽細胞増殖因子(FGF)、神経成長因子(NGF)、成長ホルモン放出因子(GHRF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、纖維芽細胞増殖因子相同因子(FGFHF)、肝細胞増殖因子(HGF)およびインスリン増殖因子(IGF)；腫瘍壞死因子- α & (TNF- α)；浸潤阻害因子-2(IIF-2)；骨形成タンパク質1～7(BMP1～7)；ソマトスタチン；チモシン- α -1； β -グロブリン；スーパーオキシドジスムター(SeO₂)；EGFR(上皮細胞増殖因子受容体)アンタゴニスト、例えば、セツキシマブおよびゲフィチニブなど；PR(プロゲステロン受容体)アンタゴニストおよびモジュレーター、例えば、ミフェプリストンおよびオナプリストン(商標)；アロマトアーゼ(aromatase)阻害剤、例えば、アナストロゾール、エキセメスタンおよびレトロゾールなど；抗エストロゲン剤、エストロゲン受容体アンタゴニストおよびモジュレーター、例えば、タモキシフェン、トレミフェンおよびフルベストラントなど；補体因子；抗血管形成因子；抗原性物質；およびプロドラッグが挙げられる。

20

【0262】

プロドラッグとは、親薬物と比較して、腫瘍細胞に対して細胞傷害性の低いまたは非細胞傷害性であり、活性なまたはより活性な親の形へ酵素的に活性化され得る、または変換され得る製薬上活性な物質に由来する前駆体または誘導体を指す。例えば、Wilman、「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」Biological Society Transactions, 14, 375～382頁、615th Meeting Belfast(1986年)およびStellaら、「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」、Directed Drug Delivery, Borchardt(編), 247～267頁、Human Press(1985)参照のこと。プロドラッグとして、それだけには限らないが、より活性な細胞傷害性遊離薬物へ変換できる、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、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、グリコシリ化プロドラッグ、 α -ラクタム含有プロドラッグ、場合により置換されてもよいフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは場合により置換されてもよいフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンおよびその他の5-フルオロウリジンプロドラッグが挙げられる。本明細書において使用するための、プロドラッグの形に誘導体化できる細胞傷害性薬の例として、それだけには限らないが、前記の化学療法薬が挙げられる。

30

40

50

【0263】

投与および調製

本発明の抗体は、所望の送達法に適した担体を含む薬剤組成物に製剤できる。適した担体として、抗体と組み合わせた場合に、抗体の所望の活性を保持し、被験体の免疫系と非反応性である任意の物質が挙げられる。例として、それだけには限らないが、任意のいくつかの標準的な薬剤担体、例えば、滅菌リン酸緩衝生理食塩水溶液、静菌水などが挙げられる。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどを使用でき、安定性の増強のために、穏やかな化学修飾などに付された、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどといったその他のタンパク質を含み得る。

【0264】

抗体の治療用製剤は、貯蔵のために、所望の程度の純度を有する抗体を、任意の生理学上許容される担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences第16版、Osol, A.編（1980年））と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形に調製される。許容される担体、賦形剤または安定剤は、用いられる投与量および濃度でレシピエントにとって非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩およびその他の有機酸などのバッファー；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸およびメチオニン；保存料（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；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、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、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、ヒスチジン、アルギニンまたはリシン；単糖、二糖およびその他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート薬、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）を含む。

【0265】

本明細書において製剤は、治療される特定の適応症のために必要に応じて、1種を越える活性化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有するものを含み得る。このような分子は、意図される目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

【0266】

活性成分はまた、例えば、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）において、またはマクロエマルションにおいて、コアセルベーション技術によって、また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またはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタシレート(methyl methacrylate))マイクロカプセルに封入され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences第16版、Osol, A.編（1980）に開示されている。

【0267】

*in vivo*投与に用いられる製剤は、無菌でなくてはならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

【0268】

抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内および鼻腔内投与、および必要に応じて、局所治療用に、病巣内投与をはじめとする、任意の適した手段によって投与される。非経口注入は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下投与を含む。さらに、抗体は、特

10

20

30

40

50

に、抗体の用量を低下させながら、パルス注入によって適宜投与される。好ましくは、投薬は注射によって行われることが好ましく、静脈内または皮下注射が最も好ましい。局所 (topical) 、特に、経皮、経粘膜、直腸、経口または局所 (local) 投与、例えば、所望の部位に近接して置かれたカテーテルによるをはじめとするその他の投与法が考慮される。

【0269】

鼻腔投与には、薬剤製剤および医薬は、適當な溶媒 (複数の溶媒) と、場合により、その他の化合物、例えば、それだけには限らないが、安定化剤、抗菌剤、抗酸化剤、pH変更因子、界面活性剤、バイオアベイラビリティ変更因子およびこれらの組み合わせとを含有するスプレーまたはエアゾールであり得る。エアゾール製剤の噴射剤は、圧縮空気、窒素、二酸化炭素または炭化水素ベースの低沸点溶媒を含み得る。

10

【0270】

注射用投与形は、通常、適した分散剤または湿润剤および懸濁剤を用いて調製できる水性懸濁液または油性懸濁液を含む。注射用形態は、溶媒または希釈剤を用いて調製される液相で、または懸濁液の形であり得る。許容される溶媒またはビヒクルとして、滅菌水、リンガー溶液または等張生理食塩水溶液が挙げられる。

20

【0271】

注射には、薬剤製剤および / または医薬は、上記の適當な溶液で再構成するのに適した粉末であり得る。これらの例として、それだけには限らないが、凍結乾燥、回転乾燥または噴霧乾燥された粉末、非晶質粉末、顆粒、沈殿物または微粒子が挙げられる。注射には、製剤は、安定化剤、pH変更因子、界面活性剤、バイオアベイラビリティ変更因子およびこれらの組み合わせを場合により含んでもよい。

20

【0272】

徐放製剤を調製できる。徐放製剤の適した例として、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形である。徐放マトリックスの例として、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) またはポリ (ビニルアルコール)) 、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号) 、L - グルタミン酸およびγエチル - L - グルタメートの共重合体、非分解性エチレン - 酢酸ビニル、分解性乳酸 - グリコール酸共重合体、例えば、リュープロンデポー (Lupron Depot) (商標) (乳酸 - グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア) およびポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン - 酢酸ビニルおよび乳酸 - グリコール酸などのポリマーによって、100日間にわたる分子の放出が可能となるが、特定のヒドロゲルは、よりミ次官期間の間タンパク質を放出する。カプセル化された抗体は、身体において長期間残存する場合に、37°で湿度に対する曝露の結果として変性または凝集し、その結果、生物活性の喪失および免疫原性の可能性ある変更をもたらす場合がある。安定化のための合理的な戦略は、関与する機構に応じて考案できる。例えば、凝集機構が、チオ - ジスルフィド交換による分子内S - S結合形成であると見い出されている場合には、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分含量を制御すること、適當な添加物を用いることおよび特定のポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。当技術分野で公知のその他の戦略を使用できる。

30

【0273】

本発明の製剤は、本明細書に記載される、短時間作用型、迅速放出型、長時間作用型または徐放性であるよう設計できる。したがって、薬剤製剤はまた、制御放出のために、または持続放出 (slow release) のために製剤できる。

40

【0274】

本組成物はまた、例えば、ミセルまたはリポソームまたはいくつかのその他のカプセル化された形を含むことができ、持続放出 (extended release) 型で投与して、貯蔵および / または送達効果の延長を提供できる。したがって、薬剤製剤および医

50

薬は、ペレットまたはシリンダーに圧縮でき、デポー注射として、またはステントなどのインプラントとして筋肉内にまたは皮下に移植できる。このようなインプラントは、既知不活性材料、例えば、シリコンおよび生分解性ポリマーを用いることができる。

【0275】

上記の代表的な投与形のほかに、製薬上許容される賦形剤および担体は、通常、当業者に知られており、したがって、本発明に含まれる。このような賦形剤および担体は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる「Remington's Pharmaceutical Sciences」Mack Pub. Co., New Jersey (1991) に記載されている。

【0276】

特定の投与形は、疾患の状態、被験体の年齢、体重、一般的健康状態、遺伝子型、性別および食事、投与間隔、投与経路、排泄速度および薬物の組み合わせに応じて調整できる。有効量を含有する上記の投与形はいずれも、十分に通常の実験の範囲内であり、したがって、十分に本発明の範囲内である。

【0277】

本発明の抗体は、その他の天然に存在する免疫グロブリンまたはその他の生体分子を実質的に含まずに調製されることが多い。好ましい抗体はまた、癌に苦しむ、または癌を患う傾向のある哺乳類に投与された場合に、最小の毒性しか示さない。

【0278】

本発明の組成物は、従来の、周知の滅菌技術によって滅菌できる。得られた溶液は、使用するためにパッケージングしてもよいし、無菌状態で濾過し、凍結乾燥し、凍結乾燥した製品を、滅菌溶液と組み合わせ、その後、投与する。本組成物は、生理学的条件を近づけるために必要とされる製薬上許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、張性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムおよび安定剤（例えば、120%マルトースなど）を含み得る。

【0279】

本発明の抗体はまた、種々の種類の脂質および／またはリン脂質および／または界面活性剤からなる小さな小胞であり、薬物（例えば、本明細書に開示される抗体および場合により、化学療法薬）の送達に有用であるリポソームを介して投与できる。リポソームは、エマルション、泡、ミセル、不溶性単層、リン脂質分散物、ラメラ層などを含み、抗体を特定の組織にターゲッティングするための、ならびに、組成物の半減期を延長するためのビヒクルとして働き得る。リポソームを調製するには、例えば、参照に医により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,837,028号および同5,019,369号に記載される種々の方法が利用可能である。

【0280】

抗体を含有するリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688頁(1985年)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030頁(1980年)；および米国特許第4,485,045号および同4,544,545号に記載されるなどの当技術分野で公知の方法によって調製される。循環時間の増大されたリポソームは、米国特許第5,013,556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、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって作製できる。リポソームは、所望の径を有するリポソームが生成するよう規定の細孔径のフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら、J. Biol. Chem. 257:286~288頁(1982年)に記載されるように、ジスルフィド交換反応によってリポソームとコンジュゲートできる。化学療法薬（例えば、ドキソルビシン）は、リポソーム内に場合により含まれてもよい[例えば、Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19):1484頁(1989年)]。

10

20

30

40

50

【0281】

これらの組成物中の抗体の濃度は、大きく、すなわち、重量で約10%未満、通常、少なくとも約25%から75%または90%にまで異なる場合があり、選択された個々の投与様式に従って、主に液量、粘度などによって選択される。実際の、経口的に、局所的におよび非経口的に投与可能な組成物を調製する方法は、当業者には公知であるか明らかであり、例えば、参照によって本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Science、第19版、Mack Publishing Co.、Easton、PA(1995年)に詳細に記載されている。

【0282】

患者において疾患を治療するための本発明の組成物の有効量の決定は、当技術分野で周知である標準的な経験的方法によって達成できる。

10

【0283】

本発明の組成物は、乳癌、前立腺癌または肺癌にすでに患っている、または傾向がある、またはその危険にある哺乳類に、疾患の進行を防ぐまたは、少なくとも部分的に停止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適当な量は、「治療上有効な用量」と定義される。有効な量の抗体は変化し、疾患の重篤度および治療されている患者の体重および全身状態に応じて変わるが、通常、約1.0 μg / 体重1kg ~ 約100mg / 体重1kgの範囲である。例示的用量は、適用あたり、約10 μg / kg ~ 約30mg / kgまたは約0.1mg / kg ~ 約20mg / kgまたは約1mg / kg ~ 約10mg / kgの範囲であり得る。抗体はまた、体表面積によって投薬され得る(例えば、最大4.5g / 平方メートル)。抗体のその他の例示的用量として、単回投与において最大総計8gが挙げられる(80kgの体重または1.8平方メートルの体表面積を仮定して)。

20

【0284】

投与は、当技術分野で公知の任意の手段によってであり得る。例えば、抗体は、1以上の分離されたボーラス投与によって、例えば、5、10、15、30、60、90、120分またはそれ以上の期間をかけた短期間または長期間注入によって投与してもよい。最初の治療期間の後、患者の応答および治療の耐容性に応じて、維持用量を、患者の応答を維持するのに必要とされるよう、例えば、毎週、隔週で、3週間毎に、4週間毎に、毎月、隔月で、3ヶ月毎に、または6ヶ月毎に投与すればよい。疾患症状の所望の抑制が生じるまでに、より頻繁な投与量が必要である場合もあり、投与量は必要に応じて調整すればよい。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって容易にモニターされる。この治療は、規定の期間の間である場合もあるし、疾患進行または死亡まで数年の期間にわたる、慢性的なものおよび連続である場合もある。

30

【0285】

組成物の単回または複数回投与は、治療医師によって選択される用量レベルおよびパターンで実施できる。疾患の予防または治療には、抗体の適当な投与量は、上記で定義される、治療される疾患の種類、疾患の重篤度および経過、抗体が予防目的または治療目的のために投与されるかどうか、これまでの治療、患者の病歴および抗体に対する応答、主治医の裁量に応じて変わる。抗体は、1回または一連の治療にわたって患者に適切に投与される。

40

【0286】

いずれにしても、製剤は、所望の生物活性を発揮する、例えば、癌の重篤度を防ぐまたは最小化するのに十分である一定量の治療用抗体を経時的に提供するはずである。本発明の組成物はまた、このような疾患の治療のために、単独で、または補助療法としての、当技術分野で公知のその他の治療薬とともに投与されてもよい。

【0287】

抗体組成物は、良好な医療行為と合致した様式で、製剤、投薬および投与される。これに関連して考慮する因子として、治療される特定の傷害、治療される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与形欠くおよび医師に公知であるその他の因子が挙げられる。投与されるべき抗体の治療上有効な量は、このよう

50

な考慮によって支配されており、標的によって媒介される疾患、障害の状態を予防、寛解または治療するために必要な最小量である。このような量は、宿主にとって毒性である、または宿主を感染に対して大きく、より感受性にする量よりも少ないことが好ましい。

【0288】

抗体は、そうでなくともよいが、場合により、問題の障害を予防または治療するために現在用いられている1種以上の薬剤とともに製剤される。このようなその他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患の種類、状態または障害または治療および上記で論じられたその他の因子に応じて変わる。これらは、通常、同一投与形で、本明細書において先に用いられた投与経路または従来用いられた投与形の約1～99%で用いられる。

【0289】

本発明のもう1つの実施形態では、所望の状態の治療に有用な物質を含有する製品が提供される。本製品は、容器および表示を含む。適した容器として、例えば、ピン、バイアル、シリングおよび試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど、種々の材料から形成されてよい。容器は、状態を治療するのに有效である組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射用ニードルによって穴を開けることができる栓を有する静脈用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の活性薬剤は、本発明の抗体である。容器上の表示または容器に付随する表示は、組成物が、選択された状態を治療するために用いられることを示す。本製品は、第2の治療薬（例えば、本明細書において論じられる、または当技術分野で公知の疾患のための任意の第2の治療薬）を含有する第2の容器をさらに含み得る。本製品は、凍結乾燥された抗体製剤を再構成するための、製薬上許容されるバッファー、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、リンガーリン酸緩衝液またはデキストロース溶液を含有する別の容器をさらに含み得る。商業上およびユーザーの見地から望ましいその他の物質、例えば、他のバッファー、希釈剤、フィルター、ニードル、シリングおよび使用のための指示を含む添付文書をさらに含み得る。

10

20

30

40

【0290】

免疫療法

癌を有する患者を治療するのに有用な抗体として、腫瘍に対して強力な免疫応答を開始できるものおよび細胞傷害性を指示できるものが挙げられる。細胞傷害性薬剤とコンジュゲートしている抗体を用いて、細胞傷害性薬剤を、PRLRを発現する腫瘍組織にターゲッティングできる。あるいは、抗体は、補体媒介性または抗体依存性細胞傷害（ADCC）機構のいずれかによって腫瘍細胞溶解を誘発することができ、それらの両方とも、エフェクター細胞Fc受容体部位または補体タンパク質との相互作用に免疫グロブリン分子の無傷のFc部分を必要とする。さらに、腫瘍増殖に対して直接的な生物学的效果を発揮する抗体は、本発明の実施において有用である。このような直接的な細胞傷害性抗体が作用し得る可能性ある機構として、細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍血管形成因子プロフィールの調節およびアポトーシスの誘導が挙げられる。特定の抗体が抗腫瘍作用を発揮する機構は、ADCC、ADMMC、補体媒介性細胞溶解などを調べるよう設計され、全般的に、当技術分野で公知の、任意の数のin vitroアッセイを用いて評価することができる。

【0291】

一実施形態では、免疫療法は、PRLRと結合し、PRLRの活性化を阻害する抗体を用いて実施される。

【0292】

抗PRLR抗体は、その「裸の」またはコンジュゲートしていない形で投与してもよく、その他の治療薬もしくは診断薬と直接コンジュゲートしていてもよく、またはこのような治療薬もしくは診断薬を含む担体ポリマーと間接的にコンジュゲートしていてもよい。

【0293】

抗体は、放射性同位体、親和性標識（例えば、ビオチン、アビシンなど）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）蛍光または発光または生物発光標識（例えば、FITCまたはローダミンなど）、常磁性原子などの使用に

50

よって検出可能なように標識できる。このような標識を達成するための手順は、当技術分野で周知であり、例えば、(Sternberger, L. A. ら、J. Histochem. Cytochem. 18: 315 頁(1970年); Bayer, E. A. ら、Meth. Enzym. 62: 308 頁(1979年); Engvall, E. ら、Immuno. 109: 129 頁(1972年); Goding, J. W. J. Immunol. Meth. 13: 215 頁(1976年)) 参照のこと。

【0294】

抗体部分のコンジュゲーションは、米国特許第6,306,393号に記載されている。一般技術はまた、Shihら、Int. J. Cancer 41: 832~839頁(1988年); Shihら、Int. J. Cancer 46: 1101~1106頁(1990年); およびShihら、米国特許第5,057,313号に記載されている。この一般法は、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分を、少なくとも1個の遊離アミン官能基を有し、複数の薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物(addend)またはその他の治療薬を保持している担体ポリマーと反応させることを含む。この反応は、最初のシップ塩基(イミン)結合をもたらし、これは、第二級アミンに還元して最終コンジュゲートを形成することによって安定化できる。

【0295】

担体ポリマーは、例えば、少なくとも50個のアミノ酸残基のアミノデキストランまたはポリペプチドであり得る。薬物またはその他の薬剤を担体ポリマーとコンジュゲートする種々の技術が、当技術分野で公知である。ポリペプチド担体を、アミノデキストランの代わりに使用できるが、ポリペプチド担体は、鎖中に少なくとも50個のアミノ酸残基、好ましくは、100~5000個のアミノ酸残基を有さなくてはならない。少なくともいくつかのアミノ酸は、リシン残基またはグルタミン酸またはアスパラギン酸残基でなくてはならない。リシン残基のペンドントアミンおよびグルタミンおよびアスパラギン酸のペンドントカルボキシレートは、薬物、毒素、免疫調節薬、キレート剤、ホウ素含有物(addend)またはその他の治療薬を結合するのに好都合である。適したポリペプチド担体の例として、得られた負荷された担体およびコンジュゲートに望ましい溶解特性を与える、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらの共重合体およびこれらのアミノ酸とその他のもの、例えば、セリンの混合ポリマーが挙げられる。

【0296】

あるいは、コンジュゲートしている抗体は、抗体成分を治療薬と直接コンジュゲートすることによって調製できる。一般手順は、治療薬が酸化された抗体成分と直接結合していくことを除いて、コンジュゲーションの間接法と類似している。例えば、抗体の炭水化物部分を、半減期を延長するためにポリエチレングリコールと結合させることができる。

【0297】

あるいは、治療薬を、ジスルフィド結合形成を介して、またはヘテロ二官能性架橋剤、例えば、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロブリオネート(SPD P)を用いて、還元された抗体成分のヒンジ領域に結合できる。Yulら、Int. J. Cancer 56: 244 頁(1994年)。このようなコンジュゲーションのための一般技術は、当技術分野で周知であり、例えば、Wong、Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking(CRC Press 1991年); Monoclonal Antibodies: Principles and Applications、Birchら(編)、187~230頁(Wiley-Liss, Inc. 1995年)中、Upeslacišら、「Modification of Antibodies by Chemical Methods」; Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application、Ritterら(編)、60~84頁(Cambridge University Press 1995年)中、Price、「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」。

10

20

30

40

50

i e s」参照のこと。N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (S P D P)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート H C L)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスペレート)、アルデヒド (例えば、グルタルエルデヒド (g l u t a r e l d e h y d e))、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 (t o l y e n e) 2 , 6 - デイソシアネート) およびビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - デニトロベンゼン) など、種々の二官能性タンパク質カップリング剤が当技術分野で公知である。

10

【0298】

最後に、1種以上の抗 - P R L R 抗体部分と、別のポリペプチドとを含む融合タンパク質は構築できる。抗体融合タンパク質を作製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第6,306,393号参照のこと。インターロイキン - 2 部分を含む抗体融合タンパク質は、Boletiら、Ann. Oncol. 6 : 945 (1995)、Nicoleら、Cancer Gene Ther. 2 : 161 頁 (1995年)、Beckerら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93 : 7826 頁 (1996年)、Hankら、Clin. Cancer Res. 2 : 1951 頁 (1996年) および Huら、Cancer Res. 56 : 4998 頁 (1996年) によって記載されている。

20

【0299】

一実施形態では、本発明の抗体は、放射線増感剤として用いられる。このような実施形態では、抗体は、放射線増感剤とコンジュゲートされている。本明細書において、用語「放射線増感剤」とは、電磁放射に対して放射線感作される細胞の感受性を増大するために、かつ / または電磁放射を用いて治療可能である疾患の治療を促進するために、治療上有効な量で動物に投与される分子、好ましくは、低分子量分子と定義される。電磁放射を用いて治療可能である疾患として、新生生物性疾患、良性および悪性腫瘍ならびに癌性細胞が挙げられる。

30

【0300】

本明細書において、用語「電磁放射」および「放射」として、それだけには限らないが、 $10^{-20} \sim 10^0$ メートルの波長を有する放射が挙げられる。本発明の好ましい実施形態は、以下の電磁放射を用いる： 放射 ($10^{-20} \sim 10^{-13}$ m)、X線放射 ($10^{-12} \sim 10^{-9}$ m)、紫外光 (10 nm ~ 400 nm)、可視光 (400 nm ~ 700 nm)、赤外線放射 (700 nm ~ 1.0 mm) およびマイクロ波放射 (1 mm ~ 30 cm)。

30

【0301】

放射線増感剤は、電磁放射の毒性作用に対する癌性細胞の感受性を増大することがわかっている。多数の癌治療プロトコールは、現在、X線の電磁放射によって活性化された放射線増感剤を用いている。X線によって活性化された放射線増感剤の例として、それだけには限らないが、以下が挙げられる：メトロニダゾール、ミソニダゾール、デスマチルミソニダゾール、ピモニダゾール、エタニダゾール、ニモラゾール、マイトイシン C、R S U 1 0 6 9、S R 4 2 3 3、E O 9、R B 6 1 4 5、ニコチンアミド、5 - ブロモデオキシウイリジン (B U d R)、5 - ヨードデオキシウリジン (I U d R)、ブロモデオキシチジン、フルオロデオキシウリジン (F U d R)、ヒドロキシ尿素、シスプラチンならびにこれらの治療上有効な類似体および誘導体。

40

【0302】

癌の光線力学療法 (P D T) は、増感剤の放射線アクチベーターとして可視光を用いる。光線力学的放射線増感剤の例として、それだけには限らないが以下が挙げられる：ヘマトポルフィリン誘導体、フォトフリン (r)、ベンゾポルフィリン誘導体、N P e 6、スズエチオポルフィリン (S n E T 2)、フェオボルビド (p h e o b o r b i d e) - a

50

、バクテリオクロロフィル - a、ナフタロシアニン、フタロシアニン、亜鉛フタロシアニンおよびこれらの治療上有効な類似体および誘導体。

【0303】

もう1つの実施形態では、抗体は、抗体 - 受容体コンジュゲートが患者に投与され、続いて、除去剤を用いて結合していないコンジュゲートが循環から除去され、次いで、細胞傷害性薬剤（例えば、放射性核種）とコンジュゲートしているリガンド（例えば、アビジン）が投与される、腫瘍プレターゲッティングにおいて利用するために、受容体（ストレプトアビジンのような）とコンジュゲートしてもよい。

【0304】

「標識」とは、抗体と直接または間接的にコンジュゲートしている検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、自身によって、それ自体、検出可能であり得（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、酵素標識の場合には、検出可能である、基質化合物または組成物の化学的变化を触媒し得る。あるいは、標識は、そのまで検出可能でなくともよいが、検出可能である別の薬剤によって結合されている要素であり得る（例えば、エピトープタグまたはビオチン - アビジンなどといった結合パートナー対の一方）。したがって、抗体は、その淡理を容易にする標識またはタグを含むことができ、抗体を同定するための本発明の方法は、標識またはタグとの相互作用によって抗体を単離するステップを含む。

10

【0305】

例示的治療免疫複合体は、化学療法薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片）、放射性同位元素（すなわち、放射性コンジュゲート）などの細胞障害性薬剤とコンジュゲートしている本明細書に記載される抗体を含む。融合タンパク質は、以下にさらに詳細に記載されている。

20

【0306】

放射性金属または磁気共鳴エンハンサーのキレート剤は、当技術分野で周知である。代表的なものとして、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）およびジエチレントリアミンペニタ酢酸（DTPA）の誘導体がある。これらのキレート剤は、通常、側鎖に、キレート剤が担体に結合され得る基を有する。このような基として、例えば、DTPAまたはEDTAが、担体のアミン基にカップリングされ得るベンジルイソチオシアネートが挙げられる。あるいは、すべて周知の手段によって、活性化または先の誘導体化およびその後のカップリングによって、キレート剤上のカルボキシル基またはアミン基を担体にカップリングできる。

30

【0307】

ホウ素含有物（addend）、例えば、カルボランは、従来法によって抗体成分と結合できる。例えば、カルボランは、当技術分野で周知であるように、ペンダント側鎖上のカルボキシル基を用いて調製できる。このようなカルボランの、担体、例えば、アミノデキストランとの結合は、カルボランのカルボキシル基の活性化と、担体上のアミンとの縮合によって達成でき、中間体コンジュゲートが得られる。次いで、以下に記載されるように、このような中間体コンジュゲートを抗体成分と結合して、治療上有用な免疫コンジュゲートを得ることができる。

40

【0308】

ポリペプチド担体は、アミノデキストランの代わりに用いることができるが、ポリペプチド担体は、鎖中に少なくとも50個のアミノ酸残基、好ましくは、100～5000個のアミノ酸残基を有さなくてはならない。少なくともいくつかのアミノ酸は、リシン残基またはグルタミン酸またはアスパラギン酸残基でなくてはならない。リシン残基のペンダントアミンおよびグルタミンおよびアスパラギン酸のペンダントカルボキシレートは、薬物、毒素、免疫調節薬、キレート剤、ホウ素含有物（addend）または他の治療薬を結合するのに好都合である。適したポリペプチド担体の例として、得られた負荷された担体および免疫複合体に望ましい溶解特性を与える、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらの共重合体およびこれらのアミノ酸とその他のもの、例えば

50

、セリンの混合ポリマーが挙げられる。

【0309】

抗体成分を含む中間体コンジュゲートのコンジュゲーションは、抗体成分の炭水化物部分を酸化することと、得られたアルデヒド（およびケトン）カルボニルを、薬物、毒素、キレート剤、免疫調節薬、ホウ素含有物（addend）またはその他の治療薬を負荷した後に担体上に残っているアミン基と反応させることによって達成される。あるいは、中間体コンジュゲートを、治療薬の負荷後に、中間体コンジュゲート中に導入されているアミン基を介して酸化された抗体成分と結合させてもよい。酸化は、化学的に、例えば、NaIO₄またはその他の解糖試薬を用いて、または酵素的に、例えば、ノイラミニダーゼおよびガラクトースオキシダーゼを用いて達成されることが好都合である。アミノデキストラン担体の場合には、通常、アミノデキストランのアミンのすべてが、治療薬の負荷に用いられるわけではない。アミノデキストランの残存するアミンが、酸化された抗体成分と縮合して、シップ塩基付加物を形成し、次いで、これは、通常、水素化ホウ素還元剤を用いて還元的に安定化される。

10

【0310】

本発明のその他の免疫複合体を製造するためには、類似の手順が用いられる。負荷されたポリペプチド担体は、抗体成分の酸化された炭水化物部分との縮合のために、残存する遊離リシン残基を有することが好ましい。ポリペプチド担体上のカルボキシルは、例えば、DCCを用いる活性化および過剰のジアム（di amme）との反応によって、必要に応じて、アミンに変化できる。

20

【0311】

最終免疫複合体は、Sephacryl S-300でのサイジングクロマトグラフィーまたは1種以上のCD84H_yエピトープを用いるアフィニティーコロマトグラフィーなどの従来技術を用いて精製される。

【0312】

あるいは、免疫複合体は、抗体成分を、治療薬と直接コンジュゲートすることによって調製できる。一般手順は、治療薬が酸化された抗体成分と直接結合していることを除いて、コンジュゲーションの間接法と類似している。

【0313】

当然のことではあるが、その他の治療薬を本明細書に記載されるキレート剤と置換することができる。当業者ならば、過度の実験を行うことなく、コンジュゲーションスキームを考案することができる。

30

【0314】

さらなる例示として、治療薬を、ジスルフィド結合形成を介して、還元された抗体成分のヒンジ領域に結合できる。例えば、テタヌストキソイドペプチドは、ペプチドを抗体成分と結合するために用いられる単一のシステイン残基を用いて構築することができる。別 の方法として、ヘテロ二官能性架橋剤、例えば、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロトリオネート(SPD P)を用いて、このようなペプチドを抗体成分と結合できる。Yular、Int. J. Cancer 56:244頁(1994年)。このようなコンジュゲーションのための一般技術は、当技術分野で周知である。例えば、Wong、Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking(CRC Press 1991年); Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birchら(編)、187~230頁(Wiley-Liss, Inc. 1995年)中、Upeslaciisら、「Modification of Antibodies by Chemical Methods」; Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritterら(編)、60~84頁(Cambridge University Press 1995年)中、Price、「Production and Characterization of Synthetic Peptide

40

50

- Derived Antibodies」参照のこと。

【0315】

抗体と細胞傷害性薬剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートH C L)、活性エステル(例えば、ジスクシンイミジルスペレート)、アルデヒド(例えば、グルタルエルデヒド(g l u t a r e l d e h y d e))、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(t o l y e n e)2,6-ジイソシアネート)およびビス-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)を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、V i t e t t a ら、S c i e n c e 2 3 8 : 1 0 9 8 頁(1987年)に記載のとおり調製できる。炭素-14-標識された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ペント酢酸(M X - D T P A)は、放射性核種の抗体とのコンジュゲーションのための例示的キレート薬である(例えば、W O 9 4 / 1 1 0 2 6 参照のこと)。

10

【0316】

上記のように、抗体のF c領域中の炭水化物部分を用いて、治療薬をコンジュゲートできる。しかし、免疫複合体の抗体成分として、抗体断片が用いられる場合には、F c領域が存在しない場合がある。それにもかかわらず、抗体または抗体断片の軽鎖可変領域に炭水化物部分を導入することが可能である。例えば、L e u n g ら、J . I mm u n o l . 1 5 4 : 5 9 1 9 頁(1995年); H a n s e n ら、米国特許第5,443,953号参考のこと。次いで、操作された炭水化物部分を用いて治療薬を結合できる。

20

【0317】

さらに、当業者ならば、コンジュゲーション法の多数の可能性ある変法を認識する。例えば、血液、リンパまたはその他の細胞外液における、無傷の抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長するために、炭水化物部分を用いてポリエチレングリコールを結合できる。さらに、治療薬を、炭水化物部分と、および遊離スルフヒドリル基と結合することによって「二価免疫複合体」を構築することが可能である。このような遊離スルフヒドリル基は、抗体成分のヒンジ領域に位置し得る。

30

【0318】

抗体融合タンパク質

本発明は、1種以上の抗体部分と、別のポリペプチド、例えば、免疫調節薬または毒素部分とを含む融合タンパク質の使用を考慮する。抗体融合タンパク質を作製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第6,306,393号参考のこと。インターロイキン-2部分を含む抗体融合タンパク質は、B o l e t i ら、A n n . O n c o l . 6 : 9 4 5 頁(1995年)、N i c o l e t ら、C a n c e r G e n e T h e r . 2 : 1 6 1 頁(1995年)、B e c k e r ら、P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 9 3 : 7 8 2 6 頁(1996年)、H a n k ら、C l i n . C a n c e r R e s . 2 : 1 9 5 1 頁(1996年)およびH u ら、C a n c e r R e s . 5 6 : 4 9 9 8 頁(1996年)によって記載されている。さらに、Y a n g ら、H u m . A n t i b o d i e s H y b r i d o m a s 6 : 1 2 9 頁(1995年)には、F(ab')₂断片と、腫瘍壞死因子部分とを含む融合タンパク質が記載されている。

40

【0319】

組換え分子が、1種以上の抗体成分と、毒素または化学療法薬とを含む、抗体-毒素融合タンパク質を作製する方法は、当等業者には公知である。例えば、抗体-シュードモナス外毒素A融合タンパク質は、C ha u d h a r y ら、N a t u r e 3 3 9 : 3 9 4 頁(1989年)、B r i n k m a n n ら、P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 8 8 : 8 6 1 6 頁(1991年)、B a t r a ら、P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 8 9 : 5 8 6 7 頁(1992年)、F r i e d m a n ら、J . I m

50

munol. 150 : 3054 頁 (1993 年)、Wellsら、Int. J. Can. 60 : 137 頁 (1995 年)、Fominaya ら、J. Biol. Chem. 271 : 10560 頁 (1996 年)、Kuan ら、Biochemistry 35 : 2872 頁 (1996 年) および Schmidt ら、Int. J. Can. 65 : 538 頁 (1996 年) によって記載されている。ジフテリア毒素部分を含有する抗体 - 毒素融合タンパク質は、Kreitman ら、Leukemia 7 : 553 頁 (1993 年)、Nicholls ら、J. Biol. Chem. 268 : 5302 頁 (1993 年)、Thompson ら、J. Biol. Chem. 270 : 28037 頁 (1995 年) および Vallera ら、Blood 88 : 2342 頁 (1996 年) に記載されている。Deonarain ら、Tumor Targeting 1 : 177 頁 (1995 年) には、RNアーゼ部分を有する抗体 - 毒素融合タンパク質が記載されており、一方で、Linardou ら、Cell Biophys. 24 - 25 : 243 頁 (1994 年) は、DNアーゼ I 成分を含む、抗体 - 毒素融合タンパク質を製造した。ゲロニンは、Wang ら、第 09 回 ACS National Meeting、Anaheim、Calif.、1995 年 4 月 2 ~ 6 日パート 1、BIOT005 の要約の抗体 - 毒素融合タンパク質中の毒素部分として用いられることが多かった。さらなる例として、Dohlstens ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91 : 8945 頁 (1994 年) では、ブドウ球菌内毒素 - A を含む抗体 - 毒素融合タンパク質が報告された。
10

【0320】

このようなコンジュゲートの調製において適宜用いられる毒素の例として、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、DNアーゼ I、ブドウ球菌内毒素 - A、ブタクサ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒、シュードモナス外毒素およびシュードモナス内毒素がある。例えば、Pastan ら、Cell 47 : 641 頁 (1986 年) および Goldenberg, CA - A Cancer Journal for Clinicians 44 : 43 頁 (1994 年) 参照のこと。その他の適した毒素は、当業者に知られている。

【0321】

抗体を、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法薬、WO 81 / 01145 参照のこと）を活性抗癌剤に変換するプロドラッグ活性化酵素とコンジュゲートすることによって、本発明の抗体を ADEPT において用いることができる。例えば、WO 88 / 07378 および米国特許第 4,975,278 号参照のこと。
20

【0322】

ADEPT に有用な免疫複合体の酵素成分として、より活性な細胞傷害性の形に変換するような方法でプロドラッグを活性化できる任意の酵素が挙げられる。

【0323】

本発明の方法において有用な酵素として、それだけには限らないが、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；硫酸含有プロドラッグを遊離薬物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；セラチアプロテアーゼ、などのプロテアーゼが挙げられる。サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用であるカテプシン（例えば、カテプシン B および L）；D - アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するのに有用な D - アラニルカルボキシペプチダーゼ；L - ガラクトシダーゼおよびグリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；D - ラクタムを用いて誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用な D - ラクタマーゼ；およびペニシリニアミダーゼ、例えば、そのアミン窒素で、それぞれ、フェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基を用いて誘導体化されている薬物を、遊離薬物に変換するのに有用なペニシリン V アミダーゼまたはペニシリン G アミダーゼが挙げられる。あるいは、抗体酵素としても当技術分野で知られる、酵素活性を有する抗体を用いて、本発明のプロドラッグを遊離活性薬物に変換できる（例えば、Massé
30

y、Nature 328: 457~458頁(1987年)参照のこと)。腫瘍細胞集団への抗体酵素の送達のために、抗体-抗体酵素コンジュゲートを本明細書に記載されるとおり調製できる。

【0324】

本発明の酵素は、当技術分野で周知の技術、例えば、上記で論じられたヘテロ二官能性架橋試薬の使用によって共有結合によって結合させることができる。あるいは、少なくとも本発明の酵素の機能的に活性な部分と連結している少なくとも本発明の抗体の抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当技術分野で周知の組換えDNA技術を用いて構築できる(例えば、Neuberg erら、Nature 312: 604~608頁(1984年)参照のこと)。

10

【0325】

非治療的使用

本発明の抗体を、標的抗原に対する、または表t系抗原についての診断アッセイ、例えば、特定の細胞、組織または血清におけるその発現の検出においてアフィニティー精製剤として使用できる。抗体はまた、診断アッセイにおいて使用できる。一般に、これらの目的上、抗体は、放射性核種(例えば、¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、¹²⁵I、³H、³²Pまたは³⁵S)で標識され、その結果、イムノシンチオグラフィー(immunoscintigraphy)を用いて腫瘍を局在化できる。

【0326】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、例えば、ELISAおよび免疫沈降アッセイなどの任意の既知アッセイ法において使用できる。Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、147~158頁(CRC Press, Inc. 1987年)。抗体はまた、免疫組織化学のために、当技術分野で公知の方法を用いて腫瘍サンプルを標識するために使用できる。

20

【0327】

便宜上、本発明の抗体はキット、すなわち、パッケージ化された、所定量の試薬の組み合わせおよび診断アッセイを実施するための使用説明書において提供され得る。抗体が酵素で標識されている場合には、キットは、基質および酵素によって必要とされる補助因子(例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアを提供する基質前駆体)を含む。さらに、安定化剤、バッファー(例えば、ブロックバッファーまたは溶解バッファー)などといったその他の添加剤も含まれ得る。アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度を提供するための種々の試薬の相対量は大きく変わり得る。特に、試薬は、通常、凍結乾燥された乾燥粉末、例えば、溶解すると適当な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤として提供され得る。

30

【0328】

本発明は、以下の実施例によって例示されるが、これは決して制限であるよう意図されるものではない。

【実施例】

【0329】

(実施例1)

40

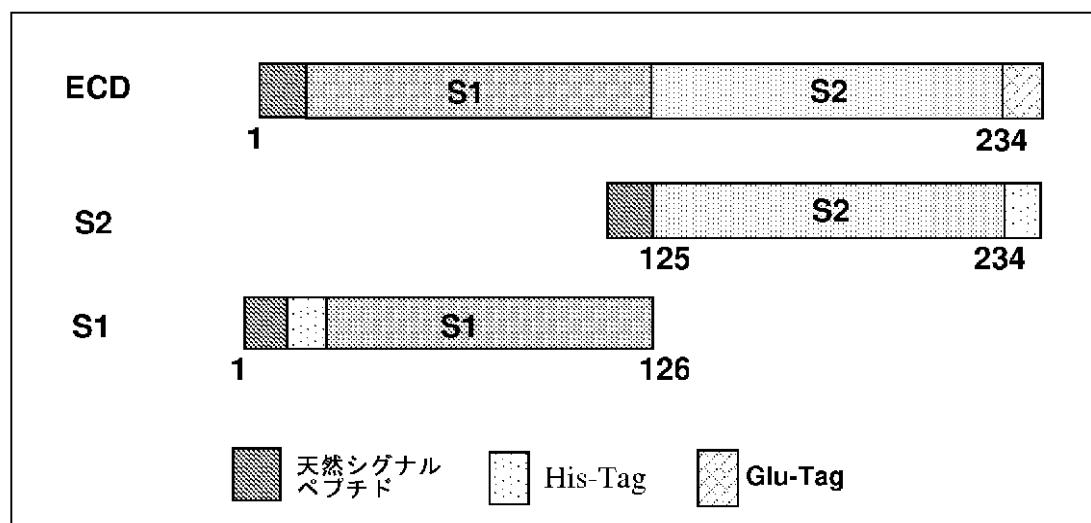
PRLRのECD、S1およびS2ドメイン断片の調製

PRLRの細胞外ドメイン(ECD、配列番号2のアミノ酸25~234)、S1ドメイン(配列番号2のアミノ酸25~125)およびS2ドメイン(配列番号2のアミノ酸126~234)に相当するPRLRの断片の組換え発現および精製を、以下のように実施した。ECD、S1およびS2の昆虫発現のための発現構築物を、表2に示されるように設計し、プライマーは、断片をそれぞれのアミノ酸配列に基づいてクローニングするために設計した(表3に示されるとおり)。

【0330】

【表2】

表 2



【0331】

【表3】

表 3

20

30

40

ドメイン	用いたPCRプライマー (F=フォワード; R=リバース)	PCR プライマー配列
ECD	F1 配列番号 3	GGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGA TATACATATGAAGGAAAATGTGGCATCTGCAA
	R1 配列番号 4	GGGACCACTTGTACAGAAAGCTGGTTAACGCTCCGTG ATGGTGTGGTGATGTGCTCCATCATTGATGGTGAAGTC
S1	F2 配列番号 5	GGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAGGAGATAGA ACCATG
	F3 配列番号 6	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAATGTGGCAT CTGCAACC
	F4 配列番号 7	GAAGGAAAATGTGGCATCTGCAACCCTTTCACTCTGCTACTT TTTCTC
	F5 配列番号 8	CGTTTCACTCTGCTACTTTTCTCAACACCTGCCTCTGAATG GAGGAG
	F6 配列番号 9	CAACACCTGCCTCTGAATGGAGGAGCACATCACCATCACCAT CACGGAG
	F7 配列番号 10	CACATCACCATCACCATCACGGAGCTCAGTTACCTCCTGGAAA ACCTGAG
	R2 配列番号 11	GGGACCACTTGTACAGAAAGCTGGTTCACTGAACATGTAAGTC ACGTCCAC
S2	F8 配列番号 12	GGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAGGAGATAGA ACCATG
	F9 配列番号 13	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAATGTGGCAT CTGCAACC
	F10 配列番号 14	GAAGGAAAATGTGGCATCTGCAACCCTTTCACTCTGCTACTT TTTCTC
	F11 配列番号 15	CGTTTCACTCTGCTACTTTTCTCAACACCTGCCTCTGAATG TTCA
	F12 配列番号 16	TCTCAACACCTGCCTCTGAATGTTCAGGCCAGACCCCTCCTTGG AGCTG
	R3 配列番号 17	CGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCATCATTGATGGTGAAGTC ACTAGG
	R4 配列番号 18	CAAGAAAGCTGGTTAACGCTCCGTGATGGTGAAGGTGATGTG CTCC
	R5 配列番号 19	GGGACCACTTGTACAGAAAGCTGGTTAACGCTCC

S1およびS2ドメインをクローニングするために、ネステッドPCRアプローチを採用してタグを組み込み、3' / 5'領域を設計した。S1には、クローニングのための6

50

種のフォワードネステッドプライマーおよび1種のリバースプライマーがある。S2には、クローニングのための5種のフォワードネステッドプライマーおよび3種のリバースプライマーがある。

【0332】

PCR増幅は、PfuUltra (商標) Hotstart PCR Master Mix (Stratagene)を、製造業者の推奨に従って実施した。増幅に用いられる鑄型は、pDEST3218においてクローニングされたPRLRECD断片である(データは示されていない)。ECD PCR産物は、トポイソメラーゼクローニング戦略を用いてBlueBac4.5/V5-His TOPO-TA (Invitrogen)にクローニングする。S1およびS2 PCR産物は、Gateway Technology (Invitrogen)を用いて社内で適応させたpAcMP3にクローニングする。最終選択クローンは、二本鎖配列決定によって確認した。昆虫トランスフェクションのために10~20μgのDNAを調製した。

10

【0333】

以下のように、昆虫細胞において、組換え構築物を用いてそれぞれのPRLR断片を発現させた。バキュロウイルスは、Sapphire (商標) ゲノムオートグラファ・カリフォルニカ (Autographa californica) DNAとの、PRLRの細胞外ドメインをコードするプラスミドDNAの同時トランスフェクションのブラーク精製によって単離した。組換えウイルスは増幅し、これを用いて、10L (可動範囲) ウェーブバイオリアクター中、1mlあたり $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 個細胞の範囲の密度、2~10の感染効率範囲でTn5昆虫細胞感染させた。48時間感染させた後、細胞および上清を回収、遠心分離し、上清を濃縮のために調製した。上清を0.45μm中空糸カートリッジで清澄化し、その後、接線流10kDa MWカットオフメンプランを用いて5×濃縮した。タンパク質精製の前に、まず、上清を濾過滅菌した、w/1L、0.2μm孔真空フラスコ。

20

【0334】

S1断片が精製の前に濃縮されておらず、S2断片が5kDa MWカートリッジで濃縮されたという点を除いて、同様の方法を用いて、昆虫細胞においてS1およびS2ドメインを発現させた。

30

【0335】

PRLR断片は以下のとおり精製した。発現されたPRLRECDまたはサブドメインを含有する昆虫細胞 - 培養上清を、そのままのまたは積層メンプランカセット装置 (Pall Filtron)を、1または5kD名目分子量カットオフを用いて最大10×濃縮された発現群から回収した。実用的な場合は、上清を0.2ミクロンフィルターを通して濾過した。上清を、PBSで平衡化したカラム上に直接乗せた。

【0336】

Hisタグがついているタンパク質を、1-または5-mL HisTrapカラム (GE Healthcare)で、製造業者の推奨する流速で精製した。Gluタグがついているタンパク質は、以下のとおり、固定化された抗gluモノクローナル抗体カラムで精製した: 3~10mg/mLの濃度の、PBS中の精製した抗gluモノクローナル抗体を、Affigel 10 (Bio-Rad)、n-ヒドロキシスクシンイミドによって活性化されたアガロースゲルに、製造業者の使用説明書によってコンジュゲートした。抗gluアガロースは、XK16カラム (GE Healthcare)に詰め、15~30cm/時の線流速で流した。

40

【0337】

HisTrapカラムのタンパク質の溶出は、バッファーA (PBS)からバッファーB (PBS+0.25Mイミダゾール (IX-0005, EM Merck) pH 7.4)への20カラム容積勾配溶出によってとした。抗gluカラムからのタンパク質の溶出は、Glu-Gluエピトープと競合する0.1mg/mLのペプチド EYMPTDを含有するPBSによってとした。画分を、SDS-PAGEおよびウェスタンプロットまた

50

は質量分析によって調べ、適切にプールする。

【0338】

プールされた P R L R E C D またはサブドメインを、 P B S 中で平衡化され、 2 . 5 m L / 分で流される Superdex 75 26 / 60 カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。わずか 10 m L をこれらのカラムに乗せた。画分は、 S D S - P A G E によって調べ、適切にプールした。

【0339】

(実施例 2)

ヒト抗体ファージディスプレイライブラーからの標的特異的抗体の単離

10

ヒト P R L R の活性を中和できる抗体のパネルを単離するために、 s c F v 断片を発現する、 3 種のヒト抗体ファージディスプレイライブラーを、並行して調べた。ライブラー パーニングに用いた標的は、実施例 1 において上記で記載したように調製したプロラクチン受容体の可溶性細胞外ドメイン (E C D) (ヒトプロラクチン受容体アミノ酸 25 ~ 234)とした。受容体をビオチン化し (N H S - L C ビオチン、 P i e r c e) 、ビオチン化 E C D で可溶性 パーニングを実施した。

【0340】

ファージディスプレイからの標的特異的抗体の選択を、 M a r k s ら (M e t h o d s M o l B i o l . 2 4 8 : 1 6 1 ~ 7 6 頁、 2 0 0 4 年) によって記載される方法に従って実施した。手短には、ファージディスプレイライブラーを、 5 0 p m o l s のビオチン化 E C D とともに室温で 1 時間インキュベートし、次いで、形成された複合体を、 1 0 0 μ l のストレプトアビジンビーズ懸濁液 (D y n a b e a d s (登録商標) M - 2 8 0 ストレプトアビジン、 I n v i t r o g e n) を用いて獲得した。洗浄バッファー (P B S + 5 % ミルク) でビーズを洗浄することによって非特異的ファージを除去した。結合しているファージを、 0 . 5 m l の 1 0 0 n M トリエチルアミン (T E A) を用いて溶出し、等容積の 1 M T R I S - C l p H 7 . 4 を加えることによって直ちに中和した。溶出されたファージプールを用いて、対数増殖期の増殖している T G 1 大腸菌細胞に感染させ、ファージミドを記載されるように救出した (M e t h o d s M o l B i o l . 2 4 8 : 1 6 1 ~ 7 6 頁、 2 0 0 4 年) 。選択は、 3 ラウンドのすべてについて反復した。 パーニングの 3 回目のラウンドから溶出されたファージに感染した T g 1 細胞から得られたシングルコロニーを、 E L I S A アッセイにおいて結合活性についてスクリーニングした。手短には、溶出されたファージに感染した T G 1 細胞から得られたシングルコロニーを用いて、 9 6 ウェルプレート中の培地に播種した。マイクロカルチャーを、 O D ₆₀₀ = 0 . 6 に増殖させ、その時点で、 1 m M I P T G を添加し、 3 0 のシェーカーインキュベーターで一晩培養することによって、可溶性抗体断片の発現を誘導した。細菌を遠心沈殿させ、原形質周辺の抽出物を調製し、これを用い、マイクロプレート製造業者によって提供される標準 E L I S A プロトコールに従って、 9 6 ウェルマイクロプレート (9 6 ウェル平底 I mm u n o s o r b プレート、 N u n c) 上に固定された E C D に対する抗体結合活性を検出した。

20

【0341】

組換え細胞外ドメイン (E C D) との結合についての、抗プロラクチン受容体 (P R L R) 抗体の親和性を、 B i a c o r e (登録商標) 2 0 0 0 を用いて推定し、抗体の親和性ランキングのために用いた。ヒト s c F v - F c 融合物には、プロテイン A / G 捕獲表面を用い、ハイブリドーマによって產生された抗体にはウサギ抗マウス I g G - F c (R A M - F c) 抗体捕獲表面を用いた。プロテイン A / G および R A M - F c 捕獲チップは両方とも、最大レベルの捕獲分子 (プロテイン A / G または R A M - F c のいずれか) が、 B i a c o r e (登録商標) I n c . から推奨されるプロトコールにしたがって、標準 E D C - N H S アミンカップリング化学によって 4 つのフローセル上に固定化されている C M 5 センサーチップであった。ランニングバッファーは、 H B S - E P (B i a c o r e (登録商標) , I n c .) とし、温度は 2 5 ℃ に設定し、流速は、最初 1 0 μ L / 分と

30

40

50

した。精製された抗体を、1～3 μg / mLの間の適当な濃度に、HBS-EPに希釈し、1～2分間、捕獲チップ上に注入した。流速は、25～30 μL / 分に増大させた。PRLRの組換えECDは、1 μg / mLに希釈し、5～6分間注入し、10分解離させた。

【0342】

BIA Evaluationソフトウェアを用いてフィットを実施し、動力学的結合および解離速度定数（それぞれ、 k_{on} および k_{off} ）を算出するために用いた。物質移行補正を用いる1：1ラングミュア相互作用モデルを用いて、各サンプルで同時 k_a / k_d フィットを実施した。いくつかのサンプルを、同時にフィットし、 R_{max} 、 k_{on} および k_{off} パラメータをフィットローカルに設定した。ベースラインドリフトが生じた場合には、ドリフトするベースラインモデルを用い、ドリフト値を定数に設定し、手作業で入力した。ドリフト値は-0.03～+0.05RU / 秒に変化した。
10

【0343】

抗体結合はまた、蛍光活性化細胞ソーティング（Fluorescent Activated Cell Sorting）（FACS）分析および蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術（Fluorometric Microvolume Assay Technology）（FMAT）を用いて、プロラクチン受容体発現細胞との結合を測定することによって評価した（Swartzmanら、Anal Biochem. 271 : 143～51頁、1999年）。FACSまたはFMATアッセイのいずれかによって結合を示したクローニングを、配列分析し、独特の重鎖CDR3および軽鎖CDR3タンパク質配列をコードするクローニングを、以下の実施例3に記載されるように、scFv-Fcに再編成した。これらのscFv-Fcを、以下の実施例5および6に記載されるように、PRLR誘導性ERK1/2リン酸化およびBaF3/PRLR細胞株のPRLR誘導性増殖を阻害する能力について試験した。実施例7に記載されるように、選択された抗体を、ECD、S1およびS2との結合について、ならびにPRLR-ECDとの結合についての抗体対間の相対的競合についてさらに特性決定した。選択された抗体のデータは、以下の表4に示されている。
20

【0344】

【表4】

表 4

抗体	pERK1/2 阻害 IC50	BaF3/PRLR の増殖阻害 IC50	親和性または 平衡解離定数 K_D (nM)	ドメイン特性	エピトープ結 合(同一結合 中の抗体は、 P R L Rとの 結合について 競合する)
XPA.06.158	0.01	0.06	0.7	S1	4.5
XPA.06.167	0.04	0.14	4	S1	3.8
XPA.06.178	0.09	0.23	20	S1	3.8
XPA.06.145	0.30	0.77	10	S1	4
XPA.06.217	0.35	1.18	7	S1	7
XHA.06.983	0.11	0.1	0.1	S?	6
XHA.06.189	0.2	0.15	<0.1	S1	3.8
XHA.06.275	0.5	1.31	0.4	S2	5
XHA.06.567	0.65	7.06	0.8	S2	6.5

(実施例3)

s c F v - F c 形式へのクローンの再編成

実施例2において同定された独特のs c F v クローン各々について、ファージディスプレイベクターから、s c F v 断片をコードするc DNAをPCRによって増幅し、XOMAの専売発現ベクターの改変である哺乳類発現ベクター（カッパ（ ）、ラムダ（ ）またはガンマ-2（ 2 ）定常領域遺伝子のいずれかをコードする、WO2004/033693に記載される）中にライゲーションし、s c F v - F c タンパク質での各抗体の発現を可能にし、これではタンパク質のF c 部分は、IgG1分子のCH2およびCH3ドメインに相当する。s c F v - F c 融合タンパク質の構築は、当技術分野では周知であり、例えば、Fredericksら、Protein Eng Des Sel 2004年1月；17(1)：95～106頁、Powersら、J Immunol Methods 2001年5月1日；251(1-2)：123～35頁またはShuら、Proc Natl Acad Sci USA 1993年、90、7995～7998頁参照のこと。米国特許第5,892,019号にも、F c 融合タンパク質ベクターの構築およびs c F v - F c 融合タンパク質の発現が記載されている。

【0345】

融合タンパク質の発現は、リポフェクタミン2000 (Invitrogen)での、製造業者の使用説明書を用いる、293E懸濁細胞のトランスフェクションによって実施される。5日後、細胞を遠心分離によって除去し、プロテインAセファロース (GE Health care) を用い、製造業者によって示唆されるプロトコールを用いて上清からs c F v - F c 融合物を精製する。

【0346】

(実施例4)

マウスハイブリドーマによって分泌される標的特異的抗体の同定

10

20

30

40

50

ヒトプロラクチン受容体（P R L R）の細胞外ドメイン（E C D）に対するマウス抗体を、以下のとおり作製した。6匹のB a l b / C マウスを、組換えP R L R 細胞外ドメイン（上記）を用い、皮下注射によって免疫化した。マウスには28日間かけて10回の注射を施した。最後の注射の4日後、マウスを屠殺し、流入領域リンパ節を採取した。リンパ節由来の細胞を懸濁した後、それらを、B T X E C M 2 0 0 1 E l e c t r o - C e l l M a n i p u l a t o r (H a r v a r d A p p a r a t u s) を用いて電気的細胞融合によってマウス骨髄腫細胞株P 3 x A g 8 . 6 5 3と融合した。

【0347】

融合後、細胞を約40の96ウェルプレートにプレーティングした。12日後、組換えE C Dおよびに対してE L I S Aによって、およびF M A Tにおいて、これらのプレートをスクリーニングした。F M A T アッセイでは、高レベルのP R L R 受容体を発現するよう安定にトランスフェクトされたC H O 細胞株を用いた。

10

【0348】

選択されたハイブリドーマを、以下の実施例5および6に記載されるように、P R L R 誘導性E R K 1 / 2 リン酸化およびB a F 3 / P R L R 細胞株のP R L R 誘導性増殖を阻害する能力について試験した。実施例7に記載されるように、選択された抗体を、組換えE C D、S 1 およびS 2との結合について、ならびにP R L R E C Dとの結合についての抗体対間の相対的競合についてさらに特性決定した。選択された抗体のデータは、表4において上記で示されている。

20

【0349】

(実施例5)

E R K 1 / 2 リン酸化に対する抗体効果の決定

5時間の血清飢餓後、T 4 7 D 細胞を、マイクロタイタープレート中、完全増殖培地に37で24時間播種する。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）で2回洗浄し、0.1% B S A を含有する血清不含培地で希釈した抗体とともに、37で30分間インキュベートした。抗体の最終出発濃度は、40 μ g / m l とした。培地を除去し、0.1% B S A を含有する血清不含培地で希釈したプロラクチンを30 n g / m l の最終濃度に加えた。細胞を、プロラクチンとともに37で30分間インキュベートし、続いて、氷冷P B S で2回洗浄した。洗浄剤、キレートならびに種々のプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含有する標準溶解バッファーを加えて細胞溶解物を作製した。リン酸化E R K 1 / 2 (p E R K 1 / 2) のレベルを、標準E L I S A を、D U O S E T (登録商標) I C Phospho - E R K 1 / E R K 2 、R & D Systems , Inc. の使用説明書に従って用いて測定した。代表的なアッセイの結果が図2、3および4に示されており、選択された抗体のアッセイの結果が上記表4に示されている。

30

【0350】

図7A ~ 7Cは、p E R K アッセイにおいて80%より高い阻害を有していた抗体のV H およびV L アミノ酸配列を示す。

【0351】

(実施例6)

P R L 応答性細胞株の増殖に対する抗体効果の決定

40

B a F 3 / P R L R 細胞を、全長ヒトP R L R およびネオマイシンカセットを含む発現ベクターを用いてマウスプロB細胞株B a F 3 をエレクトロポレーションすることによって作製した。細胞は、G 4 1 8 (1 m g / m l) およびr m I L - 3 (10 n g / m l) を補給した培地で7日間選択し、G 4 1 8 またはI L - 3 を含まないr h P R L (1 μ g / m l) における7日の選択期間を続けた。14日間にわたって、培地P R L 濃度は、50 n g / m l の維持レベルに達するまで、段階的に低下した。実験当日に、1 × 1 0 4 個細胞を、平底96ウェルプレートの各ウェルに播種した。50 n g / m l r h P R L を含むか含まないウェルに、10 μ g / m l の濃度の抗体(s c F v - F c 融合形式の)を加えた。プレートを48時間インキュベートし、C e l l T i t e r G l o 試薬を用いて分析した。サンプルを3連で実施し、P R L の不在下で抗体によって誘導される細胞増殖

50

によってアゴニズムを評価したのに対し、アンタゴニズムは、PRLの存在下での細胞増殖によって調べた。選択された抗体についての、この増殖アッセイの結果は、上記表4に示されている。

【0352】

PRL誘導性増殖および抗PRLR抗体による増殖の阻害を分析するために、T47DまたはMCF7-NCI細胞を、1mlの通常増殖培地（フェノールレッド不含 RPMI / 10% FCS）あたり 1×10^6 個細胞の密度で、T75フラスコ（12ml総容積）に分けた。分割の72時間後、細胞をトリプシン処理し、計数し、平底96ウェルプレートのウェルあたり5K（T47D）またはウェルあたり20K（MCF7）の密度で播種した（ウェルあたり $100\mu l$ ）。MCF7細胞は、血清不含およびフェノールレッド不含 RPMIに播種し、T47D細胞は、血清不含 RPMIまたは10%チャコール・ストリップド（charcoal-stripped）血清を含有するRPMIのいずれかに播種した。播種の24時間後、ウェルにPRLおよび抗PRLR抗体を加えた（ $50\mu l$ 、 $3 \times$ 濃縮された）。72時間インキュベーションした後、プレートに ${}^3[H]$ チミジン（ウェルあたり $1\mu Ci$ ）を、37°のインキュベーター中、最小で6時間加えた。トリプシンおよびTomtec 96ウェルプレート細胞収穫器を用いて細胞を回収した。次いで、フィルターを、Triplexルミノメーターに移し、分析した（1分カウント）。図5における増殖研究の結果は、scfvが、増殖におけるプロラクチン媒介性増大を阻害することを示す。

10

20

30

40

50

【0353】

（実施例7）

BIA COREによる結合親和性および競合の測定

上記実施例2において記載されるように、BIA CORE分析を反復して、選択された抗体の、上記のPRLRのECD、S1およびS2ドメインとの相対結合を調べた。ただし、S1、S2またはECDタンパク質は、 $10\mu g/ml$ で、 $15\mu L/min$ で2分間注入した。このアッセイから得られたデータを、Bia core（登録書評）コントロールソフトウェアによって報告点（レゾナンスユニット（RU））として集め、結合している抗原の量を、捕獲された抗体の量で除すことによって正規化した。データは、以下の表5に示されている。

【0354】

【表5】

表 5. 正規化された、抗PRLR抗体によるS1、S2およびECD結合

サンプル	結合したPRLR断片（結合しているRU ／捕獲されたRU Ab）		
	S1	S2	ECD
XPA.06.145	3.0%	-0.8%	4.8%
XPA.06.158	20.5%	0.1%	28.2%
XPA.06.167	23.7%	0.1%	35.0%
XPA.06.178	16.4%	0.0%	20.5%
XPA.06.217	19.4%	0.4%	25.8%
XHA.06.567	0.9%	16.7%	31.1%
XHA.06.983	-2.2%	-2.5%	27.4%
XHA.06.275	0.0%	13.4%	26.2%
XHA.06.189	16.9%	0.2%	31.6%

精製抗体の親和性は、Bia core（登録商標）2000で一連の注入を実施することによって調べた。生じた親和性および速度定数は、HBS-EPバッファー系において25°でプロラクチン受容体（PRLR）の組換え細胞外ドメイン（ECD）と結合するこれらの抗体に対して関連がある。約5000~1000RUのプロテインA/Gを含むCM5センサーチップを、標準EDC-NHSアミンカップリング化学によって、Bia

core(登録商標) Inc.から推奨されるプロトコールに従って調製し、抗体を捕獲するのに用いた。精製抗体を、捕獲のためにHBS-EPバッファー中、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。250~400RUの間の抗体捕獲を与えるのに必要とされる注入時間を調べた。抗体を $10\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で、捕獲レベル最適化の結果に応じて1.5~3分間注入することによって、動態解析のための抗体の捕獲を実施した。

【0355】

動態解析には、流速は、 $40\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ に設定した。 148 nM ($4\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)または 37 nM ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)のいずれかからの1:3段階希釈でPRLR-ECDFの5種の濃度を調製した。各濃度およびバッファー対照(ゼロ濃度)を、2連で注入した。データセットは参照される2つであり、1:1ラングミュア結合相互作用モデルを用いて全体的にフィットした。この同じ分析を、IgG1およびIgG2構築物の両方についてのXPA.06.167のIgG再編成された構築物についても実施した。

10

【0356】

選択された抗体の、PRLRのECDFとの結合の速度定数および親和性は、以下の表6に示されている。

【0357】

【表6】

表6. 親和性分析結果

抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
XPA.06.131	3.4E+04	7.3E-05	2.1E-09
XPA.06.158	1.1E+05	7.3E-05	7.0E-10
XPA.06.141	6.3E+04	5.3E-04	8.4E-09
XPA.06.147	5.5E+05	5.3E-03	9.8E-09
XPA.06.167 IgG1	2.3E+05	6.0E-04	2.6E-09
XPA.06.167 IgG2	2.1E+05	5.72E-04	2.7E-09

20

同様の手順を用いて、さらなる抗体の速度定数および親和性を調べた(以下の表7に要約される)。

【0358】

【表7】

30

表 7

	kon	koff	KD
XHA.06.642	9.2E+05	8.6E-04	934 pM
XHA.06.275	1.0E+06	3.4E-04	337 pM
XHA.06.983	7.3E+05	3.2E-04	43 pM
	kon	koff	KD
chXHA.06.642	6.5E+04	5.2E-04	801 pM
chXHA.06.275	1.1E+06	2.2E-04	196 pM
chXHA.06.983	2.4E+05	1.0E-05	42 pM

40

PRLRとの結合についての抗体対間の相対競合または干渉(例えば、対合分析)を、連続競合アッセイ戦略において以下のように調べた。このアプローチでは、1種の抗体が

50

センサーチップ上に、直接または捕獲剤を介して固定化されており、ECDが固定化された抗体上に注入されるとECDの結合が可能となる。必要な場合には、高濃度の無関係なIgG（例えば、ウサギ抗マウスIgG捕獲表面を用いて2種のマウス抗体を試験する場合に）を注入することによって、過剰の捕獲剤がブロックされる。続いて、競合について試験される抗体が注入され、第1の抗体によって捕獲されたECDと結合するその能力が調べられる。2種の抗体が、ECD上の空間的に分離されたエピトープと結合する場合には、第2の抗体はECD／第1の抗体複合体と結合できなくてはならない。2種の抗体が干渉または競合する場合には、第2の抗体は、ECD／第1の抗体複合体と同様には、または全く結合できない。この競合分析の結果は、上記表4に示されている（2種の抗体が同一エピトープビン数を有する場合には、ECDとの結合について互いに競合し、その他のビンに由来する抗体に対して同一の競合パターンを示す）。本発明は、本明細書に記載されるビン中の任意の抗体と同一のPRLRのエピトープと結合する、またはRPLR ECDとの結合について、このような抗体と競合するその他の抗体の同定を具体的に考慮する。

10

【0359】

(実施例8)

ウェスタンプロットによるPRL誘導性PRLR、STAT5&AKTリン酸化に対する効果

選択された抗体の、STAT5およびAKTのPRL誘導性リン酸化を阻害する能力を、以下のとおり調べた。細胞を、6ウェルプレートにおいて、 3×10^5 個細胞/m²の密度でフェノールレッド不含RPMI/10%FBSに一晩播種した。翌日、培地を血清不含RPMIと30分間交換した。いくつかの実験では、抗PRLRまたは非特異的対照抗体を、この血清飢餓期間の間、細胞とともにインキュベートした。次いで、ウェルに50ng/m²のPRLを30分間加え、その後、細胞をPBSで1回すすぎ、50mM Tris-HCl、pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na3Ov4、50mM NaF、0.25%デオキシコレートおよびプロテアーゼ阻害剤からなるバッファーに溶解した。試験管を、冷蔵した微量遠心管において14,000rpmで沈降させ、BCA試薬を用いて溶解物を定量化した。30μgの全細胞溶解物を、10%SDS-PAGEによって分離し、STAT5A/B(Y694/Y699、Upstate)またはPRLR(Y546/Y611、社内)およびECLに対するホスホ特異的抗体を用いてタンパク質を検出した。購STAT5(BD)またはPRLR(Zymed)またはAKT(Cell Signaling)に特異的な抗体を用いて染色することによって同等タンパク質ローディングを調べた。PRLR細胞内リン酸化に対するPRLR特異的抗体の効果の代表的なアッセイの結果が図6に示されている。

20

30

30

【0360】

(実施例9)

マウス抗体のヒト化

この実施例は、マウス抗PRLR抗体のヒト化の手順を示す。

40

【0361】

ヒト化PRLR抗体軽鎖および重鎖の遺伝子の設計

マウス抗体XHA.06.983、XHA.06.275およびXHA.06.642のVLおよびVHアミノ酸配列は、図10に示されている。National Biomedical Foundation Protein Identification

Resourceまたは同様のデータベースを用いて同定されたヒト抗体の配列を用いて、ヒト化抗体のフレームワークを提供する。ヒト化重鎖の配列を選択するためには、マウス重鎖配列がヒト抗体重鎖の配列とアラインされる。各位置で、その位置が、以下に定義される4つのカテゴリーのうちのいずれか1つに入らない限り、ヒト化配列にヒト抗体アミノ酸が選択され、その場合には、マウスアミノ酸が選択される：

(1) 位置が、Kabat、J. Immunol.、125、961～969頁(19)

50

80年)によって定義される相補性決定領域(CDR)範囲内に入る;

(2)ヒト抗体アミノ酸が、ヒト重鎖にとってその位置で稀であるが、マウスアミノ酸はヒト重鎖にとってその位置でよくあるものである;

(3)位置が、マウス重鎖のアミノ酸配列においてCDRのすぐ隣であるか;

(4)マウス抗体の三次元モデリングが、アミノ酸が抗原結合領域と物理的に引接していることを示唆する。

【0362】

ヒト化軽鎖の配列を選択するためには、マウス軽鎖配列がヒト抗体軽鎖の配列とアラインされる。各位置で、その位置が、上記カテゴリーのうちの1つに再度入らない限り、ヒト化配列にヒト抗体アミノ酸が選択され、以下に反復される:

10

(1)CDR;

(2)マウスアミノ酸が、ヒト抗体よりも標準的;

(3)CDRに隣接する;または

(4)結合領域に近い3次元の可能性

重鎖および軽鎖遺伝子の実際のヌクレオチド配列は、以下のように選択される:

(1)上記のように選択されたアミノ酸配列のヌクレオチド配列コード;

(2)これらのコード配列の5'、ヌクレオチド配列はリーダー(シグナル)配列をコードする。これらのリーダー配列は、抗体の典型的なものとして選択された;

(3)コード配列の3'、ヌクレオチド配列は、マウス配列の一部である、マウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J2セグメントに続く配列である。これらの配列は、それらがスプライスドナーシグナルを含むので含まれ;

(4)各末端で配列にXba I部位があり、これがXba I部位で切断することおよびベクターのXba I部位にクローニングすることを可能にする。

20

【0363】

ヒト化軽鎖および重鎖遺伝子の構築

重鎖を合成するためには、Applied Biosystems 380B DNAシンセサイザーを用いて4種のオリゴヌクレオチドを合成する。オリゴヌクレオチドのうち2種は、重鎖の各鎖の一部であり、各オリゴヌクレオチドは、アニーリングが可能となるよう次のものと約20ヌクレオチド重複している。合わせて、オリゴヌクレオチドは全ヒト化重鎖可変領域および、Xba I部位での切断を可能にする各末端のいくつかの余分のヌクレオチドに及ぶ。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲルから精製する。

30

【0364】

各オリゴヌクレオチドを、ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用い、標準手順(Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989年))によってリン酸化する。リン酸化されたオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、40μlのTA(33mM 酢酸Tris、pH7.9、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム)に、各約3.75μMの濃度で一緒に懸濁し、95℃に4分間加熱し、4℃にゆっくりと冷却する。各オリゴヌクレオチドの逆ストランドを合成することによって、オリゴヌクレオチドから完全遺伝子を合成するために、以下の成分を加え、100μlの最終容積にする:

40

10μl アニーリングされたオリゴヌクレオチド

0.16mM 各デオキシリボヌクレオチド

0.5mM ATP

0.5mM DTT

100μg/ml BSA

3.5μg/ml T4g43タンパク質(DNAポリメラーゼ)

25μg/ml T4g44/62タンパク質(ポリメラーゼアクセサリータンパク質)

50

)

25 µg / ml 45 タンパク質（ポリメラーゼアクセサリータンパク質）。

【0365】

混合物を37で30分間インキュベートする。次いで、10uのT4DNAリガーゼを加え、37でのインキュベーションを30分間再開する。反応物を70で15分間インキュベーションすることによってポリメラーゼおよびリガーゼを不活性化した。遺伝子をXba Iで消化するために、反応物に、50µlの、200µg / mlのBSAおよび1mMのDTTを含有する2×TA、43µlの水および5µl中、50uのXba Iを加える。反応物を37で3時間インキュベートし、次いで、ゲルで精製する。標準法によって、Xba I断片をゲルから精製し、プラスミドpUC19のXba I部位にクローニングする。プラスミドは、標準技術を用いて精製し、ジデオキシ法を用いて配列決定する。

10

【0366】

ヒト化軽鎖および重鎖を発現するようプラスミドを構築することは、挿入されているpUC19プラスミドから軽鎖および重鎖Xba I断片を単離することと、次いで、それを、適当な発現ベクターのXba I部位に挿入し、これが、適当な宿主細胞にトランスフェクトされた場合に、高レベルの完全重鎖を発現することによって達成される。

【0367】

ヒト化抗体の合成および親和性

マウスS p 2 / 0細胞に発現ベクターをトランスフェクトし、プラスミドを組み込む細胞を、標準法によって発現ベクターによって付与される選択マーカーに基づいて選択する。これらの細胞が、PRLRと結合する抗体を分泌したことを確認するために、細胞から得た上清を、過剰のPRLRを発現することがわかっている細胞とともにインキュベートする。洗浄後、細胞を、フルオレセインコンジュゲートヤギ抗ヒト抗体とともにインキュベートし、洗浄し、FACSCANサイトフルオロメーターで分析した。

20

【0368】

ヒト化抗体を産生する細胞をin vitroで培養する。ヒト化抗体は、細胞上清から、標準技術に従って、プロテインAのアフィニティカラム（Pro - Chem Inc.、Littleton、MAまたは同等物）を通すことによって、実質的な均一性まで精製する。元のマウス抗体と比較したヒト化抗体の親和性を、当技術分野で公知の技術にしたがって調べる。

30

【0369】

（実施例10）

マウス抗体のHuman Engineered（商標）

この実施例は、Human Engineered（商標）抗体のクローニングおよび発現ならびにこのような抗体の精製および結合活性についての試験を記載する。

【0370】

Human Engineered（商標）配列のデザイン

抗体可変ドメインのHuman Engineering（商標）は、抗体分子の結合活性を維持しながら免疫原性を低減する方法として、Studnickaによって記載されている[例えば、Studnickaら米国特許第5,766,886号；StudnickaらProtein Engineering 7:805~814頁(1994年)参照のこと]。この方法によれば、各可変領域アミノ酸に、置換の危険度が割り当てられている。アミノ酸置換は、3つの危険カテゴリーのうちの1つに区別されている：(1)低い危険度の変更とは、抗原結合を混乱させる見込みが最小で、免疫原性を減少させる最大の可能性を有するものであり；(2)中程度の危険度の変更とは、抗原結合またはタンパク質フォールディングに影響を及ぼすより大きな見込みを有するが、さらに免疫原性を減少させるものであり；(3)高い危険度の残基とは、結合にとってまたは抗体構造の維持にとって重要であり、抗原結合またはタンパク質フォールディングが影響を受ける最高の危険を保持するものである。プロリンの三次元構造的役割のために、プロリンでの

40

50

修飾は、位置が、通常、低い危険度の位置にあっても、一般に、少なくとも中程度の危険度の変更であると考えられる。図10は、マウス抗体XHA.06.983、XHA.06.275およびXHA.06.642の軽鎖および重鎖可変領域アミノ酸配列を示す。

【0371】

マウス抗体の軽鎖および重鎖の可変領域は、本方法を用いるHuman Engineered（商標）である。低い危険度の位置にある、本方法による修飾の候補であるアミノ酸残基は、マウス可変領域のアミノ酸配列を、ヒト可変領域配列とアラインすることによって同定される。個々のVHまたはVL配列またはヒトコンセンサスVHまたはVL配列を含む、任意のヒト可変領域を使用できる。低い危険度の位置の任意の数のアミノ酸残基または低い危険度の位置のすべてのアミノ酸残基を変更できる。

10

【0372】

同様に、低および中程度の危険度の位置の、すべての本方法による修飾の候補であるアミノ酸残基は、マウス可変領域のアミノ酸配列を、ヒト可変領域配列とアラインすることによって同定される。低および中程度の危険度の位置の任意の数で、または低および中程度の危険度の位置のすべてで、アミノ酸残基を変更できる。

【0373】

Human Engineered（商標）抗体配列の調製

Human Engineered（商標）重鎖および軽鎖V領域配列を、シグナル配列（例えば、抗体由来シグナル配列）とともにコードするDNA断片を、合成的スクレオチド合成を用いて構築する。本明細書に記載される軽鎖V領域アミノ酸配列の各々をコードするDNAを、ヒトまたは軽鎖定常領域を含有するベクターに挿入する。本明細書に記載される重鎖V領域アミノ酸配列の各々をコードするDNAを、ヒト-1, 2, 3または4重鎖定常領域を含有するベクターに挿入する。これらのベクターのすべてが、一時的な発現または安定な細胞株開発のためのその使用に応じて、プロモーター（例えば、hCMVプロモーター）および3'非翻訳領域（例えば、マウス軽鎖3'非翻訳領域）を、さらなる調節配列とともに含む（US2006/0121604）。

20

【0374】

前記の、可変領域配列を含有するベクターを用いる、Human Engineered（商標）抗体の発現のために、低い危険度の軽鎖、低+中程度の危険度の軽鎖、低い危険度の重鎖および低+中程度の危険度の重鎖の種々の組み合わせから、少なくとも4種の変異体が生じ得る。それら場合には、軽鎖または重鎖のいずれか、または両方において中程度の危険度の変更が含まれない場合に、より少ない変異体が、対応して生じる。

30

【0375】

一時的な発現のための発現ベクターの調製

上記の軽鎖または重鎖遺伝子のいずれかを含有するベクターを、一時的なトランスフェクションのために構築する。これらのベクターは、上記のHuman Engineered（商標）抗体配列、プロモーターおよび軽鎖3'非翻訳領域に加え、エプスタイン-バーウイルス核抗原を発現するHEK293細胞における複製のために、エプスタイン-バーウイルスoriPを含むことが好ましい。

40

【0376】

HEK293E細胞におけるHuman Engineered（商標）PRLR抗体の一時的な発現

US2006/0121604に記載されるように、各々、エプスタイン-バーウイルス由来のoriPおよび上記の軽鎖または重鎖遺伝子を含有する別個のベクターを、HEK293E細胞に一時的にトランスフェクトする。一時にトランスフェクトされた細胞を、最大10日間インキュベートさせ、その後、上清を回収し、抗体を、プロテインAクロマトグラフィーを用いて精製する。

【0377】

永久細胞株開発のための発現ベクターの調製

永久細胞株開発のためのベクターは、上記のHuman Engineered（商標

50

) 抗体配列、プロモーターおよび軽鎖3'非翻訳領域に加え、それぞれ、G418またはヒスチジノール耐性トランスフェクタントの選択のためのneoまたはhisなどの選択マーカー遺伝子を含む。重鎖コード領域の1コピーと、軽鎖コード領域の1コピーとを含む最終ベクターを構築する。

【0378】

永久にトランスフェクトされたCHO-K1細胞の開発

軽鎖および重鎖遺伝子の各1コピーと一緒に含有する上記のベクターを、Ex-Cel1302適応CHO-K1細胞にトランスフェクトする。Ex-Cel1302培地における懸濁増殖に適応したCHO-K1細胞を、通常、直線化ベクターを用い、直線ポリエチレンイミン(PEI)を用いてトランスフェクトする。細胞を、1%FBSおよびG418を補給したEx-Cel1302培地を含む96ウェルプレートに入れる。96ウェルプレートにおいてクローンをスクリーニングし、核トランスフェクションから上位約10%のクローンを、G418を補給したEx-Cel1302培地を含む深いウェルの96ウェルプレートに移す。

10

【0379】

深いウェルの96ウェルプレートにおいて、14日間増殖させた培養物のEx-Cel1302培地において産生力試験を実施し、その時点で培養上清を、IgGの免疫グロブリンELISAアッセイによって分泌された抗体のレベルについて試験する。

【0380】

上位クローンを、Ex-Cel1302培地を含む振盪フラスコに移す。Ex-Cel1302培地において、これらのクローンを用いて振盪フラスコ試験を実施する。25mlの培地を含む125mlのエルレンマイヤーフラスコにおいて細胞を14日間増殖させる。インキュベーション期間の最後に、培養培地中の免疫グロブリンポリペプチドのレベルを、IgG ELISAまたはHPLCによって調べる。2または3の多ユニット転写ベクターを用いる同一細胞株の複数の逐次トランスフェクションによって、好ましくは、300μg/ml以上への免疫グロブリン産生レベルのさらなる増大を示すクローンおよび細胞株が得られる。

20

【0381】

精製

本発明のベクターおよびすべての下部からの免疫グロブリンポリペプチドの精製過程を設計できる(例えば、US2006/0121604参照のこと)。例えば、当技術分野で周知の方法によれば、終結後、濾過によって細胞を除去する。濾液をプロテインAカラム(必要に応じて、マルチブルバスで)上に載せる。カラムを洗浄し、次いで、発現され、分泌された免疫グロブリンポリペプチドを、カラムから溶出する。抗体産物の調製のために、ウイルス不活化ステップとして、プロテインAプールを低pH(最小30分間、最大1時間pH3)に保つ。吸着性陽イオン交換ステップを次に用いて生成物をさらに精製する。吸着性分離カラムからの溶出物をウイルス保持フィルターを通して、あり得るウイルス粒子のさらなる排除を提供する。濾液を、生成物は結合しない陰イオン交換カラムを通すことによってさらに精製する。最後に、生成物を、製剤バッファーに移すことによって精製過程を終了する。保持液を、少なくとも1mg/mlのタンパク質濃度に調整し、安定化剤を加える。

30

【0382】

結合活性

組換えHuman Engineered(商標)抗体のPRLR結合活性を評価する。振盪フラスコ培養上清から、プロテインAカラムを通すことによってタンパク質を精製し、続いて、A₂₈₀によって濃度を測定する。その他の実施例に記載されるように結合アッセイを実施する。

40

【0383】

(実施例11)

Human Engineered抗体

50

前記のマウス抗体のうち3種は、全般的に、実施例10に記載されるHuman Engineered（商標）であった。

【0384】

プロラクチン受容体抗体XHA.06.642およびXHA.06.275のHuman Engineering（商標）

XHA.06.642については、重鎖は、11の低い危険度または13の低い危険度および中程度の危険度の位置でHuman Engineered（商標）し、軽鎖は、中程度の危険度の位置のすべてが、すでにヒトアミノ酸であったために、低い危険度の位置（14の変更）でのみHuman Engineered（商標）した。XHA.06.275については、重鎖は、7の低い危険度または11の低い危険度および中程度の危険度の位置のいずれかでHuman Engineered（商標）し、軽鎖は、8の低い危険度または10の低い危険度および中程度の危険度の位置でHuman Engineered（商標）した。

【0385】

XHA.06.642、XHA.06.275およびXHA.06.983に由来するHuman Engineered（商標）可変領域のアミノ酸配列が、以下に示されている（CDRには下線が引かれている）。これらの可変領域は、種々の組み合わせで組み立てられた（例えば、配列番号88および配列番号89；配列番号88および配列番号90；配列番号91および配列番号93；配列番号91および配列番号94；配列番号92および配列番号93；または配列番号92および配列番号94）、Human Engineered（商標）抗体he.06.642-1、he.06.642-2、he.06.275-1、he.06.275-2、he.06.275-3、he.06.275-4、he.06.642LCが生じた。

【0386】

he.06.642 LC 可変領域低い危険度（配列番号88）：

【0387】

【化23】

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVSTSGYTYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN
RESGPDRFSGSGSGTDFLTISPVQAEDVATYYCQHSGELPPSFGQGTKLEIK

30

he.06.642 HC 可変領域低い危険度（配列番号89）：

【0388】

【化24】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKRLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHRGNYYAYYYA
DYWGQGTLVTVSS

he.06.642 HC 可変領域低い危険度 + 中程度の危険度（配列番号90）：

【0389】

【化25】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGNYYAYYYA
DYWGQGTLVTVSS

40

he.06.275 LC 可変領域低い危険度（配列番号91）：

【0390】

【化26】

DVQITQSPSSLASPGDRITLTCRASKNIYKYLAWYQEKPGKTNNLLIYSGSTLHSGIP
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAMYYCQHNDYPYTFGQGTKLEIK

50

h e . 0 6 . 2 7 5 L C 可変領域低い危険度 + 中程度の危険度（配列番号 9 2）：
 【0 3 9 1】
 【化 2 7】

DVQITQSPSSLASAPGDRITLTCRASKNIYKYLAWYQEKGKANKLLIYSGSTLHSGIP
 SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAMYCQQHNDYPYTFGQGTKLEIK

h e . 0 6 . 2 7 5 H C 可変領域低い危険度（配列番号 9 3）：
 【0 3 9 2】
 【化 2 8】

DVQLQESGPGLVKPSQLSLTCTVTGYSITSSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYFCARDYGYVFDYWGQGTTLT
 VSS

10

h e . 0 6 . 2 7 5 H C 可変領域低い危険度 + 中程度の危険度（配列番号 9 4）：
 【0 3 9 3】
 【化 2 9】

QVQLQESGPGLVKPSQLSLTCTVSGYSITSSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYFCARDYGYVFDYWGQGTTLT
 VSS

20

h e . 0 6 . 9 8 3 L C 可変領域低い危険度（配列番号 9 5）：
 【0 3 9 4】
 【化 3 0】

DIVMTQSPDSLAVSAGERVTINCKASQGV SNDVAWFQQKPGQSPKLLIYSASTRYTG
 VPDRLSGSGSGTDFFTISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK

h e . 0 6 . 9 8 3 L C 可変領域低い危険度 + 中程度の危険度（配列番号 9 6）：
 【0 3 9 5】
 【化 3 1】

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKASQGV SNDVAWFQQKPGQSPKLLIYSASTRESG
 VPDRLSGSGSGTDFFTISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK

30

h e . 0 6 . 9 8 3 H C 可変領域低い危険度（配列番号 9 7）：
 【0 3 9 6】
 【化 3 2】

DVQLVESGGLVQPGGSRRLSCAASGFAFSSFGMQWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
TIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRSGRDYWGQGTLVT
 VSS

h e . 0 6 . 9 8 3 H C 可変領域低い危険度 + 中程度の危険度（配列番号 9 8）：
 【0 3 9 7】
 【化 3 3】

40

EVQLVESGGLVQPGGSRRLSCAASGFAFSSFGMQWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
TIYYADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSGRDYWGQGTLVT
 SS

（実施例 1 2）

h e . 0 6 . 6 4 2 および h e . 0 6 . 2 7 5 抗体の発現および精製
 Human Engineered（商標）h e . 0 6 . 6 4 2 および h e . 0 6 . 2
 7 5 軽鎖および重鎖 V 領域を、それぞれ、ヒト および - 1 または - 2 定常領域と融

50

合した。次いで、重鎖および軽鎖遺伝子を、強力なプロモーターおよび効率的な3'非翻訳領域と融合し、エプスタインバーウイルス複製起点を含む一時的な発現ベクターにクローニングした。

【0398】

抗体を、全般的に、実施例10に記載される、種々の低い危険度または低い危険度+中程度の危険度の組み合わせで抗体重鎖および軽鎖配列をコードする別個のプラスミドを用いて、HEK293細胞において一時に発現させた。重鎖：軽鎖DNAの割合は1:2とした。細胞のトランスフェクションは、1:2のDNA:PEIの割合のPEIおよび1μg/mlのDNA濃度を用いて実施した。細胞密度は、8e5個細胞/mlとした。DNAは、標準Qiagenキットを用いて調製した。発現培養は、フラスコあたり400mlの培地を含む2Lのフラスコ中、IS293培地(IrvineScientific)+1%低IgG FBS(Hyclone)で増殖させた。培養条件は、37°C、5%CO₂および90~95RPMで搅拌とした。5~7日培養した後、培養培地を回収し、精製インプットとして清澄化した。

10

【0399】

キメラおよびHuman Engineered(商標)が他の前記の抗体の精製を、発現培養上清を直接組換えプロテインAファストフローカラム(GE Healthcare)を通すことによって一段階で達成した。主要ピークの溶出は、0.1mMグリシンpH3.5によってとした。プールされた物質を、PBSに透析し、30kDの名目分子量カットオフを用いて遠心濃縮器で濃縮した。最終純度は>95%であり、全収率は約60%であった。最終プールを、Endosafe PTS LALユニット(Charles River)またはQCL-1000 Chromogenic LAL End point Assay(Lonza)を用いてエンドトキシンについてアッセイし、結果は、すべての抗体について<0.05EU/mg(検出限界より低い)であった。Superdex 200 10/300 GLカラム(GE Healthcare)でのSECによって、キメラ抗体he.06.642-2の凝集状態は、単量体であると調べられた。

20

【0400】

chXHA.06.642を、单一のクロマトグラフィーステップと、それに続く、バッファー交換のための透析で>95%の純度に単離する。chXHA.06.642は、3mg/mlでPBSに可溶性であり、サイズ排除クロマトグラフィーによって測定されるように、主要な不純物または凝集は検出されない。

30

【0401】

フローサイトメトリーによるHuman Engineered抗ヒトPRLR抗体の試験

CHO-K1親およびヒトプロラクチン受容体(PRLR)発現細胞を回収し、遠心分離し、約5×10⁶個細胞/mlで、2%FBSおよび0.1%アジ化ナトリウムを含有する1×PBS(FACSバッファー)に再懸濁した。Human Engineered抗ヒトPRLRおよび抗KLHアイソタイプ対照抗体を、FACSバッファー中2×最終濃度に希釈し、適当なサンプルウェルに加えた(50ml/ウェル)。二次抗体および自己蛍光対照については、適当なウェルに50ml FACSバッファーを加えた。各サンプルウェルに50mlの細胞懸濁液を加えた。サンプルを、4°Cで1時間インキュベートし、冷FACSバッファーで2回洗浄し、1:100希釈のPEコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)を含有するFACSバッファーに再懸濁した。4°Cで30分間インキュベートした後、細胞を冷FACSバッファーで2回洗浄し、1mg/mlヨウ化プロピジウム(Invitrogen, San Diego, CA)を含有するFACSバッファーに再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。表7に示されるように、抗PRLR抗体は、RLR発現細胞と結合するが、親細胞とは結合しない。

40

【0402】

50

【表8】

表 8

PLRL 細胞株、クローン 1G5

CHO-K1 親細胞株

サンプル	MFI:	サンプル	MFI:
自己、対照、1G5	2.51	自己、対照、1G5	2.66
GAH-PE, 1G5	2.6	GAH-PE, PAR	2.54
GAM-PE, 1G5	2.61	GAM-PE, PAR	2.58
MAB1167, 1G5	33.8	MAB1167, PAR	2.58
KLH8.G2, 1G5	2.75	KLH8.G2, PAR	2.66
he.06.642 3 G2, 1G5	38.5	he.06.642-3 G2, PAR	2.58
KLH8.G1, 1G5	2.69	KLH8.G1, PAR	2.59
he.06.642 3 G1 (1), 1G5	39.1	he.06.642 3 G1 (1), PAR	2.57
he.06.642 3 G1 (2), 1G5	43	he.06.642 3 G1 (2), PAR	2.55
chXHA.06.642(1), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (1), PAR	2.56
chXHA.06.642 (2), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (2), PAR	2.55

(実施例 13)

Human Engineered (商標) 抗体の親和性

Biacore 分析によって調べられた、キメラ化および Human Engineered (商標) 抗体の親和性。手短には、NHS / EDC を介してプロテイン A / G (Pierce) で固定化された CM5 センサーチップ (Biacore) を用いて、約 600 RU の抗体をチップ表面に捕獲した。5 μg / mL (185 nM) で始まり、5 × 希釈で、0.3 nM に段階希釈した 5 種の濃度の PRLR ECD を、最低濃度から最高濃度まで動力学的滴定注射様式で注射し、15 分の解離データを集めた。実験は二重参照した。すなわち、隣接するフローセル応答を自動的に差し引き、バッファー注射実験に由来する応答を実験データセットから差し引いた。動力学的滴定注射様式にカスタマイズした Biacaval ソフトウェアを用いて、1 : 1 ラングミュアモデルにフィッティングすることによって、動力学的および導かれたパラメータ (k_a 、 k_d および K_D) を求めた。ヒトおよびカニクイザル PRLR ECD に対する、キメラおよびすべての Human Engineered (商標) 抗体の両方の親和性測定値は、表 9 および表 10 に要約されている。

【0403】

10

20

30

【表9】

表 9

サンプル	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.275 ヒト	3.9E-10	2.7E-04	7.0E+05	0.574
he.06.275-1 ヒト	5.0E-10	3.1E-04	6.2E+05	0.594
he.06.275-2 ヒト	6.1E-10	3.7E-04	6.0E+05	0.532
he.06.275-3 ヒト	4.3E-10	2.7E-04	6.4E+05	0.555
he.06.275-4 ヒト	5.2E-10	3.2E-04	6.2E+05	0.69
chXHA.06.275 カニクイザル	1.2E-09	5.0E-04	4.3E+05	1.48
he.06.275-1 カニクイザル	1.6E-09	5.7E-04	3.6E+05	2.78
he.06.275-2 カニクイザル	1.9E-09	6.9E-04	3.7E+05	1.49
he.06.275-3 カニクイザル	1.3E-09	5.0E-04	3.9E+05	1.19
he.06.275-4 カニクイザル	1.7E-09	6.0E-04	3.6E+05	1.2

サンプル	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.642 ヒト	1.3E-09	4.6E-04	3.5E+05	5.15
he.06.642-1 ヒト	2.0E-09	3.5E-04	1.7E+05	12.9
he.06.642-2 ヒト	3.1E-09	5.3E-04	1.7E+05	12.6
chXHA.06.642 カニクイザル	26E-08	4.3E-03	1.7E+05	12.6
he.06.642-1 カニクイザル	3.1E-08	3.8E-03	1.2E+05	8.29
he.06.642-2 カニクイザル	4.7E-08	8.3E-03	1.8E+05	11.1

【0404】

【表10】

表 10

サンプル	ka	kd	KD	Res SD
he.06.642 3 -G1 lot1	1.038(1)e5	3.828(5)e-4	3.688(5)nM	0.977
he.06.642 3 -G1 lot2	1.02E+5	3.88E-4	3.79977nM	1.06
he.06.642 3 -G2	9.801(1)e4	4.210(7)e-4	4.296(6)nM	1.054
chXHA.06.642	1.962(3)e5	6.47E-04	3.296(5)nM	1.389
CHO.KLHG2-60	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし

共有結合によって固定化された抗体を用いてラットおよびマウス交差反応を比較するために、CM4チップを、Biacore（登録商標）Inc.からの推奨されるプロトコールに従って、標準EDC-NHSアミンカプリング化学によってhe.06.642-2およびhe.06.275-4抗体とカップリングした。PRLR ECD注射は、111nMで始まり1.37nMに低下する3倍滴定シリーズの5種の濃度で実施した。再生は、グリシンpH3.0を用いて実施した。XHA.06.642およびXHA.06.275のすべてのHE変異体の親和性は、親キメラ抗体の親和性と極めて類似している。抗体he.06.642-2は、ヒト、マウスおよびラットPRLRと同等の親和性で結合する。カニクイザルPRLRと、ヒトPRLRよりも15倍弱い親和性で結合する。抗体he.06.275-4は、カニクイザルPRLRと、ヒトPRLRよりも5倍弱い親和性で結合する。抗体he.06.275-4は、マウスまたはラットPRLRと効果

10

20

30

40

50

的に結合しない。データの概要は表 11 に示される。

【 0 4 0 5 】

【 表 11 】

表 11 - 共有結合によって固定された抗体に対する選択された H E 変異体の異種間親和性分析

he.06.642-2 結果

サンプル	kon	koff	KD (nM)
he.06.642-2 ヒト	3.5E+05	9.1E-04	2.6
he.06.642-2 かニクイザル	1.5E+05	6.0E-03	38.9
he.06.642-2 マウス	1.1E+05	3.1E-04	2.7
he.06.642-2 ラット	7.6E+04	1.4E-04	1.9

10

かニクイザル KD / ヒト KD = 15

マウス KD / ヒト KD = 1

ラット KD / ヒト KD = 0.75

he.06.275-4 結果

サンプル	kon	koff	KD (nM)
he.06.275-4 ヒト	3.4E+05	4.5E-04	1.3
he.06.275-4 かニクイザル	1.3E+05	8.2E-04	6.4
he.06.275-4 マウス	2.1E+03	3.7E-02	17,613
he.06.275-4 ラット	0.0E+00	0.0E-00	0

20

かニクイザル KD / ヒト KD = 5

マウス KD / ヒト KD = 13,548

ラット KD / ヒト KD =

(実施例 14)

B a F / P R L R 細胞増殖および生存の阻害ならびに P R L R 誘導性 E R K 1 / 2 リン酸化の阻害

30

キメラ m A b を、 B a F / P R L R 細胞の増殖および生存を阻害するその能力について分析した [図 11] 。試験したすべてのキメラが、対応するハイブリドーマクローンと比較してその効力を保持していることがわかった。実際、 X H A . 0 6 . 6 4 2 および X H A . 0 6 . 2 7 5 は、キメラ化後に、このアッセイにおいて増大した効力を有することがわかった。ヒト乳癌モデルにおけるキメラ抗体の P R L R シグナル中和能を評価するために、 T 4 7 D 細胞を、 1 μ g / m l の m A b で 30 分間処理し、その後、 P R L 刺激を施した。同時に、さらなる細胞サンプルを、抗体単独とともにインキュベートし、抗体候補のキメラ化によって得た任意のアゴニズムの可能性を調べた。図 12 に見られるように、すべてのキメラ抗体は、 T 4 7 D において P R L 誘導性シグナル伝達を遮断するその能力を保持していたが、 c h X H A . 0 6 . 9 8 3 のみは、ホスホ P R L R およびホスホ S t a t 5 によって表される、 P R L R シグナル伝達の検出可能な誘導（小さいが再現性のある効果）を示した。

40

【 0 4 0 6 】

E R K 1 / 2 リン酸化に対する抗体効果の測定

以下および上記実施例 5 において記載されるように、選択された Human Engineered (商標) 抗体を、 P R L R 誘導性 E R K 1 / 2 リン酸化を阻害するその能力について試験した。

50

【 0 4 0 7 】

5 時間の血清飢餓後、 T 4 7 D 細胞を、マイクロタイパレートにおいて完全増殖培地に 37 ℃ で 24 時間播種した。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄し

、0.1% BSAを含有する血清不含培地で希釈した抗体とともに37℃で30分間インキュベートした。抗体の最終出発濃度は、40 μg/mlとした。培地を除去し、0.1% BSAを含有する血清不含培地で希釈したプロラクチンを、30 ng/mlの最終濃度に加えた。細胞をプロラクチンとともに37℃で30分間インキュベートし、続いて、氷冷PBSで2回洗浄した。洗浄剤、キレート剤および種々のプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含有する標準溶解バッファーを加えて細胞溶解物を作製した。リン酸化ERK1/2(pERK1/2)のレベルを、標準ELISAを、DUOSET(登録商標)IC Phospho-ERK1/ERK2、R&D Systems, Inc.の使用説明書に従って用いて測定した。代表的なアッセイの結果が図13に示されている。

10

【0408】

(実施例15)

A. mAb候補の、PRLR発現標的細胞に対してADCCを媒介する能力

抗PRLR mAbの目的とされる作用機序の1つは、抗体依存性細胞細胞傷害(ADCC)を媒介する能力である。候補抗体のADCCの能力を評価するために、PRLR発現乳房上皮標的としてT47D細胞を用いた。図14に示されるように、2種のキメラ抗PRLR mAbは、精製ヒトNK細胞によって媒介されるADCCを誘導できる。chXHA.06.275は、4時間以内に標的細胞の約30%の特異的溶解を誘導することが実証された。chXHA.06.642の生成時間のために、この候補は、元のADCアッセイには含まれなかった。

20

【0409】

B. サイトカインレベルに対する抗PRLR抗体効果

乳癌細胞におけるPRLによるサイトカイン調節の可能性を調べた。この実験では、MCF7またはT47D細胞を、chXHA.06.642とともに、または併わずにPRLに48時間曝露した。Mesoscale Diagnostics製のマルチプレックスサンドイッチイムノアッセイを用いて、PRLによって調節されたサイトカインに対するchXHA.06.642効果を測定した。PRLはT47D細胞からのVEGF分泌を誘導すること、およびこの効果は抗体chXHA.06.642の添加で完全に抑制されることがわかった。これらの実験では、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 p70、IFN-αまたはTNF-αの大幅な調節は検出されなかった。これらの結果は、PRL/PRLR経路は、乳房腫瘍において血管形成ならびに細胞増殖および生存に寄与し得ること、およびこのVEGF調節経路を阻害することは、抗PRLR治療用抗体のもう1つの可能性あるin vivo作用機序であり得るということを示唆する。

30

【0410】

C. 抗PRLR mAbおよび化学療法薬を用いるin vitro組み合わせ研究

臨床では、可能性ある抗PRLR治療用抗体は、細胞傷害性投薬計画とともに投与してもよいという可能性のために、培養における細胞生存に対するこのような併用療法の効果が調べられた。この最後には、BaF3/PRLR細胞を、5日間の化学療法薬とともに、種々の濃度のchXHA.06.642またはchXHA.06.275で処理し、その後、細胞数のマーカーとしてCellTiter Gloを用いて細胞生存を評価した。このアッセイには、床上関連するおよび機構的に多様な細胞傷害性薬剤のアレイを用いた：ドキソルビシン(アントラサイクリンTopo II阻害剤)、タキソール(微小管分解防止剤)、フルダラビン(抗代謝物)およびシスプラチン(白金ベースのDNA架橋剤)。chXHA.06.275および、より高い程度にchXHA.06.642は、BaF3/PRLR細胞においてドキソルビシンと協力して細胞死を増大させることができた[図15参照のこと]。抗PRLR mAb chXHA.06.642およびchXHA.06.275とともに、併わない、化学療法薬IC50値において得られた相違は、表12に要約されている。

40

【0411】

50

【表12】

表 12

細胞傷害性薬剤	KLH (1ug/ml)	chXHA.06.642 (1ug/ml)	chXHA.06.275 (1ug/ml)
ドキソルビシン	6.44 nM	2.14 nM	2.56 nM
タキソール	4.14 nM	2.07 nM	2.45 nM
フルダラビン	104.6 uM	40.0 uM	93.8 uM
シスプラチニ	165.5 nM	27.6 nM	46.8 nM

10

D. 抗PRLR mAbの抗PRLR機能活性

抗体を、標的調節および細胞増殖アッセイにおいて評価した。図16は、T47D細胞におけるPRL誘導性Stat5リン酸化に対する2つの濃度のchXHA.06.642およびHuman Engineered(商標)抗体he.06.642-1およびhe.06.642-2の効果を表す。両方とも、完全p-Stat5シグナルシグナル抑制によって明らかな、強力なアンタゴニスト特性を保持していた。さらに、抗体またはmAb単独で処理された細胞も、アゴニスト活性を全く示さなかった。同様の結果がchXHA.06.275編痛いについても見られた。したがって、Human Engineering(商標)は、これらの抗体のアンタゴニストまたはアゴニスト性に全体的に影響を与えたかった。

20

【0412】

BaF/PRLR細胞増殖アッセイを用いて、抗PRLRキメラおよびHuman Engineered(商標)抗体の相対IC50値を調べた[図17参照のこと]。これらの実験の結果として、すべてのHuman Engineered(商標)抗体は、ネズミ対応物に対してほぼ等しい効力を有していた。

20

【0413】

(実施例16)

30

Nab-C11ラットリンパ腫モデルにおける抗PRLR抗体の抗腫瘍活性の評価

Nb2-C11腫瘍異種移植片モデルにおいて、chXHA.06.642を用いて単回用量PD研究を実施し、抗PRLR mAbが腫瘍に到達し、シグナル伝達を遮断できるかどうかを調べた。ラットPRLRに対する親和性(上記)に基づくこの研究において、抗体chXHA.06.642を用いた。モニターしたPDマーカーは、p-STAT5、PRLシグナル伝達の下流媒介物質であり、これはイムノプロットまたはIHC法を用いて検出できる。Nb2-C11腫瘍異種移植片におけるベースラインp-STAT5レベルがあまりにも低く適切に検出できなかつたので、マウスに外因性ヒツジ(o)PRL刺激を与えてベースラインp-STAT5レベルを増大し、このようにして、より適したダイナミックレンジを提供した。

40

【0414】

p-STAT5の誘導を、ヒツジPRLを注射されたNb2-C11腫瘍保持動物において、生理食塩水を注射された対照と比較して、ウェスタンおよびIHC分析によって検出した[図18AおよびB参照のこと]。p-STAT5の阻害は、10mg/kgのchXHA.06.642で48時間処理され、次いで、oPRL注射されたマウスにおいて観察されたが、KLH IgG1処理した対照動物では観察されなかつた。

【0415】

PRLシグナル伝達の阻害が、Nb2-C11腫瘍増殖阻害と相關するかどうかを調べるために、複数回用量有効性研究を、chXHA.06.642の週1回投与を用いて実施した[図19AおよびB参照のこと]。投与は、10mg/kgのchXHA.06

50

. 642 または K L H IgG1 または生理食塩水対照を用いて細胞移植の 4 日後に開始した（腫瘍が触知できる前）。mAb の 4 週間の腹膜内用量を与えた。モデルは、これらの腫瘍が筋肉を浸潤し、従って、ノギスを用いて正確に測定することが困難であるので、条件付き生存および無増悪時間エンドポイントを用いた。c h X H A . 0 6 . 6 4 2 処理群における腫瘍は、この群の 15 匹の動物のうち 2 匹が腫瘍量に屈した、移植の約 11 週後（4 回目の mAb 用量後 7 . 5 週）まで検出されなかった。生理食塩水および K L H IgG1 対照処理群における生存のメジアンは、細胞移植後 20 日であり（ $p < 0 . 0 0 0 1$ ）、その時点で、腫瘍量のために動物を安樂死させた。c h X H A . 0 6 . 6 4 2 処理群では、動物は体重が増加したのに対し、対照動物は体重を維持するか、または、主に疾患の苦しみのために減少した。

10

【 0 4 1 6 】

この研究には、第 2 の有効アームが含まれており、細胞移植の 12 日後に定着腫瘍を有する動物が研究に登録された [図 20 A および B]。投薬開始時点での平均腫瘍容積は 135 mm³ であった。動物には、10 mg / kg、週 1 回で、c h X H A . 0 6 . 6 4 2 または K L H IgG1 対照抗体のいずれかを用いて、2 用量の間、腹膜内に投与した。腫瘍は、2 回目の用量の 2 日後までに完全に退行したと思われた（移植後 3 週間）。しかし、約 2 週間後、腫瘍がマウスにおいて再出現し始めた。比較して、K L H IgG1 対照動物は深刻な腫瘍量を有しており、> 600 mm³ の平均容積を有していた。これらの腫瘍が筋肉中に直接増殖したので、平均油症容積は、ノギス測定によって記録されたものよりも大きかった可能性がある。生理食塩水および K L H IgG1 両群における生存のメジアンは、移植 23 日後であった（ $p = 0 < 0 . 0 0 0 1$ ）。初期の研究においてと同様、c h X H A . 0 6 . 6 4 2 処理群における動物は、体重増加したのに対し、対照動物は体重を維持するか、または減少した。したがって、c h X H A . 0 6 . 6 4 2 mAb は、少ない腫瘍細胞数（移植 4 日後処理開始）だけでなく、進行性の定着した N b 2 - C 11 腫瘍も 2 週間を超えて完全に退行することができた。

20

【 0 4 1 7 】

N b 2 - C 11 モデルは、抗 P R L R mAb は、in vivo で抗原を発現する腫瘍を効率的にターゲッティングし、P L R によって駆動される腫瘍内のシグナル伝達を阻害し、動物が進行性の定着腫瘍を有する場合であっても、腫瘍量において測定可能な結果を導く能力を有するということを実証した。

30

【 0 4 1 8 】

（実施例 17 ）

P D 評価のためのヒト乳癌 T 47D モデル

単回用量 P D 研究を、乳癌 T 47D 細胞を用いて実施例 16 において試験された抗体 c h X H A . 0 6 . 6 4 2 を用いて in vivo で実施した。o P R L の、P R L R シグナル伝達を刺激する能力ならびに c h X H A . 0 6 . 6 4 2 の、このシグナル伝達を in vivo で阻害する能力を評価した、腫瘍を移植された動物には、生理食塩水。K L H IgG1 対照および mAb または c h X H A . 0 6 . 6 4 2 の腹膜内注射を施し、48 時間後、ボーラス注射によって生理食塩水または 20 μg の o P R L のいずれかを与えた。

40

40 分後、腫瘍組織を回収した。o P R L ボーラス処理した動物から得た腫瘍において、p - S T A T 5 の相当な誘導が観察されたが、生理食塩水対照動物では観察されなかつたことが、ウェスタンプロッティングによって評価されたが、I H C 分析によってわずかにより変わりやすい（図 21）。p - A K T および p - E R K のレベルは、in vivo で o P R L 刺激によって増大しなかった。K L H IgG1 対照ではなく c h X H A . 0 6 . 6 4 での処理が、o P R L ボーラス注射後の p - S T A T 5 誘導の強力な阻害を実証したことは、重大なことである。I H C 分析によって、概して、この結果が確認された。ウェスタンプロッティングおよび I H C 両方の分析によって、p - S T A T 5 が、4 匹の c h X H A . 0 6 . 6 4 2 処理動物うちの 4 匹において腫瘍において阻害されたことは重大なことである。

【 0 4 1 9 】

50

(実施例 18)

P R L R 発現およびP R L R 発現の、E R およびH e r 2 - n e u 発現との相関

正常組織では、R T - P C R によって定量化されるP R L R 発現は、乳房および子宮において最高であり、続いて、腎臓、肝臓、前立腺および卵巣である。P R L R m R N A レベルは、気管、脳および肺において最低である (P i e r c e S K ら、J E n d o c r ; 1 7 1 (1) : R 1 ~ R 4 (2 0 0 1 年))。

【 0 4 2 0 】

免疫組織化学的 (I H C) 分析は以下のとおり実施できる。癌患者から得た凍結組織サンプルを、最適切断温度 (O C T) 化合物に包埋し、ドライアイスを含むイソペンタンで瞬間凍結した。Leica 3050 CM ミクロトームを用いて凍結切片を、5 μm の厚さに切断し、v e c t a b o u n d コーティングしたスライド上で解凍 - マウントする。切片を、- 20 でエタノールを用いて固定し、室温で一晩風乾させる。固定した切片を使用まで - 80 で保存する。組織切片を回収し、まず、ブロッキングバッファー (P B S、5 % 正常ヤギ血清、0 . 1 % Tween 20) 中、室温で 30 分間インキュベートし、次いで、ブロッキングバッファーで希釈した (1 μg / ml) 、癌関連タンパク質特異的モノクローナル抗体および対照モノクローナル抗体とともに 120 分間インキュベートする。次いで、切片をブロッキングバッファーで 3 回洗浄する。結合しているモノクローナル抗体を、0 . 1 M 酢酸ナトリウムバッファー、p H 5 . 5 および 0 . 0 0 3 % 過酸化水素 (Sigma カタログ番号 H 1 0 0 9) 中、ヤギ抗マウス I g G + I g M (H + L) F (a b ') 2 - ペルオキシダーゼコンジュゲートおよびペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (1 mg / ml、Sigma カタログ番号 D 5 6 3 7) を用いて検出する。染色されたスライドを、ヘマトキシリソで対比染色し、Nikon 顕微鏡下で調べた。

10

20

30

40

【 0 4 2 1 】

癌関連タンパク質 (抗原) に対するモノクローナル抗体を用いて、種々の種類の組織から得られた種々の細胞株との反応性を調べる。種々の確立された細胞株に由来する細胞を、プロテアーゼを用いずに増殖表面から採取し、充填し、O C T 化合物に包埋する。細胞を凍結し、切片を作製し、次いで、標準 I H C プロトコールを用いて染色する。Cell Array (商標) 技術は、W O 0 1 / 4 3 8 6 9 に記載されている。外科的切除によって得られた正常組織 (ヒト) を、凍結し、マウントする。Leica 3050 CM ミクロトームを用いて凍結切片を、5 μm の厚さに切断し、v e c t a b o u n d コーティングしたスライド上で解凍 - マウントする。切片を、- 20 でエタノールを用いて固定し、室温で一晩風乾させる。固定した切片を使用まで - 80 で保存する。PolyMIC A (商標) 検出キットを用いて、癌関連抗原特異的モノクローナル抗体の、正常組織との結合を調べる。一次モノクローナル抗体は、1 μg / ml の最終濃度で用いる。

【 0 4 2 2 】

P R L R 発現の出現率およびE R およびH e r 2 - n e u 発現 E R およびH e r 2 - n e u 発現とのその相関を調べるために、免疫組織化学 (I H C) を用いて 122 の浸潤性乳癌患者サンプルを評価した。全体として、62 / 122 (50 %) のサンプルがP R L R を発現し、58 / 122 (47 %) がE R を発現し、32 / 122 (26 %) がH e r 2 - n e u を発現した。96 (78 %) のサンプルが浸潤性乳管癌からなり、そのうち 48 (50 %) がP R L R を発現した。これらのサンプルの間で、24 / 48 (50 %) はまた、E R + を発現し、13 / 48 (26 %) はまたH e r 2 - n e u を発現した。

【 0 4 2 3 】

本明細書においてかつ / または出願データシートにおいて参照される、上記の米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許出願は、その全文が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 4 2 4 】

前記から、当然のことではあるが、本明細書には、例示の目的上、本発明の具体的な実施形態が記載されているが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく種々の改変を行うことができる。

50

【図1】

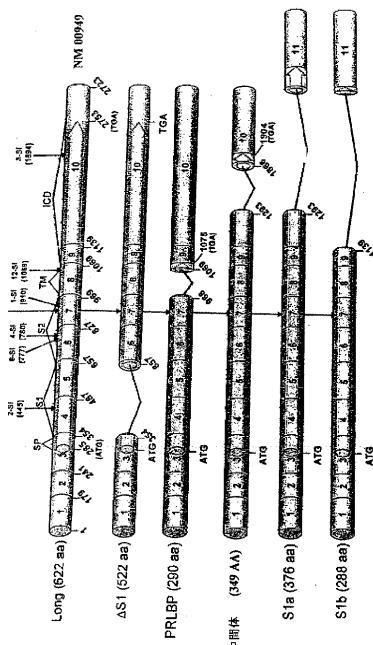
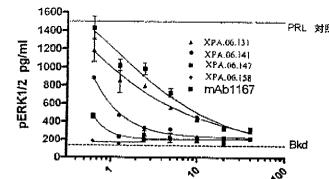


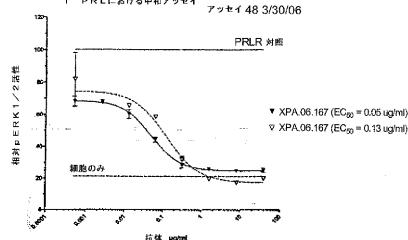
Figure 1

【図2】

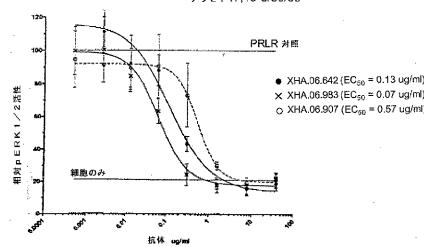
Figure 2: PRLR特異的抗体は、pERK1／2リン酸化を阻害する。



【図3】

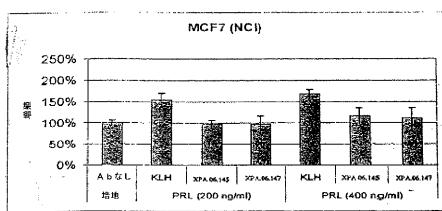
Figure 3: PRLR特異的抗体は、pERK1／2を阻害する。
pERK1／2を測定するT47D細胞±3.0 nM/m
PRLにおける中和アッセイ アッセイ 48 3/30/06

【図4】

Figure 4: PRLR特異的抗体は、pERK1／2を阻害する。
pERK1／2を測定するT47D細胞±3.0 nM/m
PRLにおける中和アッセイ 47,48 3/30/06

【図5】

Figure 5: 5 μg/mlのsFvが、腫瘍細胞株の増殖を阻害する。



【図6】

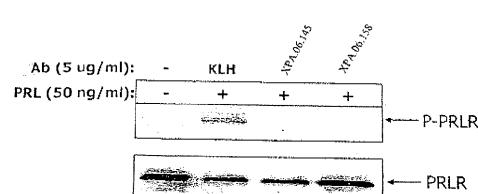


Figure 6: PRLR特異的抗体は、PRL誘導性受容体リン酸化を阻害する。

【図7A】

FIGURE 7A

配列番号 20
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFNYPHVVWVQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV
GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 22
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

配列番号 23
GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 24
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

配列番号 25
GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 26
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFSYGMHVVWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

配列番号 29
GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 30
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 32
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 34
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

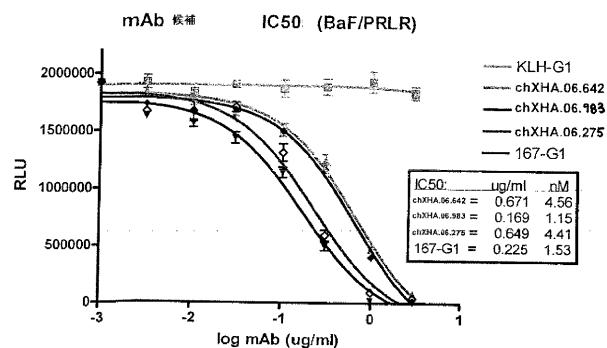
GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

配列番号 36
EVQILLESGGGLVQFGCSLRLSCAASGTTFDYQGMSWVQAPGKGLEWVAISYDGSNTTYADSVVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARASSTSLYWGQGTIVTV

GVSLTQPFSASCCTIGORVTSQGCSLSSSNIGSTDWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSPGVPDFSGSKSGTSASLAISG
LSEDEADYYCAAWDDSLSGLPGVYGGGTKLTVL

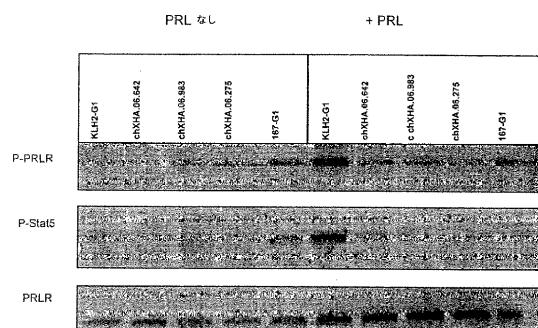
【図 1 1】

Figure 11



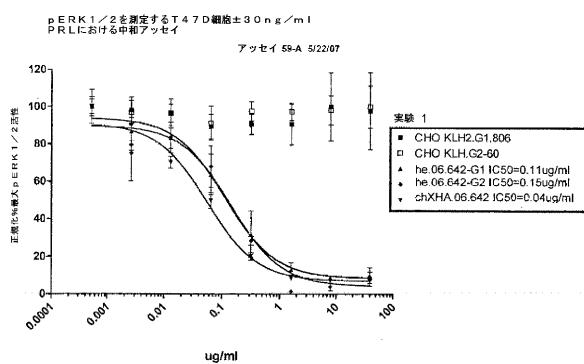
【図 1 2】

Figure 12



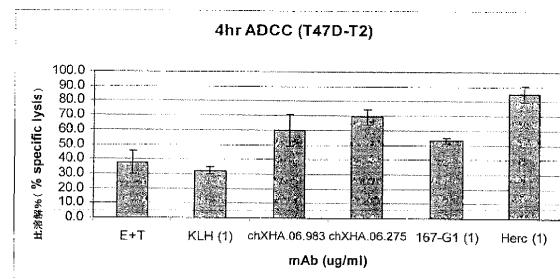
【図 1 3】

Figure 13



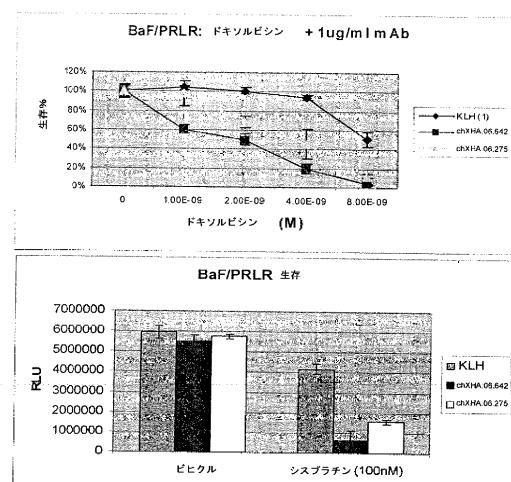
【図 1 4】

Figure 14



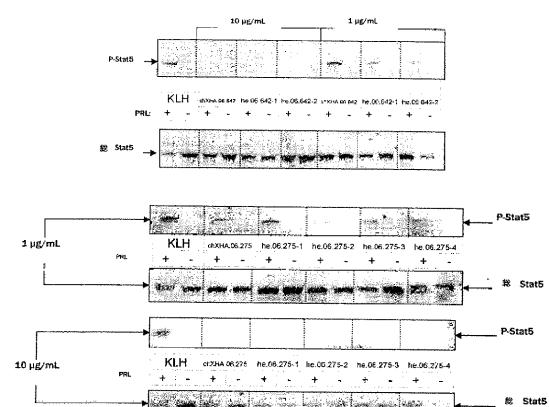
【図 15】

Figure 15



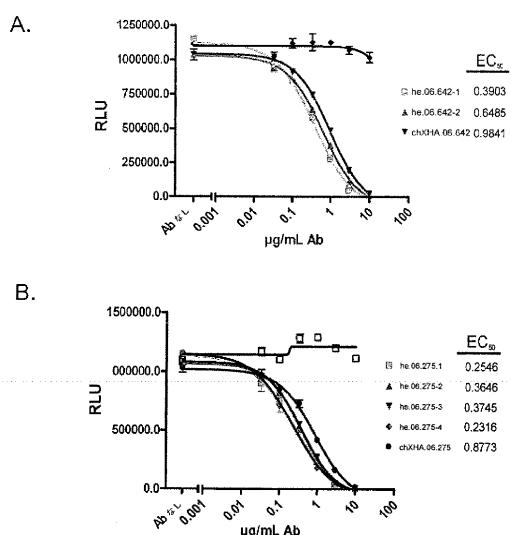
【図 16】

Figure 16



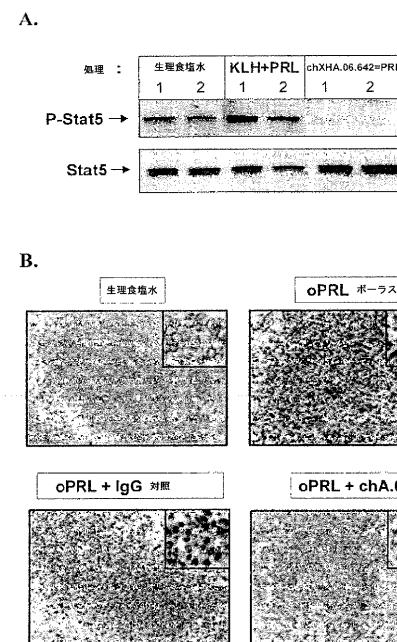
【図 17】

Figure 17



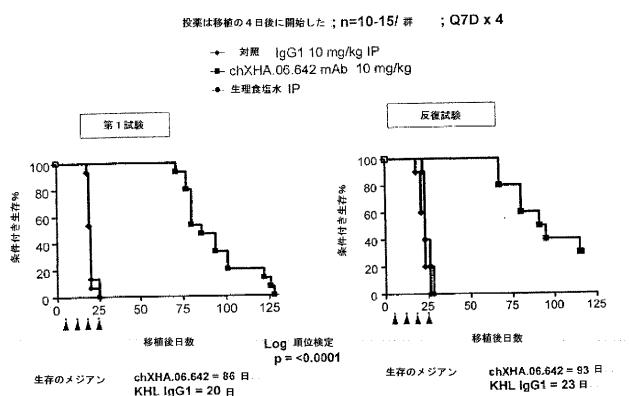
【図 18】

Figure 18



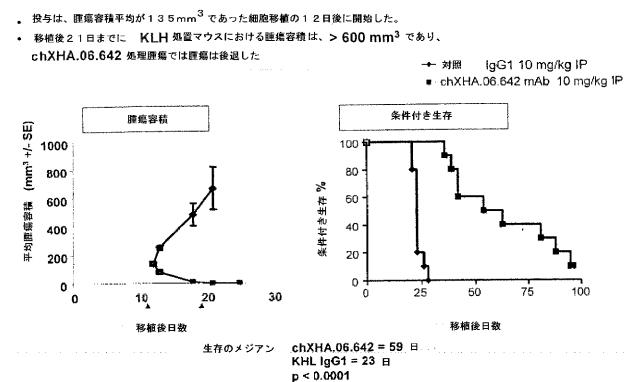
【図 19】

Figure 19



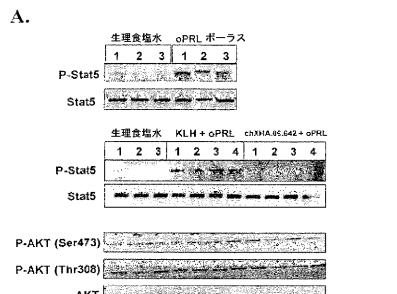
【図 20】

Figure 20

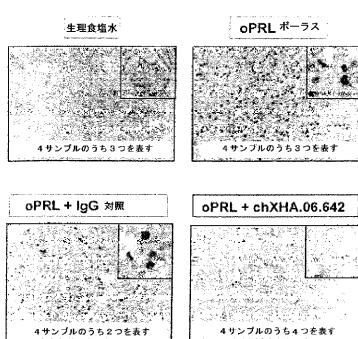


【図 21】

Figure 21



B.



【配列表】

2010501163000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/076160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 C12N5/18 C12N15/13
A61K31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>"Monoclonal Anti-human Prolactin R Antibody" INTERNET CITATION, [Online] 6 June 2005 (2005-06-06), XP002479170 Retrieved from the Internet: URL:http://www.rndsystems.com/pdf/MAB1167.pdf [retrieved on 2008-05-05] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-52,66

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 May 2008

Date of mailing of the international search report

14/08/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax (-31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/076160

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HU ZHANG-ZHI ET AL: "Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 44, 2 November 2001 (2001-11-02), pages 41086-41094, XP002479171 ISSN: 0021-9258 page 41087, right-hand column, paragraph 1 figures 3,8,9,11 -& "Prolactin Receptor" INTERNET CITATION, [Online] XP002479172 Retrieved from the Internet: URL: http://www.bioreagents.com/products/productDetails/productDetails.cfm?catnbr=MA1-610 [retrieved on 2008-05-05]	1-52,66
T		
X	SISSOM J F ET AL: "ANTI-GROWTH ACTION ON MOUSE MAMMARY AND PROSTATE GLANDS OF A MONOCLONAL ANTIBODY TO PROLACTIN RECEPTOR" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 133, no. 3, 1 December 1988 (1988-12-01), pages 589-595, XP008068076 ISSN: 0002-9440 cited in the application the whole document	1-52,66
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/076160

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2007/051112 A (INVITROGEN CORP [US]; CLEVENGER CHARLES [US]; SWEET WILLIAM [US]) 3 May 2007 (2007-05-03) paragraphs [0003], [0005], [0009], [0010], [0065] - [0069], [0077], [0078]; claims 1-39; examples 2-4	1-52,66
P,X	WO 2006/110585 A (CHIRON CORP [US]; SAGRES DISCOVERY INC [US]; FANIDI ABDALLAH [US]; BOO) 19 October 2006 (2006-10-19) page 7, line 31 - page 10, line 6 page 10, line 23 - page 12, line 8 page 40, line 8 - page 87, line 7 page 102, line 17 - page 103, line 3 claims 1-414; examples 5,6,11,12,14,17	1-52,66

International Application No. PCT/US2007/076160

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.1**

Although claims 29-39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 66 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/076160

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid; specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007 /076160

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 51, 52 (complete), claims 1-50, 66 (all partially)

The antibody named XHA.06.642 including the disclosed and claimed variants thereof and related subject-matter.

Invention 2: claims 53-56 (complete), claims 1-50, 66 (all partially)

The antibody named XHA.06.275 including the disclosed and claimed variants thereof and related subject-matter.

Invention 3: claims 57-60 (complete), claims 1-32, 34-50, 66 (all partially)

The antibody named XHA.06.983 including the disclosed and claimed variants thereof and related subject-matter.

Inventions 4-34: claims 1-32, 34-50, 66 (all partially)

Each of the antibodies named XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.189 or XHA.06.907 and related subject-matter.

Invention 35: claims 61, 62 (complete), claim 66 (partially)

An antibody that binds the extracellular domain of human PRLR with an equilibrium constant (KD) of at least 10,000 to 15,000 fold lower than the extracellular domain of murine PRLR.

Invention 36: claims 63 (complete), claim 66 (partially)

An antibody that binds the extracellular domain of human PRLR, the extracellular domain of murine PRLR, and the extracellular domain of rat PRLR.

Invention 37: claims 64, 65 (complete), claim 66 (partially)

International Application No. PCT/US2007 /076160

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/USA/ 210

An antibody that binds the extracellular domain of human, murine and rat PRLR with an equilibrium dissociation constant (KD) of 10-6M or lower.

Invention 38: claims 67, 68

A method of monitoring cancer therapy in a subject afflicted with cancer as recited in claim 67.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/076160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007051112 A	03-05-2007	NONE	
WO 2006110585 A	19-10-2006	AU 2006235258 A1	19-10-2006
		CA 2604844 A1	19-10-2006
		EP 1910557 A2	16-04-2008
		EP 1871911 A2	02-01-2008
		WO 2006110581 A2	19-10-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 0 7 K 14/72 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/72	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ベディンジャー, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95687, ヴァカヴィル, ロビン サークル 451
- (72)発明者 ダミアノ, ジェーソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー.ボックス 8097, ノバルティス アーゲー, インテレクチュアル プロパティー アール-338
- (72)発明者 ルクマン, モハマッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー.ボックス 8097, ノバルティス アーゲー, インテレクチュアル プロパティー アール-338
- (72)発明者 マサト, リンダ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94610, オークランド, マリポサ アベニュー 612, ナンバー310
- (72)発明者 ミルザ, アメル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94118, サンフランシスコ, 6ティーエイチ アベニュー 271
- (72)発明者 ノネット, ジュヌビエーブ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94708, バークレー, グリズリー ピーク ブールバード 739

F ターム(参考) 4B024 BA55 CA01 CA20 DA02 DA06 EA03 EA04 GA11 GA27 HA01
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE11 CE12 DA05
4B065 AA26X AA90X AA98X AA98Y AB01 AC14 AC15 BA02 BA24 BD14
CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 CC22 CC23
4H045 AA11 BA09 BA42 CA42 DA76 EA29 FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	PRLR特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2010501163A	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2009524812	申请日	2007-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司 爱克索马技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司 ZOMA科技有限公司		
[标]发明人	ベデインジャーダニエル ダミアノジェーソン ルクマンモハマッド マサトリンダ ミルザアメル ノネットジュヌビエーブ		
发明人	ベデインジャー, ダニエル ダミアノ, ジェーソン ルクマン, モハマッド マサト, リンダ ミルザ, アメル ノネット, ジュヌビエーブ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K14/72 C07K16/46 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K45/06 A61K2039/505 A61P31/00 A61P35/00 A61K47/6851 C07K16/2869 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00 A61K2300/00 A61K39/39558 C07K16/30 G01N33/5308 G01N33/57492 G01N2333/72		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5 /00.A C12P21/08 C07K14/72 C07K16/46 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/BA55 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/GA27 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA05 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA98X 4B065/AA98Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA42 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/838648 2006-08-18 US 60/946360 2007-06-26 US		
其他公开文献	JP5517619B2 JP2010501163A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了PRLR特异性抗体，以及含有这种抗体的药物组合物，含有药物组合物的试剂盒，以及预防和治疗癌症的方法。

<u>ハイブリドーマ名</u>	<u>ATCC 寄託番号</u>
XHA.06.567	PTA-7794
XHA.06.642	PTA-7795
XHA.06.983	PTA-7796
XHA.06.275	PTA-7797
XHA.06.189	PTA-7798
XHA.06.907	PTA-7799