(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2013-507968
(P2013-507968A)
(43)公表日　平成25年3月7日(2013.3.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	
G01N 33/53	(2006.01)	A61K	39/395	Y	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 187 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-535402 (P2012-535402)
(86)(22)出願日　平成22年10月22日 (2010.10.22)
(85)翻訳文提出日　平成24年3月30日 (2012.3.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/053686
(87)国際公開番号　WO2011/050242
(87)国際公開日　平成23年4月28日 (2011.4.28)
(31)優先権主張番号　61/254,474
(32)優先日　平成21年10月23日 (2009.10.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

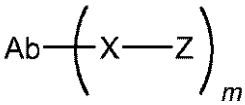
(71)出願人　500287639
ミレニアム　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
ＭＩＬＬＥＮＮＩＵＭ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，ランズタウン　ストリート　４０
(71)出願人　512061940
アムジェン　ブリティッシュ　コロンビア
カナダ国　ブイ５エー　１ブイ７　ブリティッシュ　コロンビア，　バーナビー，　エンタープライズ　ストリート　７９９０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＧＣＣ分子と関連組成物および方法

(57)【要約】
ＧＣＣに結合する抗体およびＧＣＣに結合する抗体の抗原結合断片が開示される。この抗体は、ＧＣＣの細胞外ドメインに結合し、内部移行され得る。いくつかの実施形態では、この抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。この抗体またはその部分をコードする核酸およびベクター、この核酸を含有する組換え細胞、ならびにこの抗体または抗原結合断片を含む組成物も開示される。本発明はまた、本明細書において提供される抗体および抗原結合断片を利用する治療方法および診断方法を提供する。

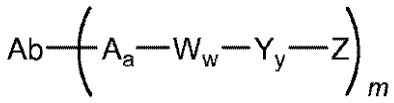
【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ＧＣＣ抗体分子であって、該抗ＧＣＣ抗体分子の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、以下の抗体：
５Ｆ９、
Ａｂ　２２９、または
３Ｇ１
のいずれか１つについて表２に開示される軽鎖配列および重鎖配列から選択される、抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項２】
ＩｇＧ１抗体である、請求項１に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項３】
治療剤と結合体化させていない、請求項１に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項４】
治療剤と結合体化させている、請求項１に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項５】
検出可能な標識と結合体化させている、請求項１に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項６】
以下の抗体：
５Ｆ９、
Ａｂ　２２９、または
３Ｇ１
のいずれか１つについて表５に開示される、軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ならびに重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項７】
ヒトの軽鎖可変領域フレームワークおよび重鎖可変領域フレームワークまたはヒト由来の軽鎖可変領域フレームワークおよび重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項６に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項８】
ＩｇＧ１抗体である、請求項７に記載の抗ＧＣＣ抗体分子。
【請求項９】
式（Ｉ）の免疫結合体：
【化６７】



(*I*)

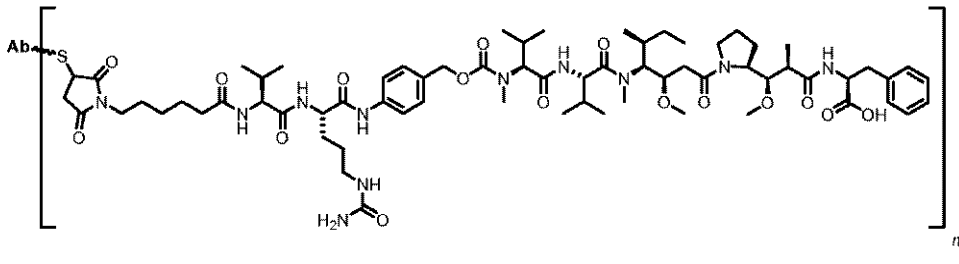
またはその薬学的に許容される塩
（式中、
Ａｂは、請求項１に記載の抗ＧＣＣ抗体分子であり、
Ｘは、ＡｂとＺを接続するリンカー成分であり、
Ｚは、治療剤または標識であり、
ｍは、１～１５の整数である）。
【請求項１０】
Ｚは、検出可能な標識である、請求項９に記載の免疫結合体。
【請求項１１】
－Ｚは、メイタンシンまたはアウリスタチンである、請求項９に記載の免疫結合体。
【請求項１２】
－Ｚは、ＤＭ１またはＤＭ４である、請求項９に記載の免疫結合体。
【請求項１３】

－Ｚは、ＭＭＡＥまたはＭＭＡＦである、請求項９に記載の免疫結合体。
【請求項１４】
前記リンカー－Ｘ－は式－Ａ$_{a}$－Ｗ$_{w}$－Ｙ$_{y}$－を有し、前記免疫結合体は式（ＩＩ）によって特徴付けられる、請求項９に記載の免疫結合体
【化６８】



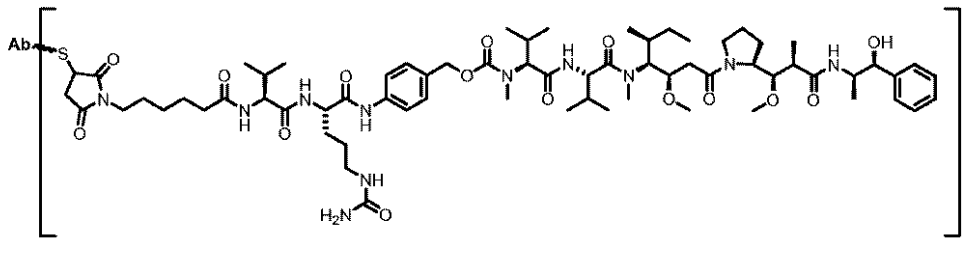
(*II*)

またはその薬学的に許容される塩
（式中、
－Ａ－は、ストレッチャー単位であり、
ａは、０または１であり、
－Ｗ－は、それぞれ独立して、アミノ酸単位であり、
ｗは、０～１２の範囲の整数であり、
－Ｙ－は、自壊的スペーサー単位であり、
ｙは、０、１、または２であり、
Ｚは、治療剤または標識であり、
ｍは、約１～約１５の範囲にある）。
【請求項１５】
式（Ｉ－４）の免疫結合体
【化６９】



(*I-4*)

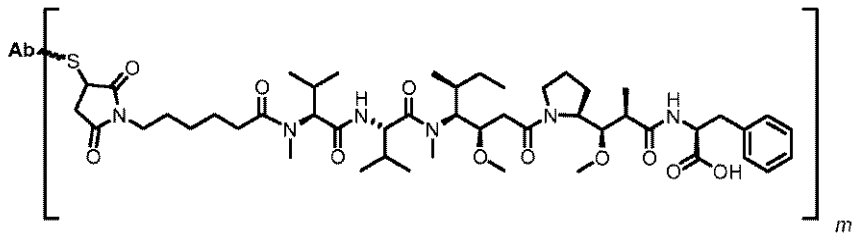
またはその薬学的に許容される塩
（式中、
Ａｂは、５Ｆ９であり、
ｍは、１～８の整数である）。
【請求項１６】
式（Ｉ－５）の免疫結合体
【化７０】



(*I-5*)

またはその薬学的に許容される塩
（式中、
Ａｂは、５Ｆ９であり、
ｍは、１～８の整数である）。
【請求項１７】

式（Ｉ－７）に記載の免疫結合体
【化７１】



(I-7)

またはその薬学的に許容される塩
（式中、
Ａｂは、５Ｆ９であり、
ｍは、１～８の整数である）。
【請求項１８】
ｍは１～３である、請求項１５に記載の免疫結合体。
【請求項１９】
ｍは３～５である、請求項１５に記載の免疫結合体。
【請求項２０】
ｍは３～５である、請求項１６に記載の免疫結合体。
【請求項２１】
ｍは３～５である、請求項１８に記載の免疫結合体。
【請求項２２】
被験体の結腸がんを処置する方法であって、請求項１または６に記載の抗体分子の治療有効量を該被験体に投与し、それによって該被験体を処置する工程を含む方法。
【請求項２３】
被験体の結腸がんを処置する方法であって、請求項９～１７のいずれか一項に記載の免疫結合体の治療有効量を該被験体に投与する工程を含む方法。
【請求項２４】
請求項１または６に記載の抗体分子をコードする単離核酸配列。
【請求項２５】
請求項２４に記載の単離核酸配列を含む細胞。
【請求項２６】
請求項１または６に記載の抗体分子を産生する方法であって、抗体分子の産生を可能にする条件下で請求項２５に記載の細胞を培養し、それによって請求項１または６に記載の抗体分子を産生する工程を含む方法。
【請求項２７】
請求項１または６に記載の抗体分子の軽鎖および重鎖の一方または両方を含むベクター。
【請求項２８】
ＧＣＣ分子を検出する方法であって、該分子を請求項１または６に記載の抗体分子と接触させる工程と、該抗体分子が該ＧＣＣ分子に結合するかどうかを決定する工程とを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本願は、２００９年１０月２３日に出願された米国仮特許出願第６１／２５４，４７４号の利益を主張する。米国仮特許出願第６１／２５４，４７４号の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。
【０００２】

発明の分野

本発明は、ＧＣＣに結合する抗体分子ならびに関連する分子、たとえば、そのような抗体分子をコードする核酸、組成物、ならびに関連する方法、たとえば治療方法および診断方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

背景

グアニリルシクラーゼＣ（ＧＣＣ）は、腸液の維持、電解質の恒常性、および細胞増殖において機能する膜貫通細胞表面受容体であり、たとえばＣａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １００巻：３０１８～３０２０頁（２００３年）を参照されたい。ＧＣＣは、小腸、大腸、および直腸を裏打ちする粘膜細胞で発現される（Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１８１頁（１９９６年））。ＧＣＣの発現は、すべての原発性および転移性結腸直腸腫瘍における発現と同様に、腸上皮細胞の新生物性形質転換に際して維持される（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１８１頁（１９９６年）

【非特許文献２】Ｂｕｃら Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４１巻：１６１８～１６２７頁（２００５年）

【非特許文献３】Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １０７巻：１６５３～１６６１頁（１９９４年））。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本発明者らは、ヒト抗体およびマウス抗体の両方を含む多数の抗ＧＣＣ抗体を発見した。したがって、一態様では、本発明は、本明細書において開示されるように、抗ＧＣＣ抗体分子を特徴とする。抗ＧＣＣ抗体分子は、裸の抗体分子（ｎａｋｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｍｏｌｅｃｕｌｅ）としても、免疫結合体（ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）の構成要素としても有用である。したがって、他の態様では、本発明は、抗ＧＣＣ抗体分子と、治療剤または標識とを含む免疫結合体を特徴とする。本発明はまた、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子および免疫結合体を含む薬学的組成物を特徴とする。本発明はまた、ＧＣＣおよびＧＣＣを発現する細胞または組織の検出；ＧＣＣ媒介性の疾患の診断、予後、画像診断、または病期分類；ＧＣＣタンパク質の活性または機能の調整；ならびに本明細書に記載のＧＣＣ媒介性の疾患の処置のための、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子および免疫結合体を使用する方法を特徴とする。他の態様では、本発明はまた、抗ＧＣＣ抗体分子アミノ酸配列をコードする単離および／または組換え核酸、ならびにそのような核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびに抗ＧＣＣ抗体分子を産生するための方法を特徴とする。

【０００６】

本明細書に記載の刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はすべて、それらの全体が参照によって組み込まれる。

【０００７】

本明細書において開示される本発明（複数可）の他の特徴、目的、および利点は、本明細書および図面からならびに本特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】図１は、５Ｆ９ｖｃ－ＭＭＡＦ、５Ｆ９ｖｃ－ＤＭ１、および５Ｆ９ｖｃ－ＤＭ

４を用いてｑ１４ｄスケジュールで処置した、２９３－ＧＣＣ＃２担持ＳＣＩＤマウスにおける腫瘍の成長を示す。
【図２】図２は、接種後（ｐ．ｉ．）４１日目に、０．９％ＮａＣｌ；４０ｍｇ／ｋｇの２０９抗体；または１０ｍｇ／ｋｇまたは４０ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９抗体を用いて処置したマウスの肺の重量を示す。
【図３】図３は、５Ｆ９抗体で処置した、ＣＴ２６－ｈＧＣＣ腫瘍担持マウスの生存曲線を示す。
【図４】図４は、ＧＣＣオルソログの抗体交差反応性を試験するためのＥＬＩＳＡ結合アッセイを示す。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
グアニリルシクラーゼＣ
グアニリルシクラーゼＣ（ＧＣＣ）（ＳＴＡＲ、ＳＴ受容体、ＧＵＣ２Ｃ、およびＧＵＣＹ２Ｃとしても公知）は、腸液の維持、電解質の恒常性、および細胞増殖において機能する膜貫通細胞表面受容体である（それぞれが参照によって本明細書において組み込まれるＣａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １００巻：３０１８～３０２０頁（２００３年）；Ｍａｎｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２３９巻：４６３～４６６頁（１９９７年）；Ｐｉｔａｒｉら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １００巻：２６９５～２６９９頁（２００３年））；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００４９６３）。この機能は、グアニリンの結合を通して媒介される（Ｗｉｅｇａｎｄら ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ． ３１１巻：１５０～１５４頁（１９９２年））。ＧＣＣはまた、Ｅ．ｃｏｌｉおよび他の感染性生物によって産生されるペプチドである耐熱性エンテロトキシン（たとえば、ＮＴＦＹＣＣＥＬＣＣＮＰＡＣＡＧＣＹ、配列番号３１６のアミノ酸配列を有するＳＴ）に対する受容体でもある（Ｒａｏ， Ｍ．Ｃ． Ｃｉｂａ Ｆｏｕｎｄ．Ｓｙｍｐ． １１２巻：７４～９３頁（１９８５年）；Ｋｎｏｏｐ Ｆ．Ｃ．およびＯｗｅｎｓ、Ｍ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８巻：６７～７２頁（１９９２年））。ＧＣＣへのＳＴの結合は、腸疾患、たとえば下痢をもたらすシグナルカスケードを活性化する。
【００１０】
ヒトＧＣＣについてのヌクレオチド配列（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００４９６３）：
【００１１】

【化１】

1 atgaagacgt tgctgttgga cttggctttg tggtcactgc tcttccagcc cgggtggctg

61 tcctttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg

121 atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag

181 gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct

241 actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt

301 gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata

361 gggccctcat gtacatactc caccttccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc

421 atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg

481 atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggttaact tttggaaaac caacgatctg

541 cccttcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag

601 gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc

661 ggctttaagg tggtgttaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac

【００１２】

【化２】

721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt

781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac

841 tttgaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct

901 cctgggaatt cccttctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac

961 tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt

1021 gaaaatggag aaaatattac cacccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt

1081 gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg

1141 cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgatacccac

1201 gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt

1261 cctaatgata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact

1321 ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgct ctcctgatgc tcagaaaata tagaaaagat

1381 tatgaacttc gtcagaaaaa atggtcccac attcctcctg aaaatatctt tcctctggag

1441 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc

1501 cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac

1561 aatgatggta atttcactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac

1621 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat cttcggggtg

1681 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttcctaccct

1741 gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga

1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc

1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct

1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa

1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc

2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga

2101 atgaaaccct tccgcccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg

2161 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttcaaaaaa

2221 attgagacta cacttgccaa gatatttgga ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat

【００１３】

【化３】

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag

2341 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg

2401 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat

2461 gaggaagtta caatctactt cagtgacatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc

2521 acccccatgg aagtggtgga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattgtt

2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggtgatg cgtacatggt ggctagtggt

2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc

2701 ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttcctg gcctcccaat atggattcgc

2761 attggagttc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat

2821 tgtctatttg gagatacggt caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg

2881 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt

2941 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg

3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaacccctc ctactgtgga gaatcaacag

3061 cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccaactctt tacagaaaag acaggcagca

3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac

3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctattttt aa

(**配列番号**:227)

ヒトＧＣＣについてのアミノ酸配列（ＧｅｎＰｅｐｔ受託番号ＮＰ＿００４９５４）：

【００１４】

【化４】

1 mktllldlal wsllfqpgwl sfssqvsqnc hngsyeisvl mmgnsafaep lknledavne

61 gleivrgrlq naglnvtvna tfmysdglih nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli

121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktndl

181 pfktyswsts yvykngtete dcfwylnalc asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdilmdhn

241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls

301 pgnsllnssf srnlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafrnltf

【００１５】

【化５】

361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms ptftwknskl

421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple

481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckydk krvilkdlkh ndgnftekqk ielnkllqid

541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg

601 msylhsskte vhgrlkstnc vvdsrmvvki tdfgcnsilp pkkdlwtape hlrqanisqk

661 gdvysygiia qeiilrketf ytlscrdrne kifrvensng mkpfrpdlfl etaeekelev

721 yllvkncwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve

781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys

841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkrngnrha idiakmalei

901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvvgikmpry clfgdtvnta srmestglpl

961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq

1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprrv asykkgtley lqlnttdkes tyf

(**配列番号** :228)

ＧＣＣタンパク質は、それぞれがＧＣＣ分子に分離可能な機能を提供する、いくつかの一般に認められたドメインを有する。ＧＣＣの部分は、配列番号２２８のアミノ酸残基１～残基約２３または残基１～残基約２１のシグナル配列（細胞表面にタンパク質を誘導するための）（成熟のために切り取られて、配列番号２２８のアミノ酸残基約２２または２４～１０７３の機能的成熟タンパク質を産出する）、配列番号２２８のアミノ酸残基約２４～残基約４２０または残基約５４～残基約３８４に結合するリガンド、たとえばグアニリンまたはＳＴに対する細胞外ドメイン、配列番号２２８のアミノ酸残基約４３１～残基約４５４または残基約４３６～残基約４５２の膜貫通ドメイン、配列番号２２８のアミノ酸残基約４８９～残基約７４９または残基約５０８～残基約７４５の、チロシンキナーゼ活性を有することが予測されるキナーゼ相同性ドメイン、および配列番号２２８の残基約７５０～残基約１００７または残基約８１６～残基約１００２のグアニリルシクラーゼ触媒ドメインを含む。

【００１６】

正常なヒト組織において、ＧＣＣは、小腸、大腸、および直腸を裏打ちする粘膜細胞で、たとえば、先端の刷子縁膜で発現される（Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１８１頁（１９９６年））。ＧＣＣの発現は、すべての原発性および転移性結腸直腸腫瘍における発現と同様に、腸上皮細胞の新生物性形質転換に際して維持される（Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１８１頁（１９９６年）；Ｂｕｃら Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４１巻：１６１８～１６２７頁（２００５年）；Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １０７巻：１６５３～１６６１頁（１９９４年））。胃、食道、および胃食道接合部由来の新生物性細胞もまた、ＧＣＣを発現する（たとえば米国特許第６，７６７，７０４号；Ｄｅｂｒｕｙｎｅら Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １３０巻：１１９１～１２０６頁（２００６年）を参照されたい）。その組織特異的発現およびがん、たとえば胃腸起源のがん（たとえば結腸がん、胃がん、または食道がん）との関連は、この疾患についての診断マーカーとしてのＧＣＣの使用のために活用することができる（Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１

８１頁（１９９６年）；Ｂｕｃら Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４１巻：１６１８～１６２７頁（２００５年））。

【００１７】

細胞表面タンパク質として、ＧＣＣはまた、抗体またはリガンドなどの受容体結合タンパク質についての治療用標的として役立つことができる。正常な腸組織において、ＧＣＣは、管腔環境および血管区画の間の不透過性障壁を形成する上皮細胞密着結合の先端側で発現される（Ａｌｍｅｎｏｆｆら、Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ８巻：８６５～８７３頁）；Ｇｕａｒｉｎｏら、Ｄｉｇ Ｄｉｓ Ｓｃｉ ３２巻：１０１７～１０２６頁（１９８７年））。そのため、ＧＣＣ結合タンパク質治療薬の全身静脈内投与により、それは侵襲性または転移性結腸がん細胞、腸管外または転移性結腸腫瘍、食道腫瘍または胃腫瘍、胃食道接合部の腺癌を含む胃腸系の新生物性細胞に到達するが、腸ＧＣＣ受容体に最小限の影響しか有していない。さらに、ＧＣＣは、リガンド結合に際して、受容体媒介性のエンドサイトーシスを通して内部移行する（Ｂｕｃら Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４１巻：１６１８～１６２７頁（２００５年）；Ｕｒｂａｎｓｋｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １２４５巻：２９～３６頁（１９９５年））。

【００１８】

ＧＣＣの細胞外ドメインに対して産生されたポリクローナル抗体（Ｎａｎｄｉら Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ． ８巻：１５１～１５９頁（１９９６年））は、ヒトおよびラットＧＣＣに結合するＳＴペプチドを阻害し、かつヒトＧＣＣによるＳＴ媒介性のｃＧＭＰ産生を阻害することができた。

【００１９】

ＧＣＣは、結腸がんを含むがんに関与するタンパク質として特徴付けられている。Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｄｉｓ Ｃｏｌｏｎ Ｒｅｃｔｕｍ ３９巻：１７１～１８１頁（１９９６年）；Ｂｕｃら Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４１巻：１６１８～１６２７頁（２００５年）；Ｃａｒｒｉｔｈｅｒｓら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １０７巻：１６５３～１６６１頁（１９９４年）；Ｕｒｂａｎｓｋｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １２４５巻：２９～３６頁（１９９５年）も参照されたい。ＧＣＣに対する抗体分子治療薬は、非結合体形態で単独で使用して、それによってＧＣＣ発現がん性細胞を阻害することができる。本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトＧＣＣに結合することができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、リガンド、たとえばグアニリンまたは耐熱性エンテロトキシンのＧＣＣへの結合を阻害することができる。他の実施形態では、本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、リガンド、たとえばグアニリンまたは耐熱性エンテロトキシンのＧＣＣへの結合を阻害しない。

【００２０】

ＧＣＣに特異的なモノクローナル抗体は、ＧＣＣ：Ｂ１０（Ｎａｎｄｉら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ６６巻：５００～５１１頁（１９９７年））、ＧＣＣ：４Ｄ７（Ｖｉｊａｙａｃｈａｎｄｒａら Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３９巻：１６０７５～１６０８３頁（２０００年））、およびＧＣＣ：Ｃ８（Ｂａｋｒｅら Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ２６７巻：１７９～１８７頁（２０００年））を含む。ＧＣＣ：Ｂ１０は、カッパ軽鎖およびＩｇＧ２ａアイソタイプを有し、かつラット、ブタ、およびサルＧＣＣに交差反応する。ＧＣＣ：Ｂ１０は、ＧＣＣの細胞内ドメイン、特に配列番号２２８の残基４７０～４８０の最初の６３のアミノ酸に結合する（Ｎａｎｄｉら Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ． ７巻：２１７５～２１８３頁（１９９８年））。ＧＣＣ：４Ｄ７は、ＧＣＣの残基４９１～５６８内のキナーゼ相同性ドメインに結合する（Ｂｈａｎｄａｒｉら Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４０巻：９１９６～９２０６頁（２００１年））。ＧＣＣ：Ｃ８は、ＧＣＣの細胞質部分におけるプロテインキナーゼ様ドメインに結合する。

定義および方法

本明細書において他に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学用語および専門用語は、当業者によって共通して理解される意味を有する。一般に、本明細書に記載の細胞培養および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴヌクレオチド

またはポリヌクレオチドの化学およびハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法ならびにそれらの技術は、当技術分野において公知であるものである。ＧｅｎＢａｎｋ受託番号またはＧｅｎＰｅｐｔ受託番号ならびに有用な核酸配列およびペプチド配列は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤによって維持されるウェブサイトで見出すことができる。標準的な技術は、組換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養、ならびに形質転換およびトランスフェクション（たとえばエレクトロポレーション、リポフェクション）に使用される。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従ってまたは当技術分野において共通して行われるようにまたは本明細書に記載のとおり実行される。前述の技術および手順は、たとえば、本明細書の全体にわたって記載され、議論される様々な、一般的なおよびより特定の参考文献に記載のとおり、当技術分野において公知の方法に従って一般に実行される。たとえばＳａｍｂｒｏｏｋら Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第３版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（２０００年））を参照されたい、または一般に、Ｈａｒｌｏｗ， Ｅ．およびＬａｎｅ， Ｄ．（１９８８年）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹを参照されたい。本明細書に記載の分析化学、有機合成化学、ならびに医薬品化学および薬化学に関連して利用される命名法ならびにその検査法および技術は、当技術分野において公知である。標準的な技術は、化学合成、化学分析、医薬品の調製、処方、および送達、ならびに患者の処置に使用される。さらに、文脈によって他に定めがない限り、単数形の用語は、複数形を含むものとし、複数形の用語は、単数形を含むものとする。

【００２１】

本明細書において使用されるように、用語「抗体分子」は、抗体、抗体ペプチド（複数可）、もしくは免疫グロブリンまたは前述のもの、たとえば抗体のいずれかの抗原結合断片を指す。抗体分子は、単鎖抗体分子、たとえばｓｃＦｖ（たとえばＢｉｒｄら（１９８８年）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２巻：４２３～４２６頁およびＨｕｓｔｏｎら（１９８８年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５巻：５８７９～５８８３頁）を参照されたい）、ならびに単一ドメイン抗体分子（たとえばＷＯ９４０４６７８を参照されたい）を含む。用語「抗体分子」の範囲内にないが、本発明はまた、「抗体アナログ（複数可）」、他の非抗体分子タンパク質ベースのスキャフォールド、たとえば、特異的な抗原結合を提供するためにＣＤＲを使用する融合タンパク質および／または免疫結合体をも含む。

【００２２】

「抗ＧＣＣ抗体分子」は、ＧＣＣ、たとえばヒトＧＣＣと相互作用し、またはそれを認識する、たとえばそれに結合する（たとえば特異的に結合する）抗体分子（つまり抗体、抗体の抗原結合断片、または抗体アナログ）を指す。例示的な抗ＧＣＣ抗体分子は、表１および表２に要約されるものなどである。

【００２３】

本明細書において使用されるように、用語「抗体」、「抗体ペプチド（複数可）」、または「免疫グロブリン」は、単鎖、二本鎖、および複数鎖タンパク質および糖タンパク質を指す。抗体という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、およびヒト抗体またはヒト化抗体を含み、これらはすべて、本明細書における他のところでより詳細に議論される。ラクダ科の動物の抗体（たとえばＵＳ２００５／００３７４２１を参照されたい）、およびナノボディ、たとえばＩｇＮＡＲ（サメ抗体）（たとえばＷＯ０３／０１４１６１を参照されたい）もまた、用語の範囲内に含まれる。用語「抗体」はまた、合成改変体および遺伝子操作された改変体をも含む。

【００２４】

本明細書において使用されるように、用語「抗体断片」または抗体の「抗原結合断片」

は、たとえばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖ断片、単鎖抗体、機能的重鎖抗体（ナノボディ）ならびに特異的な結合について完全な抗体と競合する、少なくとも１つの所望のエピトープに対して特異性を有する抗体の任意の部分（たとえば、エピトープに特異的に結合するのに十分なＣＤＲ配列を有し、かつ十分なフレームワーク配列を有する断片）を指す。たとえば、抗原結合断片は、その断片が誘導される抗体に結合するエピトープへの結合について競合することができる。誘導されるとは、このおよび同様の文脈において使用されるように、誘導の任意の特定の方法またはプロセスを意味しないが、単に配列類似性を指し得る。抗原結合断片は、組換え技術によってまたは完全な抗体の酵素的切断もしくは化学的切断によって、産生することができる。抗原結合断片という用語は、単鎖、たとえば軽鎖および重鎖を有する抗体のうちの重鎖と共に使用される場合、鎖の断片が、他方の鎖、たとえば軽鎖の完全可変領域と対になる場合に、それが、重鎖および軽鎖可変領域全体で見られるもののの少なくとも２５、５０、７５、８５、または９０％の結合を可能にするのに十分であることを意味する。

【００２５】

用語「ＣＤＲの抗原結合集合体」または「結合を可能にするのに十分な多くのＣＤＲ」（および同様の言葉）は、本明細書において使用されるように、フレームワークに配置され、かつ他方の鎖の完全可変領域とまたは同様の長さで、同数のＣＤＲを有する他方の鎖の可変領域、たとえば軽鎖の一部と対になる場合に、重鎖および軽鎖可変領域全体で見られるもののたとえば少なくとも２５、５０、７５、８５、または９０％の結合を可能にするのに十分な鎖、たとえば重鎖のＣＤＲを指す。

【００２６】

本明細書において使用されるように、用語「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウス（たとえばＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）遺伝子操作マウス（Ａｂｇｅｎｉｘ、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ））、ヒトファージディスプレイライブラリー、ヒトミエローマ細胞、またはヒトＢ細胞から誘導される抗体などの、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列から誘導される配列を有する抗体を含む。

【００２７】

本明細書において使用されるように、用語「ヒト化抗体」は、親抗体の抗原結合特性を保持する、または実質的に保持するが、ヒトにおいてそれほど免疫原性ではない非ヒト抗体、たとえばげっ歯動物（たとえばマウス）から誘導される抗体を指す。本明細書において使用されるヒト化は、脱免疫抗体（ｄｅｉｍｍｕｎｉｚｅｄ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）を含むように意図される。典型的に、ヒト化抗体は、非ヒトＣＤＲ、ヒトまたはヒト誘導のフレームワーク領域およびヒトまたはヒト誘導の定常領域を含む。

【００２８】

本明細書において使用される用語「改変」抗体は、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現される抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックな動物（たとえばマウス、ヒツジ、もしくはヤギ）から単離される抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のＤＮＡ配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製される、発現される、生成される、もしくは単離される抗体などの、組換え手段によって調製される、発現される、生成される、または単離される抗体を指す。そのような改変抗体は、ヒト化抗体、ＣＤＲ移植抗体（たとえば、第１の抗体由来のＣＤＲおよび異なる供給源、たとえば第２の抗体またはコンセンサスフレームワーク由来のフレームワーク領域を有する抗体）、キメラ抗体、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生成（たとえばファージディスプレイによって）抗体を含み、必要に応じて、代替の免疫グロブリン配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを伴う任意の手段によって調製される、発現される、生成される、または単離される、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列またはヒト免疫グロブリン遺伝子もしくは抗体から誘導される可変領域または定常領域を含んでいてもよい。実施形態では、改変抗体分子は、参照抗体からの配列の変化を有する抗体分子を含む。

【００２９】

用語「単一特異性抗体」は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および結合親和性を示す抗体または抗体調製物を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含む。

【００３０】

用語「二重特異性抗体」または「二機能性抗体」は、２つのエピトープに対して二重の結合特異性を示す抗体を指し、それぞれの結合部位は異なり、異なるエピトープを認識する。

【００３１】

用語「非結合体化抗体」および「裸の抗体」は、非抗体成分、たとえば治療剤または標識と結合体化させていない抗体分子を指すように区別なく使用される。

【００３２】

用語「免疫結合体」、「抗体結合体」、「抗体薬物結合体」、および「ＡＤＣ」は、区別なく使用され、非抗体成分、たとえば治療剤または標識と結合体化させている抗体を指す。

【００３３】

用語「作用物質」は、化合物、化合物の混合物、生体高分子、または生物学的材料から作製される抽出物を示すために本明細書において使用される。用語「治療剤」は、生物学的活性を有する作用物質を指す。

【００３４】

用語「抗がん剤」または「化学療法剤」は、ヒトにおける新生物、特に、癌腫、肉腫、リンパ腫、または白血病などの悪性（がん性）病変の発症または進行を阻害する機能的な特性を有する作用物質を指すために本明細書において使用される。転移または新脈管形成の阻害は、抗がん剤または化学療法剤の特性であることが多い。化学療法剤は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤であってもよい。用語「細胞増殖抑制剤」は、細胞成長および／または細胞の増殖を阻害または抑制する作用物質を指す。

【００３５】

「細胞傷害剤」は、アルキル化剤、腫瘍壊死因子阻害剤、干渉物質、微小管阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、およびトポイソメラーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない、主として、細胞の機能に直接干渉することによって細胞死を引き起こす化合物を指す。本明細書において使用される「毒素負荷量」は、細胞に送達される場合に、細胞死をもたらす、十分な量の細胞傷害剤を指す。毒素負荷量の送達は、本発明の抗体または抗原結合断片および細胞傷害剤を含む、十分な量の免疫結合体の投与によって行われてもよい。毒素負荷量の送達はまた、細胞傷害剤を含む、十分な量の免疫結合体の投与によって行われてもよく、免疫結合体は、本発明の抗体または抗原結合断片を認識し、かつ結合する第２の抗体またはその抗原結合断片を含む。

【００３６】

本明細書において使用されるように、語句「から誘導される」または「指定される配列に対して特異的な」配列は、たとえば、指定される配列の隣接領域に対応する、つまり同一であるまたは相補的である、おおよそ、少なくとも６個のヌクレオチドもしくは少なくとも２個のアミノ酸、少なくとも約９個のヌクレオチドもしくは少なくとも３個のアミノ酸、少なくとも約１０～１２個のヌクレオチドもしくは４個のアミノ酸、または少なくとも約１５～２１個のヌクレオチドもしくは５～７個のアミノ酸の隣接配列を含む配列を指す。ある実施形態では、配列は、指定されるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をすべて含む。配列は、当技術分野における公知の技術によって決定される、特定の配列に特有である配列領域に相補的であってもよい（ポリヌクレオチド配列の場合には）または同一であってもよい。配列が誘導されてもよい領域は、特異的なエピトープをコードする領域、ＣＤＲをコードする領域、フレームワーク配列をコードする領域、定常ドメイン領域をコードする領域、可変ドメイン領域をコードする領域、ならびに非翻訳および／または非転写領域を含むが、これらに限定されない。誘導配列は、必ずしも、研究中の、対象の配列から物理的に誘導されないが、ポリヌクレオチドが誘導される領域（複数可）中の塩基

の配列によって提供される情報に基づく、化学合成、複製、逆転写、または転写を含むが、これらに限定されない、任意の方法において生成されてもよい。そのため、それは、元のポリヌクレオチドのセンスまたはアンチセンス配向のいずれかを表わしてもよい。さらに、指定される配列の領域に対応する領域の組み合わせは、意図される使用と一致するように、当技術分野において公知の方法において改変されても組み合わせられてもよい。たとえば、配列は、それぞれ、指定される配列の一部を含み、かつ指定される配列と同一でない領域により中断される２つ以上の隣接配列を含んでいてもよいが、指定される配列から誘導される配列を表わすように意図される。抗体分子に関して、「それから誘導される」は、比較抗体に機能的にまたは構造的に関連する抗体分子を含む、たとえば、「それから誘導される」は、類似するか、または実質的に同じ配列または構造物を有する、たとえば、同じまたは類似するＣＤＲ、フレームワーク領域または可変領域を有する抗体分子を含む。抗体についての「それから誘導される」はまた、隣接していても隣接していなくてもよいが、番号付け方式または一般的な抗体構造に対する相同性または三次元の近似に従って明確化または同定される、つまり、比較配列のＣＤＲまたはフレームワーク領域内の残基、たとえば１つ以上の、たとえば２、３、４、５、または６以上の残基をも含む。用語「それから誘導される」は、それから物理的に誘導されることに限定されないが、任意の方法による、たとえば他の抗体を設計するための、比較抗体由来の配列情報の使用による生成を含む。

【００３７】

本明細書において使用されるように、語句「によってコードされる」は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、そのポリペプチド配列またはその部分は、その核酸配列によってコードされるポリペプチド由来の少なくとも３～５個のアミノ酸、少なくとも８～１０個のアミノ酸、または少なくとも１５～２０個のアミノ酸のアミノ酸配列を含む。

【００３８】

２つの配列の間の「相同性」の計算は、以下のとおり実行することができる。配列は、最適な比較目的のためにアライメントされる（たとえば、ギャップは、最適なアライメントのために、第１のおよび第２のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入することができ、非相同配列は、比較目的のために無視することができる）。比較目的のためにアライメントされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、４０％、または５０％、少なくとも６０％、または少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％、１００％である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドは、比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、分子は、その位置で同一となる（本明細書において使用されるように、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と等価である）。２つの配列の間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【００３９】

配列の比較および２つの配列の間の相同性パーセントの決定は、数学的なアルゴリズムを使用して行うことができる。２つのアミノ酸配列の間の相同性パーセントは、当技術分野において公知の任意の方法を使用して決定することができる。たとえば、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．　４８巻：４４４～４５３頁（１９７０年））アルゴリズムは、Ｂｌｏｓｓｕｍ　６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれかおよび１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップウェイト（ｇａｐ　ｗｅｉｇｈｔ）および１、２、３、４、５、または６の長さウェイト（ｌｅｎｇｔｈ　ｗｅｉｇｈｔ）を使用するＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラムに組み込んでいる。２つのヌクレオチド配列の間の相同性パーセントはまた、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックスおよび４０、５０、６０、７０、または８０のギャップウ

ェイトおよび１、２、３、４、５、または６の長さウェイトを使用するＧＣＧソフトウェアパッケージ（Ａｃｃｅｌｅｒｙｓ，Ｉｎｃ．　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）中のＧＡＰプログラムを使用して決定することもできる。相同性の決定のためのパラメータの例示的なセットは、１２のギャップペナルティー、４のギャップ伸長ペナルティー、および５のフレームシフトギャップペナルティーを用いるＢｌｏｓｓｕｍ　６２スコアリングマトリックスである。

【００４０】

本明細書において使用されるように、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を実行するための手引きは、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｎ．Ｙ．（１９８９年）、６．３．１－６．３．６において見出すことができる。水性および非水性の方法は、その参考文献において記載されており、どちらでも使用することができる。本明細書において言及される特異的なハイブリダイゼーション条件は、以下のとおりである：１）少なくとも５０℃での０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での２回の洗浄が後続する、約４５℃での、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中での低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件（洗浄の温度は、低ストリンジェンシー条件については５５℃まで上昇させることができる）；２）６０℃での０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄が後続する、約４５℃での、６×ＳＳＣ中での中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；３）６５℃での０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄が後続する、約４５℃での、６×ＳＳＣ中での高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；および４）超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、６５℃での０．５Ｍリン酸ナトリウム、７％ＳＤＳであり、６５℃での、０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳでの１回以上の洗浄が後続する。超高ストリンジェンシー条件（４）は、多くの場合、好ましい条件であり、別段の定めがない限り使用されるべきものである。

【００４１】

本発明の抗体およびその抗原結合断片は、ポリペプチドの機能に実質的な影響を有していないさらなる保存的置換または非必須アミノ酸置換を有していてもよいことが理解される。特定の置換が許容されるかどうかは、つまり、結合活性などの所望の生物学的特性に有害な影響を及ぼさないかどうかは、Ｂｏｗｉｅ，　ＪＵら　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７巻：１３０６～１３１０頁（１９９０年）またはＰａｄｌａｎら　ＦＡＳＥＢ　Ｊ．　９巻：１３３～１３９頁（１９９５年）に記載のとおり決定することができる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似する側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられる置換である。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（たとえばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（たとえばアスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（たとえばアスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（たとえばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（たとえばトレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（たとえばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。

【００４２】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を消失させることなくまたは生物学的活性を実質的に改変することなく、結合剤、たとえば抗体の野生型配列から改変することができる残基であるのに対して、「必須」アミノ酸残基は、そのような変化をもたらす。抗体において、必須アミノ酸残基は、特異性決定残基（ＳＤＲ）とすることができる。

【００４３】

本明細書において使用されるように、用語「単離された」は、その元の環境（たとえば、それが天然に存在する場合、天然の環境）から取り出される物質を指す。たとえば、生

きている動物に存在する、天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然の系において共存する物質のうちのいくつかまたはすべてから分離されたその同じポリヌクレオチドまたはＤＮＡまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部とすることができそして／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物（たとえば混合物、溶液、または懸濁物）またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを含む単離細胞もしくは培養細胞を含む組成物の一部とすることができ、ベクターまたは組成物がその天然の環境の一部ではないという点でなお単離されているものとすることができる。

【００４４】

本明細書において使用されるように、用語「レプリコン」は、細胞内でポリヌクレオチド複製の自律的な単位として振る舞う、プラスミド、染色体、またはウイルスなどの任意の遺伝因子を指す。

【００４５】

本明細書において使用されるように、用語「作動可能に連結された」は、記載される構成要素が、それらの意図される方法においてそれらが機能するのを可能にする関係にある状況を指す。したがって、たとえば、コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合性の条件下で達成される方法でライゲーションされる。

【００４６】

本明細書において使用されるように、用語「ベクター」は、連結されたセグメントの複製および／または発現を引き起こすためなどの、他のポリヌクレオチドセグメントが連結されるレプリコンを指す。

【００４７】

本明細書において使用されるように、用語「制御配列」は、それがライゲーションされるコード配列の発現を達成するのに必要なポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存して異なる。原核生物において、そのような制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターならびにいくつかの場合においてエンハンサーを含む。したがって、用語「制御配列」は、最低でも、その存在が発現に必要である構成要素をすべて含むように意図され、また、その存在が有利であるさらなる構成要素、たとえばリーダー配列を含んでいてもよい。

【００４８】

本明細書において使用されるように、用語「精製産物」は、産物が通常関連している細胞構成成分からおよび／または対象の試料に存在し得る他のタイプの細胞から単離された、産物の調製物を指す。

【００４９】

本明細書において使用されるように、用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質の決定因子（ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｅ）を指す。エピトープ決定因子は、普通、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的活性表面の群から成り、普通、特異的な三次元構造の特徴ならびに特異的な電荷の特徴を有する。いくつかのエピトープは、線状エピトープであるが、他のものは、高次構造エピトープである。線状エピトープは、隣接アミノ酸一次配列が、認識されるエピトープを含むエピトープである。線状エピトープは、典型的に、少なくとも３個、より普通には、少なくとも５個、たとえば約８～約１０個の隣接アミノ酸を含む。高次構造的なエピトープは、ａ）たとえばリガンド結合に依存するもしくはシグナル伝達分子による修飾（たとえばリン酸化）に依存するあるタンパク質高次構造においてのみ抗体結合に曝露される線状配列；またはｂ）タンパク質の１つを超える部分由来の、もしくは多サブユニットタンパク質における１つを超えるサブユニット由来の、構造の特徴（その特徴は、結合に参加するのに、３次元空間において十分に極めて接近している）の組み合わせなどの少なくとも２つの状況に起因し得る。

【００５０】

本明細書において使用されるように、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によっ

てコードされる抗体クラス（たとえばＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【００５１】

本明細書において使用されるように、用語「検出可能な作用物質」、「標識」、または「標識された」は、ポリペプチドまたは糖タンパク質上の検出可能なマーカーの組み込みを指すために使用される。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当技術分野において公知であり、それらが使用されてもよい。ポリペプチドについての標識の例は、以下を含むが、これらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（たとえばインジウム（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素（^{131}Ｉもしくは^{125}Ｉ）、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、ビスマス（^{212}Ｂｉもしくは^{213}Ｂｉ）、硫黄（^{35}Ｓ）、炭素（^{14}Ｃ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、ロジウム（^{188}Ｒｈ）、テクネチウム（^{99m}Ｔｃ）、プラセオジム、またはリン（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｕｓ）（^{32}Ｐ）または陽電子放出放射性核種、たとえば炭素１１（^{11}Ｃ）、カリウム４０（^{40}Ｋ）、窒素１３（^{13}Ｎ）、酸素１５（^{15}Ｏ）、フッ素１８（^{18}Ｆ）、およびヨウ素１２１（^{121}Ｉ））、蛍光標識（たとえばＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基（マークされたアビジン、たとえば、ストレプトアビジン成分および光学的な方法または熱量測定法によって検出することができる蛍光マーカーまたは酵素活性を含有する分子によって検出することができる）、ならびに第２のレポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（たとえばロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。いくつかの実施形態では、標識は、潜在的な立体障害を低下させるために様々な長さのスペーサーアームが付加される。

【００５２】

本明細書において使用されるように、「特異的な結合」、「特異的に結合する」、または「結合特異性」は、抗ＧＣＣ抗体分子については、抗体分子が、非ＧＣＣタンパク質、たとえばＢＳＡに結合するよりも大きな親和性でＧＣＣ、たとえばヒトＧＣＣタンパク質に結合することを意味する。典型的に、抗ＧＣＣ分子は、ＧＣＣ、たとえばヒトＧＣＣタンパク質に対するそのK_dの、２倍を超える、１０倍を超える、１００倍を超える、１，０００倍を超える、10^4倍を超える、10^5倍を超える、または10^6倍を超える、非ＧＣＣタンパク質、たとえばＢＳＡに対するK_dを有する。K_dの決定において、ＧＣＣおよび非ＧＣＣタンパク質、たとえばＢＳＡに対するK_dは、同じ条件下で行われるべきである。

【００５３】

本明細書において使用されるように、用語「処置する」または「処置」は、被験体、たとえば患者への抗ＧＣＣ抗体分子の投与またはたとえば、被験体に戻される、被験体由来の単離組織もしくは単離細胞への塗布による投与として定義される。抗ＧＣＣ抗体分子は、単独でまたは第２の作用物質と組み合わせて投与することができる。処置は、障害、障害の症状、または障害に対する素因、たとえばがんを治癒する、治す、軽減する、緩和する、改変する、いやす、回復させる、和らげる、改善する、またはそれに影響を及ぼすことであり得る。理論によって拘束されることを望むものではないが、処置は、ｉｎ ｖｉｔｒｏもしくはｉｎ ｖｉｖｏにおいて細胞の阻害、消失、もしくは死滅または別の方法では、細胞、たとえば異常な細胞が、障害、たとえば本明細書に記載の障害（たとえばがん）を媒介する能力の低下を引き起こすと考えられる。

【００５４】

本明細書において使用されるように、用語「被験体」は、哺乳動物、霊長類、ヒト、および非ヒト動物を含むように意図される。たとえば、被験体は、がん、たとえば胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）、がん、たとえば細胞のうちの少なくとも一部がＧＣＣを発現する胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）の症状、またはがん、たとえば細胞のうちの少なくとも一部がＧＣＣを発現する胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）に対する素因を有する患者（たとえばヒト患者または家畜患者）とすることができる。本発明の「非ヒト

動物」という用語は、特に断りのない限り、全ての非ヒト脊椎動物、たとえば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、ハ虫類などの、非ヒト哺乳動物および非哺乳動物を含む。一実施形態では、被験体は、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギの１つ以上のまたはすべてを除外する。

【００５５】

本明細書において使用されるように、障害を処置するのに「有効な」もしくは「十分な」抗ＧＣＣ抗体分子の量または「治療有効量」もしくは「治療的に十分な量」は、細胞、たとえばがん細胞（たとえばＧＣＣ発現腫瘍細胞）を処置するのに、またはそのような処置が存在しない場合に予想されるものを上回って、本明細書に記載の障害を有する被験体の治癒、軽減、緩和、もしくは改善を長くするのに、被験体へ１回または複数回の用量を投与することで有効である、抗体分子の量を指す。本明細書において使用されるように、腫瘍またはがんの「成長の阻害」は、その成長および／または転移を遅らせる、中断する、阻止する、または停止させることを指し、腫瘍成長の完全な排除を必ずしも示すものではない。

【００５６】

本明細書において使用されるように、「ＳＴＡＲ」、「ＧＵＣ２Ｃ」、「ＧＵＣＹ２Ｃ」、または「ＳＴ受容体」タンパク質としても公知である「ＧＣＣ」は、哺乳動物のＧＣＣ、好ましくはヒトＧＣＣタンパク質を指す。ヒトＧＣＣは、配列番号２２８において示されるタンパク質およびその天然に存在する対立遺伝子タンパク質改変体を指す。配列番号２２８における対立遺伝子は、配列番号２２７において示されるＧＣＣの核酸配列によってコードすることができる。他の改変体は、当技術分野において公知である。たとえば残基２８１にロイシンを有する受託番号Ｅｎｓｐ００００２６１１７０、Ｅｎｓｅｍｂｌ Ｄａｔａｂａｓｅ、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ＩｎｓｔｉｔｕｔｅおよびＷｅｌｌｃｏｍｅ Ｔｒｕｓｔ Ｓａｎｇｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ；米国特許出願公開第２００６００３５８５２号の配列番号１４；またはＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＡＢ１９９３４を参照されたい。典型的に、天然に存在する対立遺伝子改変体は、配列番号２２８のＧＣＣの配列と少なくとも９５％、９７％、または９９％同一であるアミノ酸配列を有する。転写物は、１０７３のアミノ酸のタンパク質産物をコードし、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００４９６３において記載される。ＧＣＣタンパク質は、膜貫通細胞表面受容体タンパク質として特徴付けられ、腸液、電解質の恒常性、および細胞増殖の維持に重要な役割を果たすと考えられる。

【００５７】

特に断りのない限り、用語「アルキル」は、約１～約２０個の炭素原子（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）を有する飽和直鎖状または分枝炭化水素を指し、約１～約８個の炭素原子が好ましい。アルキル基の例は、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｉｓｏ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、２－ペンチル、３－ペンチル、２－メチル－２－ブチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、ｎ－ノニル、ｎ－デシル、３－メチル－２－ブチル、３－メチル－１－ブチル、２－メチル－１－ブチル、１－ヘキシル、２－ヘキシル、３－ヘキシル、２－メチル－２－ペンチル、３－メチル－２－ペンチル、４－メチル－２－ペンチル、３－メチル－３－ペンチル、２－メチル－３－ペンチル、２，３－ジメチル－２－ブチル、および３，３－ジメチル－２－ブチルである。

【００５８】

アルキル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、「置換」されたものとして言及されてもよい。置換アルキル基は、－ハロゲン、－Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）$ＮＨ_{2}$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）$Ｎ（Ｒ’）_{2}$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－ＳＲ’、－$ＳＯ_{3}Ｒ’$、－$Ｓ（Ｏ）_{2}Ｒ’$、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、＝Ｏ、－$Ｎ_{3}$、－$ＮＨ_{2}$、－ＮＨ

（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基、好ましくは１～３つの基（およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基）で置換されたアルキル基であり、Ｒ’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、および－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル基は、必要に応じて、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’’、－ＳＲ’’、－ＳＯ$_3$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＨ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’’）、－Ｎ（Ｒ’’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基でさらに置換することができ、Ｒ’’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択される。

【００５９】

特に断りのない限り、用語「アルケニル」および「アルキニル」は、約２～約２０（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の炭素原子を有する直鎖状および分枝炭素鎖を指し、約２～約８個の炭素原子が好ましい。アルケニル鎖は、鎖に少なくとも１つの二重結合を有し、アルキニル鎖は、鎖に少なくとも１つの三重結合を有する。アルケニル基の例は、エチレンまたはビニル、アリル、－１－ブテニル、－２－ブテニル、－イソブチレニル、－１－ペンテニル、－２－ペンテニル、－３－メチル－１－ブテニル、－２－メチル－２－ブテニル、および－２，３－ジメチル－２－ブテニルを含むが、これらに限定されない。アルキニル基の例は、アセチレン、プロパルギル、アセチレニル、プロピニル、－１－ブチニル、－２－ブチニル、－１－ペンチニル、－２－ペンチニル、および－３－メチル－１ブチニルを含むが、これらに限定されない。

【００６０】

アルキル基と同様に、アルケニル基およびアルキニル基は置換され得る。「置換」アルケニル基またはアルキニル基は、－ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－ＳＲ’、－ＳＯ$_3$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、＝Ｏ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基、好ましくは１～３つの基（およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基）で置換された基であり、Ｒ’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル（ａｌｋｙｅｎｌ）、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、および－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル基は、必要に応じて、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’’、－ＳＲ’’、－ＳＯ$_3$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＨ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’’）、－Ｎ（Ｒ’’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の置換基でさらに置換することができ、Ｒ’’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択される。

【００６１】
特に断りのない限り、用語「アルキレン」は、約１～約８個の炭素原子が好ましいが、約１～約２０（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の炭素原子を有し、かつ親アルカンの同じまたは２つの異なる炭素原子からの２つの水素原子の除去によって得られる２つの一価ラジカル中心を有する飽和分枝ラジカルまたは直鎖炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン（ｏｃｙｔｙｌｅｎｅ）、ノニレン、デカレン、１，４－シクロヘキシレン、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。アルキレン基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、－ハロゲン、－Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）$ＮＨ_{2}$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）$Ｎ（Ｒ’）_{2}$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－ＳＲ’、－$ＳＯ_{3}$Ｒ’、－$Ｓ（Ｏ）_{2}$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、＝Ｏ、－$Ｎ_{3}$、－$ＮＨ_{2}$、－ＮＨ（Ｒ’）、－$Ｎ（Ｒ’）_{2}$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基、好ましくは１～３つの基（およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基）で必要に応じて置換することができ、Ｒ’は、それぞれ、－Ｈ、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル）、－アリール、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル、および－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル基は、必要に応じて、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル、－ハロゲン、－Ｏ－（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’’、－Ｃ（Ｏ）$ＮＨ_{2}$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’’、－Ｃ（Ｏ）$Ｎ（Ｒ’’）_{2}$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’’、－ＳＲ’’、－$ＳＯ_{3}$Ｒ’’、－$Ｓ（Ｏ）_{2}$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＨ、－$Ｎ_{3}$、－$ＮＨ_{2}$、－ＮＨ（Ｒ’’）、－$Ｎ（Ｒ’’）_{2}$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の置換基でさらに置換することができ、Ｒ’’は、それぞれ、－Ｈ、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル、または－アリールから独立して選択される。

【００６２】
特に断りのない限り、用語「アルケニレン」は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含有する、必要に応じて置換されるアルキレン基を指す。例示的なアルケニレン基は、たとえば、エテニレン（－ＣＨ＝ＣＨ－）およびプロペニレン（－ＣＨ＝ＣＨ$ＣＨ_{2}$－）を含む。

【００６３】
特に断りのない限り、用語「アルキニレン」は、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を含有する、必要に応じて置換されるアルキレン基を指す。例示的なアルキニレン基は、たとえばアセチレン（－Ｃ≡Ｃ－）、プロパルギル（－$ＣＨ_{2}$Ｃ≡Ｃ－）、および４－ペンチニル（－$ＣＨ_{2}ＣＨ_{2}ＣＨ_{2}$Ｃ≡ＣＨ－）を含む。

【００６４】
特に断りのない限り、用語「アリール」は、親芳香環系の単一の炭素原子からの１個の水素原子の除去によって得られる、６～２０（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の炭素原子の一価芳香族炭化水素ラジカルを指す。いくつかのアリール基は、例示的な構造において「Ａｒ」として表される。典型的なアリール基は、ベンゼン、置換ベンゼン、フェニル、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、およびその他同種のものから誘導されるラジカルを含むが、これらに限定されない。

【００６５】
アリール基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、－ハロゲン、－$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{8}$アルキル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルケニル、－$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{8}$アルキニル、－Ｏ－

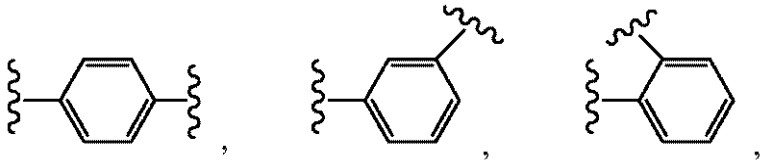
（C_1～C_8アルキル）、－O－（C_2～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、－アリール、－C（O）R’、－OC（O）R’、－C（O）OR’、－C（O）NH_2、－C（O）NHR’、－C（O）N（R’）$_2$、－NHC（O）R’、－SR’、－SO_3R’、－S（O）$_2$R’、－S（O）R’、－OH、－NO_2、－N_3、－NH_2、－NH（R’）、－N（R’）$_2$、および－CNを含むが、これらに限定されない１つ以上の、好ましくは１～５つの、またはさらに好ましくは１～２つの基で必要に応じて置換することができ、R’は、それぞれ、－H、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、O－（C_1～C_8アルキル）、－O－（C_2～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、および－アリール基は、必要に応じて、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、－ハロゲン、－O－（C_1～C_8アルキル）、－O－（C_2～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、－アリール、－C（O）R’’、－OC（O）R’’、－C（O）OR’’、－C（O）NH_2、－C（O）NHR’’、－C（O）N（R’’）$_2$、－NHC（O）R’’、－SR’’、－SO_3R’’、－S（O）$_2$R’’、－S（O）R’’、－OH、－N_3、－NH_2、－NH（R’’）、－N（R’’）$_2$、および－CNを含むが、これらに限定されない１つ以上の置換基でさらに置換することができ、R’’は、それぞれ、－H、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、または－アリールから独立して選択される。

【００６６】

特に断りのない限り、用語「アリーレン」は、二価の（つまり、親芳香環系の同じまたは２つの異なる炭素原子からの２つの水素原子の除去によって得られる）、必要に応じて置換されたアリール基を指し、例示的なアリール基としてフェニルを有する以下の構造において示されるようにオルト、メタ、またはパラ配置をとり得る。

【００６７】

【化６】



典型的な「－（C_1～C_8アルキレン）アリール」基、「－（C_2～C_8アルケニレン）アリール」基、および「－（C_2～C_8アルキニレン）アリール」基は、ベンジル、２－フェニルエタン－１－イル、２－フェニルエテン－１－イル、ナフチルメチル、２－ナフチルエタン－１－イル、２－ナフチルエテン－１－イル、ナフトベンジル、２－ナフトフェニルエタン－１－イル、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。

【００６８】

特に断りのない限り、用語「ヘテロ環」は、３～１４個の環原子を有する（環メンバーとも呼ばれる）単環式、二環式、または多環式環系を指し、少なくとも１つの環の少なくとも１つの環原子は、N、O、P、またはSから選択されるヘテロ原子（ならびにその中の炭素原子およびヘテロ原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）である。ヘテロ環は、N、O、P、またはSから独立して選択される１～４個の環ヘテロ原子を有することができる。ヘテロ環における１つ以上のN、C、またはS原子は、酸化されてもよい。単環式（ｍｏｎｏｃｙｌｉｃ）ヘテロ環は、好ましくは、３～７個の環メンバー（たとえば、２～６個の炭素原子、およびN、O、P、またはSから独立して選択される１～３個のヘテロ原子）を有し、二環式ヘテロ環は、好ましくは、５～１０個の環メンバー（たとえば、４～９個の炭素原子、およびN、O、P、またはSから独立して選択される１～３個のヘテロ原子）を有する。ヘテロ原子を含む環は、芳香族または非芳香族であり得る。特に断りのない限り、ヘテロ環は、安定した構造をもたらす任意の

ヘテロ原子または炭素原子においてそのペンダント基に結合する。

【００６９】

ヘテロ環は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ、「Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」（Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９６８年）、特に１、３、４、６、７、および９章；「Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ」（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９５０年から現在まで）、特に１３、１４、１６、１９、および２８巻；ならびにＪ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８２巻：５５６６頁（１９６０年）において記載されている。

【００７０】

特に断りのない限り、用語「ヘテロシクロ」は、二価の（つまり、親ヘテロ環式環系の同じまたは２つの異なる炭素原子からの２つの水素原子の除去によって得られる）、上記に定義される必要に応じて置換されるヘテロ環基を指す。

【００７１】

「ヘテロ環」基の例は、限定ではなく例として、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス－テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス－テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、６Ｈ－１，２，５－チアジアジニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、４Ｈ－カルバゾリル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル，フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、オキシンドリル、ベンゾオキサゾリニル、およびイサチノイルを含む。好ましい「ヘテロ環」基は、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、およびテトラゾリルを含むが、これらに限定されない。

【００７２】

ヘテロ環基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－ＳＲ’、－ＳＯ$_3$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基、好ましくは１～２つの基で必要に応じて置換することができ、Ｒ’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$

～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、および－アリール基は、必要に応じて、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、－ハロゲン、－O－（C_1～C_8アルキル）、－O－（C_2～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、－アリール、－C（O）R’’、－OC（O）R’’、－C（O）OR’’、－C（O）NH_2、－C（O）NHR’’、－C（O）N（R’’）$_2$、－NHC（O）R’’、－SR’’、－SO_3R’’、－S（O）$_2$R’’、－S（O）R’’、－OH、－N_3、－NH_2、－NH（R’’）、－N（R’’）$_2$、および－CNを含むが、これらに限定されない１つ以上の置換基でさらに置換することができ、R’’は、それぞれ、－H、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、またはアリールから独立して選択される。

【００７３】

限定ではなく例として、炭素結合ヘテロ環は、以下の位置で結合することができる：ピリジンの２、３、４、５、もしくは６位；ピリダジンの３、４、５、もしくは６位；ピリミジンの２、４、５、もしくは６位；ピラジンの２、３、５、もしくは６位；フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロール、もしくはテトラヒドロピロールの２、３、４、もしくは５位；オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの２、４、もしくは５位；イソオキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの３、４、もしくは５位；アジリジンの２もしくは３位；アゼチジンの２、３、もしくは４位；キノリンの２、３、４、５、６、７、もしくは８位；またはイソキノリンの１、３、４、５、６、７、もしくは８位。さらにより典型的に、炭素結合ヘテロ環は、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、５－ピリジル、６－ピリジル、３－ピリダジニル、４－ピリダジニル、５－ピリダジニル、６－ピリダジニル、２－ピリミジニル、４－ピリミジニル、５－ピリミジニル、６－ピリミジニル、２－ピラジニル、３－ピラジニル、５－ピラジニル、６－ピラジニル、２－チアゾリル、４－チアゾリル、または５－チアゾリルを含む。

【００７４】

限定ではなく例として、窒素結合ヘテロ環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、または１Ｈ－インダゾールの１位；イソインドールまたはイソインドリンの２位；モルホリンの４位；およびカルバゾールまたはβ－カルボリンの９位で結合することができる。さらにより典型的に、窒素結合ヘテロ環は、１－アジリジル、１－アゼテジル、１－ピロリル、１－イミダゾリル、１－ピラゾリル、および１－ピペリジニルを含む。

【００７５】

特に断りのない限り、用語「炭素環」は、３～１４（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の環原子を有する飽和または不飽和非芳香族単環式、二環式、または多環式環系を指し、環原子はすべて、炭素原子である。単環式炭素環は、好ましくは３～６個の環原子、さらにより好ましくは５または６個の環原子を有する。二環式炭素環は、たとえば、ビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］、もしくは［６，６］系として配置される好ましくは７～１２個の環原子またはビシクロ［５，６］もしくは［６，６］系として配置される９もしくは１０個の環原子を有する。用語「炭素環」は、たとえば、アリール環と縮合した単環式炭素環（たとえば、ベンゼン環と縮合した単環式炭素環）を含む。炭素環は、好ましくは、３～８個の炭素環原子を有する。

【００７６】

炭素環基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、たとえば、－ハロゲン、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、－O－（C_1～C_8アルキル）、－O－（C_2～C_8アルケニル）、－O－（C_2～C_8アルキニル）、－アリール、－C（O）R’、－OC（O）R’、－C（O）OR’、

－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－ＳＲ’、－ＳＯ$_3$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、＝Ｏ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の基、好ましくは、１または２個の基（およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基）で必要に応じて置換することができ、Ｒ’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択され、当該－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、および－アリール基は、必要に応じて、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－ハロゲン、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－アリール、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’’、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’’）$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’’、－ＳＲ’’、－ＳＯ$_3$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’’、－ＯＨ、－Ｎ$_3$、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（Ｒ’’）、－Ｎ（Ｒ’’）$_2$、および－ＣＮを含むが、これらに限定されない１つ以上の置換基でさらに置換することができ、Ｒ’’は、それぞれ、－Ｈ、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、または－アリールから独立して選択される。

【００７７】

単環式炭素環置換基の例は、－シクロプロピル、－シクロブチル、－シクロペンチル、－１－シクロペンター１－エニル、－１－シクロペンター２－エニル、－１－シクロペンター３－エニル、シクロヘキシル、－１－シクロヘキサ－１－エニル、－１－シクロヘキサ－２－エニル、－１－シクロヘキサ－３－エニル、－シクロヘプチル、－シクロオクチル、－１，３－シクロヘキサジエニル、－１，４－シクロヘキサジエニル、－１，３－シクロヘプタジエニル、－１，３，５－シクロヘプタトリエニル、および－シクロオクタジエニルを含む。

【００７８】

「カルボシクロ」は、単独でまたは他の基の一部として使用されるかどうかに関わらず、二価の（つまり、親炭素環系の同じまたは２つの異なる炭素原子からの２つの水素原子の除去によって得られる）、上記に定義される必要に応じて置換される炭素環基を指す。

【００７９】

文脈によって他に示されない限り、ハイフン（－）は、ペンダント分子への結合の場所を示す。したがって、用語「－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキレン）アリール」または「－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキレン（アリール）」は、本明細書において定義されるＣ$_1$～Ｃ$_8$アルキレンラジカルを指し、アルキレンラジカルは、アルキレンラジカルの炭素原子のいずれかのペンダント分子に結合し、アルキレンラジカルの炭素原子に結合した水素原子のうちの１つは、本明細書において定義されるアリールラジカルと置き換えられる。

【００８０】

特定の基が「置換される」場合、その基は、置換基のリストから独立して選択される１つ以上の置換基、好ましくは１～５個の置換基、より好ましくは１～３個の置換基、最も好ましくは１～２個の置換基を有していてもよい。しかしながら、基は、一般に、ハロゲンから選択される任意の数の置換基を有することができる。置換される基は、そのように示される。

【００８１】

分子における特定の位置の任意の置換基または変数の定義は、その分子において、その他の場所では、その定義と無関係であることが意図される。本発明の化合物上の置換基および置換パターンは、化学的に安定しており、当技術分野において公知の技術および本明細書に記載の方法によって容易に合成することができる化合物を提供するように当業者によって選択することができることが理解される。

【００８２】

本明細書において使用される保護基は、多官能化合物における一反応部位を一時的にまたは永久に選択的にブロックする基を指す。本発明における使用に適したヒドロキシ保護基は、薬学的に許容されるものであり、化合物が活性となるように、被験体への投与の後に親化合物から切断される必要があってもまたはなくてもよい。切断は、体内での正常な代謝プロセスを通してのものである。ヒドロキシ保護基は、当技術分野において周知であり、その全体がすべての目的のために参照によって本明細書において組み込まれるＴ．Ｗ．ＧｒｅｅｎｅおよびＰ．Ｇ．Ｍ．ＷｕｔｓによるＰＲＯＴＥＣＴＩＶＥ　ＧＲＯＵＰＳ　ＩＮ　ＯＲＧＡＮＩＣ　ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　ｓｏｎｓ、第３版）を参照されたい。また、これは、たとえば、エーテル（たとえば、アルキルエーテルおよびシリルエーテル（たとえばジアルキルシリルエーテル、トリアルキルシリルエーテル、ジアルキルアルコキシシリルエーテルを含む））、エステル、カーボネート、カルバメート、スルホネート、ならびにホスフェート保護基を含む。ヒドロキシ保護基の例は、メチルエーテル；メトキシメチルエーテル、メチルチオメチルエーテル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチルエーテル、ベンジルオキシメチルエーテル、ｐ－メトキシベンジルオキシメチルエーテル、ｐ－ニトロベンジルオキシメチルエーテル、ｏ－ニトロベンジルオキシメチルエーテル、（４－メトキシフェノキシ）メチルエーテル、グアイアコールメチルエーテル、ｔ－ブトキシメチルエーテル、４－ペンテニルオキシメチルエーテル、シロキシメチルエーテル、２－メトキシエトキシメチルエーテル、２，２，２－トリクロロエトキシメチルエーテル、ビス（２－クロロエトキシ）メチルエーテル、２－（トリメチルシリル）エトキシメチルエーテル、メントキシメチルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、１－メトキシシクロヘキシルエーテル、４－メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテル、４－メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテルＳ，Ｓ－ジオキシド、１－［（２－クロロ－４－メチル）フェニル］－４－メトキシピペリジン－４－イルエーテル、１－（２－フルオロフェニル）－４－メトキシピペリジン－４－イルエーテル、１，４－ジオキサン－２－イルエーテル、テトラヒドロフラニルエーテル、テトラヒドロチオフラニルエーテル；置換エチルエーテル（例えば、１－エトキシエチルエーテル、１－（２－クロロエトキシ）エチルエーテル、１－［２－（トリメチルシリル）エトキシ］エチルエーテル、１－メチル－１－メトキシエチルエーテル、１－メチル－１－ベンジルオキシエチルエーテル、１－メチル－１－ベンジルオキシ－２－フルオロエチルエーテル、１－メチル－１フェノキシエチルエーテルなど）、２－トリメチルシリルエーテル、ｔ－ブチルエーテル、アリルエーテル、プロパルギルエーテル、ｐ－クロロフェニルエーテル、ｐ－メトキシフェニルエーテル、ベンジルエーテル、ｐ－メトキシベンジルエーテル、３，４－ジメトキシベンジルエーテル、トリメチルシリルエーテル、トリエチルシリルエーテル、トリプロピルシリルエーテル、ジメチルイソプロピルシリルエーテル、ジエチルイソプロピルシリルエーテル、ジメチルヘキシルシリルエーテル、ｔ－ブチルジメチルシリルエーテル、ジフェニルメチルシリルエーテル、ベンゾイルホルマートエステル、アセタートエステル、クロロアセタートエステル、ジクロロアセタートエステル、トリクロロアセタートエステル、トリフルオロアセタートエステル、メトキシアセタートエステル、トリフェニルメトキシアセタートエステル、フェニルアセタートエステル、ベンゾアートエステル、アルキルメチルカルボネート、アルキル９－フルオレニルメチルカルボネート、アルキルエチルカルボネート、アルキル２，２，２，－トリクロロエチルカルボネート、１，１，－ジメチル－２，２，２－トリクロロエチルカルボネート、アルキルスルホネート、メタンスルホネート、ベンジルスルホネート、トシレート、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、およびｔ－ブチルメチリデンケタールを含むが、これらに限定されない。好ましい保護基は、式－Ｒ、－Ｓｉ（Ｒ）（Ｒ）（Ｒ）、－Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ（Ｒ）、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＨ、Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）$_2$、および－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）ＯＲによって表され、Ｒは、Ｃ$_1$～Ｃ$_{20}$アルキル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$アルケニル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$アルキニル、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{20}$アルキレン（炭素環）、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$アルケニレン（炭素環）、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$アルキニレン（炭素環）、－Ｃ$_6$～Ｃ$_{10}$アリール、－Ｃ$_1$～Ｃ$_{20}$アルキレン（アリール）、－Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$

アルケニレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（アリール）、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、または－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず必要に応じて置換される。

【００８３】

略語「ＡＦＰ」は、ジメチルバリン－バリン－ドライソロイイン－ドラプロイン－フェニルアラニン－ｐ－フェニレンジアミンを指す（下記式（ＸＶＩＩＩ）を参照されたい）。

【００８４】

略語「ＭＭＡＥ」は、モノメチルアウリスタチンＥを指す（下記式（ＸＩＩＩ）を参照されたい）。

【００８５】

略語「ＡＥＢ」は、アウリスタチンＥをパラアセチル安息香酸と反応させることによって生成されるエステルを指す（下記式（ＸＸＩＩ）を参照されたい）。

【００８６】

略語「ＡＥＶＢ」は、アウリスタチンＥをベンゾイル吉草酸と反応させることによって生成されるエステルを指す（下記式（ＸＸＩＩＩ）を参照されたい）。

【００８７】

略語「ＭＭＡＦ」は、モノメチルアウリスタチンＦを指す（下記式（ＸＸＩ）を参照されたい）。

抗体

特定の態様では、本発明は、表１および表２に要約されるものなどの特徴を有する抗ＧＣＣ抗体分子に関する。他の態様では、本発明は、表３、４、５、および／または６に要約されるものなどの特徴を有する抗ＧＣＣ抗体分子に関する。

【００８８】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトハイブリドーマ抗体であり、抗体５Ｆ９、５Ｈ３、６Ｈ８、８Ｃ２、１０Ｃ１０、１０Ｄ３、および１Ｄ３のうちの１つである。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、抗体５Ｆ９、５Ｈ３、６Ｈ８、８Ｃ２、１０Ｃ１０、１０Ｄ３、または１Ｄ３から誘導される。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ハイブリドーマ５Ｆ９（ＰＴＡ－８１３２）によって産生される。

【００８９】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、選択されたリンパ球抗体であり、抗体Ａｂｘ－１２、Ａｂｘ－０２０、Ａｂｘ－１０６、Ａｂｘ－１９８、Ａｂｘ－２２１、Ａｂｘ－２２９、Ａｂｘ－３３８、およびＡｂｘ－３９３のうちの１つである。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、抗体Ａｂｘ－１２、Ａｂｘ－０２０、Ａｂｘ－１０６、Ａｂｘ－１９８、Ａｂｘ－２２１、Ａｂｘ－２２９、Ａｂｘ－３３８、およびＡｂｘ－３９３から誘導される。

【００９０】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、マウス抗体であり、抗体ｍＡｂ　３Ｇ１、ｍＡｂ　８Ｅ１２、ｍＡｂ１０Ｂ８、およびｍＡｂ　８Ｆ１のうちの１つである。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、抗体ｍＡｂ　３Ｇ１、ｍＡｂ　８Ｅ１２、およびｍＡｂ　８Ｆ１から誘導される。

【００９１】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、たとえば、本明細書に記載の範囲において、直接結合アッセイまたは競合結合アッセイによって測定されるような、ＧＣＣへの親和性を有する。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、1×10^{-6}Ｍ未満、1×10^{-7}Ｍ未満、1×10^{-8}Ｍ未満、1×10^{-9}Ｍ未満、1×10^{-10}Ｍ未満、1×10^{-11}Ｍ未満、1×10^{-12}Ｍ未満、または1×10^{-13}Ｍ未満のK_dを有する。一実施形態では、抗体分子は、ＩｇＧまたはその抗原結合断片であり、1×10^{-6}Ｍ未満、１×

１０$^{-7}$Ｍ未満、１×１０$^{-8}$Ｍ未満、または１×１０$^{-9}$Ｍ未満のＫ$_d$を有する。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば５Ｆ９抗体またはそれから誘導される抗体は、約８０～約２００ｐＭ、好ましくは約１００～約１５０ｐＭまたは約１２０ｐＭのＫ$_d$を有する。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば５Ｆ９抗体またはそれから誘導される抗体は、約０．９～約１．２５×１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$、好ましくは約１．１×１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$のｋ$_a$を有する。一実施形態では、抗体分子は、ＳｃＦｖであり、１×１０$^{-6}$Ｍ未満、１×１０$^{-7}$Ｍ未満、１×１０$^{-8}$Ｍ未満、１×１０$^{-9}$Ｍ未満、１×１０$^{-10}$Ｍ未満、１×１０$^{-11}$Ｍ未満、１×１０$^{-12}$Ｍ未満、または１×１０$^{-13}$Ｍ未満のＫ$_d$を有する。

【００９２】

実施形態では、抗体分子は、免疫結合体ではない、つまり、「裸の」抗体分子であり、実施形態において、ＧＣＣへの結合に際して細胞反応を引き起こす。関連する実施形態では、細胞反応は、抗体が結合するＧＣＣ発現細胞によって実行される。そのような細胞反応は、たとえば、抗体分子がＧＣＣのアゴニストである場合、ＧＣＣによって媒介されるシグナル伝達とすることができる（たとえば米国特許出願公開ＵＳ２００４０２５８６８７を参照されたい。他の実施形態では、細胞反応は、第１の細胞上のＧＣＣに結合した抗体分子を認識する第２の細胞、たとえば免疫エフェクター細胞（たとえばナチュラルキラー細胞）によって実行される。いくつかの実施形態では、監視分子、たとえば補体分子は、細胞反応に先立って、ＧＣＣに結合した抗体分子と接触する。これらの実施形態における細胞反応は、ＧＣＣ発現細胞の死を引き起こすことができる。

【００９３】

さらなる実施形態では、免疫結合体である抗体分子は、ＧＣＣへの結合に際して細胞反応を引き起こすこともでき、内部移行して、それが結合するＧＣＣ発現細胞に作用物質を送達することもできる。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣへのリガンド結合をブロックすることができる。

【００９５】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ラットＧＣＣおよびマウスＧＣＣの一方または両方と実質的な交差反応を示さない。

【００９６】

一実施形態では、抗体分子は、ＧＣＣ：Ｂ１０でも、ＧＣＣ：４Ｄ７でも、ＧＣＣ：Ｃ８でもない。他の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣの細胞内ドメイン、配列番号２２８のアミノ酸残基約４５５～１０７３に結合しない。たとえば、この実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣのキナーゼ相同性ドメインまたはグアニリルシクラーゼドメインに結合しない。

【００９７】

天然に存在する哺乳動物の抗体構造単位は、四量体によって典型的に表される。それぞれの四量体は、２対のポリペプチド鎖から構成され、それぞれの対は、１つの「軽」鎖（約２５ｋＤａ）および１つの「重」鎖（約５０～７０ｋＤａ）を有する。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識を担う約１００～１１０以上のアミノ酸の可変領域を含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主として担う定常領域を定める。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖として分類することができる。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンとして分類することができ、それぞれ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥとして抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によってつながれ、重鎖はまた、約１０以上のアミノ酸の「Ｄ」領域をも含む。一般に、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　７章（Ｐａｕｌ，　Ｗ．編、第２版　Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．（１９８９年））を参照されたい。それぞれの軽／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。抗ＧＣＣ抗体分子についての好ましいアイ

ソタイプは、異なるガンマ重鎖を有する、４つのサブクラス、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４に分類することができるＩｇＧ免疫グロブリンである。ほとんどの治療用抗体は、ＩｇＧ１タイプのヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体である。特定の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ＩｇＧ１アイソタイプを有する。

【００９８】

それぞれの重鎖および軽鎖対の可変領域は、抗原結合部位を形成する。したがって、完全なＩｇＧ抗体は、同じである２つの結合部位を有する。しかしながら、二機能性または二重特異性抗体は、２つの異なる重／軽鎖対を有し、２つの異なる結合部位をもたらす人工ハイブリッド構築物である。

【００９９】

鎖はすべて、相補性決定領域またはＣＤＲとも呼ばれる３つの超可変領域によってつながれた比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）の同じ一般的な構造物を示す。それぞれの対の２つの鎖由来のＣＤＲは、フレームワーク領域に関して一列に並び、それにより特定のエピトープへの結合が可能となる。Ｎ末端からＣ末端に、軽鎖および重鎖の両方は、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、およびＦＲ４を含む。それぞれのドメインへのアミノ酸の割り当ては、ＫａｂａｔのＳｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．（１９８７年および１９９１年））またはＣｈｏｔｈｉａ ＆ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６巻：９０１～９１７頁（１９８７年）；Ｃｈｏｔｈｉａら Ｎａｔｕｒｅ ３４２巻：８７８～８８３頁（１９８９年）の定義に従う。本明細書において使用されるように、ＣＤＲは、重（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３）鎖および軽（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３）鎖のそれぞれについて言及される。

【０１００】

抗ＧＣＣ抗体分子は、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの重鎖および軽鎖の一方または両方のＣＤＲのすべてまたは抗原結合サブセットを含むことができる。可変領域およびＣＤＲを含むヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、およびマウス抗体部分のアミノ酸配列は、表３および表５に見出すことができる。

【０１０１】

したがって、一実施形態では、抗体分子は、

（ａ）上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの、１、２、３、または抗原結合数の軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、および／またはＬＣＤＲ３）。実施形態では、このＣＤＲ（複数可）は、以下のとおり、ＬＣＤＲ１～３の１個以上のまたはすべてのアミノ酸配列を含んでいてもよい：ＬＣＤＲ１または１～７個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＬＣＤＲ１）、ＬＣＤＲ２または１もしくは２個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＬＣＤＲ２）；またはＬＣＤＲ３または１もしくは２個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＬＣＤＲ３；ならびに

（ｂ）上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの、１、２、３、または抗原結合数の重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、および／またはＨＣＤＲ３）。実施形態では、このＣＤＲ（複数可）は、以下のとおり、ＨＣＤＲ１～３の１個以上のまたはすべてのアミノ酸配列を含んでいてもよい：ＨＣＤＲ１または１もしくは２個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＨＣＤＲ１；ＨＣＤＲ２または１～４個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＨＣＤＲ２；またはＨＣＤＲ３または１もしくは２個のアミノ酸が保存的に置換された改変ＨＣＤＲ３

の一方または両方を含む。

【０１０２】

抗ＧＣＣ抗体の産生に有用な免疫原は、ＧＣＣ、たとえばヒトＧＣＣ発現細胞（たとえば腫瘍細胞系、たとえばＴ８４細胞または新鮮なもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、ＧＣＣを発現する組換え細胞）；ＧＣＣ発現細胞の膜画分（たとえば結腸腫瘍細胞系、たとえ

ばＴ８４細胞または新鮮なもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、ＧＣＣを発現する組換え細胞、たとえば、完全長ＧＣＣまたはその部分を発現するＨＴ－２９－ＧＣＣ＃２細胞、たとえば、ＧＣＣの細胞外ドメイン、たとえば配列番号３１８を含む部分を発現するＣＨＯ　ＧＣＣ＃２７細胞）；単離または精製ＧＣＣ、たとえばヒトＧＣＣタンパク質（たとえば、たとえば、ＧＣＣを発現する胃腸腫瘍細胞または組換え細胞あるいはその改変体から単離された、生化学的に単離されたＧＣＣ）、またはその部分（たとえばＧＣＣの細胞外ドメイン、ＧＣＣのキナーゼ相同性ドメイン、またはＧＣＣのグアニリルシクラーゼ触媒ドメインまたはたとえば、配列番号２２８の少なくとも約８、１０、１２、１４、１６、２０、２４、２８、もしくは３２のアミノ酸残基を含むその部分に対応するペプチド）；または配列番号２２９を含むもしくはそのシグナル配列がない（つまり、配列番号２２９のアミノ酸残基１～約２１もしくは２３がない）その成熟部分を含む免疫原、たとえば成熟ＴＯＫ１０７－ｈＩｇＧタンパク質、配列番号３１７を含む。

【０１０３】

免疫原は、生化学的操作、精製、免疫、または抗体価測定を促進するために異種の配列に融合することができる。そのような免疫原は、ＧＣＣの一部、たとえば細胞外ドメインおよび非ＧＣＣポリペプチドを含む部分を含むことができる。精製を容易にするまたは固体支持体、たとえばアフィニティーカラム、マイクロタイタープレート、もしくは他の適したアッセイ基材／チップ上への固定を容易にするために、多くの選択肢が、融合タンパク質の構築に関して存在する。たとえば、融合成分は、ドメイン、たとえば、グルタチオンに結合することができるグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／キナーゼ（ＧＳＴ）；プロテインＡもしくはプロテインＧに結合することができる免疫グロブリンのＦｃ領域；アフィニティーカラム上のニッケルもしくはコバルトに結合することができるアミノ酸残基、たとえば２、３、４、５、好ましくは６つのヒスチジン残基；エピトープタグ、たとえば、タグ特異的抗体に結合することができるｃ－ｍｙｃがん遺伝子（ｍｙｃ－タグ）、ＦＬＡＧタグ（米国特許第４，７０３，００４号）、赤血球凝集素（ＨＡ）タグ、Ｔ７遺伝子１０タグ、Ｖ５タグ、ＨＳＶタグ、もしくはＶＳＶ－Ｇタグの一部；または補因子、たとえば、ストレプトアビジンに結合することができるビオチンを追加することができる。

【０１０４】

免疫グロブリンのＦｃ部分を含む免疫原は、効率的な抗体生成のために宿主免疫監視構成要素によってＧＣＣのエピトープへの構造的な到達を可能にする配置で、溶解した状態でまたは細胞に付加された状態で、ＧＣＣを保持することができる。Ｆｃ領域を含む免疫グロブリン重鎖が、会合して、鎖間ジスルフィド結合を通して二量体になるので、Ｆｃ領域を有する融合物に起因する免疫原は、二量体となる。融合タンパク質の価（ｖａｌｅｎｃｙ）は、Ｆｃ領域を提供する免疫グロブリンのタイプを反映することができる。たとえば、ＩｇＧタンパク質を有する融合物は、二量体であり得、ＩｇＡ融合物は、四量体の免疫原を作製することができ、ＩｇＭ融合物は、十量体の免疫原を作製することができ、後者の２つは、Ｊ鎖の同時トランスフェクションにより促進される。Ｆｃ融合タンパク質についての例示的な免疫グロブリンは、ＩｇＧ１である。典型的に使用される部分は、単一のエクソンによってコードされるＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインを有する。このエクソンはまた、軽鎖由来のシステインとのジスルフィド結合に適応したシステインを有する、ＣＨ１領域の一部をも有するので、有用な改変は、対でないシステインが融合タンパク質にないことを確実にするために、ＣＨ１システインをたとえばセリンに変異させることである。そのような変異はまた、ヒンジの可撓性を増加させもする。

【０１０５】

宿主種、たとえばマウス、ラット、ウサギ、ヤギにおける免疫のために免疫原に融合させるための、非宿主種から誘導されるＦｃ部分、たとえばヒトＩｇ　Ｆｃ領域は、アジュバントとして作用する。このアジュバント機能は、ＦｃエピトープおよびＧＣＣエピトープの両方に対して特異的な抗体を誘発することができる。Ｆｃ反応性の抗体は、スクリーニングの間に同定し、廃棄することができる。Ｆｃ部分は、野生型配列またはエフェクタ

ー機能を改変するために変異させる配列を有することができる。たとえば、変異させた定常領域（改変体）は、Ｆｃ受容体への結合および／または補体を固定するための能力を最小限にするために、融合タンパク質に組み込むことができる（たとえばＷｉｎｔｅｒら、ＧＢ　２，２０９，７５７　Ｂ；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＷＯ　８９／０７１４２；Ｍｏｒｇａｎら、ＷＯ　９４／２９３５１を参照されたい）。好ましい実施例では、Ｆｃ領域の基準に従って番号付けされたリシン２３５およびグリシン２３７は、たとえばアラニンに変異させる。Ｆｃ変異ＩｇＧを有する免疫原／融合タンパク質は、宿主においてＦｃ受容体との相互作用を低下させることができる。好ましい可溶性免疫原融合タンパク質（シグナルペプチドを切断するための成熟および分泌の後の）は、ＴＯＫ－１０７－ｈＩｇＧ（代替の名称ｈＧＣＣ－ＥＣＤ／ｈＩｇＧ１　Ｆｃ）であり、これは、変異ヒトＩｇＧ１免疫グロブリンＦｃ（配列番号３１７）に融合された配列番号２２８のアミノ酸残基２４～４３０から成る。

【０１０６】

細胞発現免疫原を調製するために、免疫グロブリン部分は、Ｂ細胞受容体の免疫グロブリン部分を模倣するように構築することができる。たとえば、免疫グロブリンＦｃ領域は、Ｆｃγ受容体、Ｆｃα受容体、Ｆｃα／μ受容体、またはＦｃε受容体などの免疫受容体由来の膜貫通領域を含むポリペプチドにさらに融合することができる。そのようなＦｃ受容体細胞結合免疫原の適切な配向は、細胞表面上の適切な露出と共に、免疫原融合タンパク質を発現する細胞が抗原受容体複合体、たとえばＢ細胞ＩｇＭ受容体またはＩｇＤ受容体のさらなる構成要素をさらに含む場合、改善され得る。複合体の適した構成要素は、ヘテロ二量体を形成する、ＭＢ－１およびＢ２９などの免疫グロブリン（Ｉｇ）シースタンパク質（ｓｈｅａｔｈ　ｐｒｏｔｅｉｎ）を含む（ＩｇＭ受容体についてはＣＤ７９ＡおよびｃＤ７９Ｂ；Ｈｏｍｂａｃｈら　Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２０巻：２７９５～２７９９頁（１９９０年））。Ｉｇシースタンパク質は、たとえば、Ｂ細胞リンパ腫細胞系をトランスフェクトする場合、トランスフェクト細胞によって；またはたとえば別個のベクターもしくは同じベクターにおけるシースタンパク質との免疫原の同時トランスフェクションによって、内因的に提供することができる。マウスにおける免疫のための好ましいＩｇＧシースタンパク質は、マウスＣＤ７９ａおよびＣＤ７９ｂ（それぞれＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ＿００７６５５およびＮＭ＿００８３３９）である。好ましい細胞結合免疫原融合タンパク質（シグナルペプチドを切断するための成熟および細胞表面への移行の後の）は、マウスＩｇＧ２ａ（たとえばＧｅｎＰｅｐｔ受託番号ＡＡＢ５９６６１）膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン（配列番号３１８）に融合されたＴＯＫ－１０７ｈＩｇＧ（ｈＧＣＣ－ＥＣＤ／ｈＩｇＧ１　Ｆｃ）から成るＴＯＫ１１１産物である。

【０１０７】

抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば本明細書に記載のモノクローナル抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体が結合することができる有用なエピトープ、たとえばＧＣＣ分子由来の参照エピトープは、ＧＣＣの細胞外部分に見出すことができる。そのようなＧＣＣのエピトープは、細胞の表面上で、たとえば細胞外部で、抗体分子に結合することができる。

【０１０８】

たとえば、抗ＧＣＣ抗体分子に対するエピトープは、配列番号２２８の残基１～５０または本発明の抗ＧＣＣ抗体分子に結合するその断片、たとえばその５Ｆ９結合断片由来の残基（複数可）内に存在するか、またはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号２２８の残基１～２５、５～３０、１０～３５、１５～４０、２０～４５、２５～５０、５～４５、１０～４０、１５～３５、２０～３０、または３３～５０を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば５Ｆ９抗体についてのエピトープは、残基５０以降のＧＣＣアミノ酸配列における、つまり、配列番号２２８の残基約５０～１０７３から選択される、１つ以上のさらなるアミノ酸残基をさらに含む高次構造エピトープである。

【０１０９】

他の実施例では、抗ＧＣＣ抗体分子についてのエピトープは、配列番号２２５または配

列番号２２８の残基２７１～３００または本発明の抗ＧＣＣ抗体分子に結合するその断片、たとえばそのＡＢＸ－１９８－結合断片、３Ｇ１－結合断片、８Ｆ１－結合断片、または１０Ｂ８結合断片由来の残基（複数可）内に存在するまたはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号２２８の残基２８１～２９０もしくは配列番号２２８の残基２８１～２９０（ここで、残基２８１はロイシンである）または配列番号２２８の残基２８１～３００もしくは残基２７１～２９０を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえばＡＢＸ－１９８－抗体、３Ｇ１－抗体、８Ｆ１－抗体、または１０Ｂ８抗体についてのエピトープは、１つ以上のさらなるアミノ酸残基、つまり、たとえば、配列番号２２８の残基約１～２７０および／または約３０１～１０７３から選択される、ＧＣＣアミノ酸配列における、配列番号２２５でない残基をさらに含む高次構造エピトープである。

【０１１０】

他の実施例では、抗ＧＣＣ抗体分子についてのエピトープは、配列番号２２６または配列番号２２８の残基３５１～３７５または本発明の抗ＧＣＣ抗体分子に結合するその断片、たとえばそのＡＢＸ－０１２－結合断片、ＡＢＸ－３３８－結合断片、またはＡＢＸ－１０６結合断片由来の残基（複数可）内に存在するまたはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号２２８の３５６～３７０または配列番号２２８の残基３５１～３７０または配列番号２２８の残基３５６～３７５を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえばＡＢＸ－０１２－抗体、ＡＢＸ－３３８－抗体、またはＡＢＸ－１０６抗体についてのエピトープは、１つ以上のさらなるアミノ酸残基、つまり、たとえば、配列番号２２８の残基約１～３５０および／または約３７６～１０７３から選択される、ＧＣＣアミノ酸配列における、配列番号２２６でない残基をさらに含む高次構造エピトープである。

【０１１１】

そのようなエピトープまたは細胞外ドメイン、たとえば、配列番号２２８のアミノ酸残基２４～４２０またはその参照部分、たとえばＧＣＣの残基２４～７５、７５～１５０、１５０～２２５、２２５～３００、３００～３７５、もしくは３７５～４２０由来の残基（複数可）内に存在するもしくはそれを含むエピトープに対して産生される抗体、またはそれから誘導される抗体分子は、本明細書に記載のとおり、治療用抗体または診断用抗体として有用であり得る。

【０１１２】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、１つ以上の以下の特性を有する：

ａ）それは、結合について、たとえば、細胞表面ＧＣＣまたは精製ＧＣＣへの結合について、表１および表２に要約される上記に参照される抗ＧＣＣ抗体分子のうちの１つ、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば５Ｆ９）、選択されたリンパ球抗体（たとえばＡｂｘ－２２９）、またはマウス抗体（たとえば３Ｇ１）と競合する；

ｂ）それは、表１および表２に要約される上記に参照される抗ＧＣＣ抗体分子のうちの１つとして、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば５Ｆ９）、選択されたリンパ球抗体（たとえばＡｂｘ－２２９）、またはマウス抗体（たとえば３Ｇ１）として、同じまたは実質的に同じ、ＧＣＣのエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は同じエピトープに結合するが、それは１つ以上のペプチドアレイアッセイによって決定されるとおりであるかまたはたとえば、細胞表面上に発現される切断変異体、キメラ、もしくは点変異体または膜調製物への結合によって決定されるとおりであり、それらのアッセイは本明細書に記載のとおりである；

ｃ）それは、表１および表２に要約される上記に参照される抗ＧＣＣ抗体分子のうちの１つ、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば５Ｆ９）、選択されたリンパ球抗体（たとえばＡｂｘ－２２９）、またはマウス抗体（たとえば３Ｇ１）のエピトープと共通の、少なくとも１、２、３、４、５、８、１０、１５、または２０の隣接アミノ酸残基を有するエピトープに結合する；

ｄ）それは、本発明の抗ＧＣＣ抗体が結合するヒトＧＣＣの領域に結合し、その領域、た

とえば細胞外領域または細胞質領域は、長さが１０～１５、１０～２０、２０～３０、または２０～４０の残基であり、その結合は、たとえば、切断変異体への結合によって決定される。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトＧＣＣの細胞外領域に結合する。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、配列番号２２８のアミノ酸残基２４～４２０によって定められる細胞外ドメインのヒトＧＣＣの部分に結合することができる。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、配列番号２２８のアミノ酸残基９３１～９５４のグアニル酸シクラーゼ識別特性部位（ｓｉｇｎａｔｕｒｅ　ｓｉｔｅ）に結合することができる；または

ｅ）それは、本明細書に記載の参照エピトープに結合する。

【０１１３】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣ配列ＩＬＶＤＬＦＮＤＱＹＦＥＤＮＶＴＡＰＤＹＭＫＮＶＬＶＬＴＬＳ（配列番号２２５）に結合する。

【０１１４】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣ配列ＦＡＨＡＦＲＮＬＴＦＥＧＹＤＧＰＶＴＬＤＤＷＧＤＶ（配列番号２２６）に結合する。

【０１１５】

一実施形態では、抗体分子は、高次構造エピトープに結合する。他の実施形態では、抗体分子は、線状エピトープに結合する。

【０１１６】

抗ＧＣＣ抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、キメラ抗体（米国特許第６，０２０，１５３号を参照されたい）、またはヒト抗体もしくはヒト化抗体、またはその抗体断片もしくは誘導体とすることができる。前述のもののいずれかの合成改変体または遺伝子操作された改変体（米国特許第６，３３１，４１５号を参照されたい）もまた、本発明によって企図される。モノクローナル抗体は、従来のマウスモノクローナル抗体の方法論、たとえば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ　２５６巻：４９５頁（１９７５年）の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む様々な技術によって産生することができる。一般にＨａｒｌｏｗ，　Ｅ．およびＬａｎｅ，　Ｄ．（１９８８年）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹを参照されたい。

【０１１７】

タンパク質、たとえばＧＣＣまたは可溶性部分またはＧＣＣの一部を含む融合タンパク質（たとえばＴＯＫ１０７－ｈＩｇ）、または細胞もしくはそれ由来の膜画分、たとえば、表面露出ＧＣＣもしくはその部分（たとえばｐＬＫＴＯＫ４産物もしくはｐＬＫＴＯＫ１１１産物）を発現する細胞を用いる免疫は、応答を誘導する方法において、たとえば、アジュバント、たとえばフロイント完全アジュバントと共に、注射のために調製された免疫原を用いて実行することができる。他の適したアジュバントは、ＴＩＴＥＲＭＡＸ　ＧＯＬＤ（登録商標）アジュバント（ＣＹＴＲＸ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ、ＣＡ）およびミョウバンを含む。低分子ペプチド免疫原は、キーホールリンペットヘモシニアンなどのより大きな分子に連結することができる。マウスは、多くの部位に、たとえば腹膜（ｉ．ｐ．）、尾のつけ根、もしくは足蹠、または部位の組み合わせ、たとえばｉＰおよび尾のつけ根（ＢＩＰ）に、多くの方法で、たとえば皮下、静脈内、または筋肉内に、注射することができる。ブースター注射は、同じまたは異なる免疫原を含むことができ、アジュバント、たとえばフロイント不完全アジュバントをさらに含むことができる。ＤＮＡ、たとえば、ＧＣＣまたはその部分もしくはＧＣＣまたはその部分を含む融合タンパク質をコードする（たとえばＴＯＫ１０７－ｈＩｇをコードする）ＤＮＡを用いる免疫は、遺伝子銃技術を使用して注射することができる。たとえば、ＤＮＡは、微視的金粒子上に負荷され、短い期間にわたって、頻繁な間隔でマウスに注射される。

【０１１８】

一般に、モノクローナル抗体が所望される場合、ハイブリドーマは、不死細胞系由来の

適した細胞（たとえばＳＰ２／０、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、またはヘテロミエローマなどのミエローマ細胞系）を抗体産生細胞と融合することによって産生される。抗体産生細胞は、ヒトの末梢血または好ましくは脾臓もしくはリンパ節、ヒト抗体トランスジェニック動物、または対象の抗原を用いて免疫された他の適した動物から得ることができる。ヒト起源の抗体（たとえばヒト抗体）を産生する細胞は、適した方法、たとえば、ヒト抗体産生細胞およびヘテロミエローマもしくはトリオーマ（ｔｒｉｏｍａ）の融合またはエプスタイン－バーウイルスによる感染を介しての活性化ヒトＢ細胞の不死化を使用して産生することができる（たとえば米国特許第６，１９７，５８２号（Ｔｒａｋｈｔ）；Ｎｉｅｄｂａｌａら、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１７巻：２９９～３０４頁（１９９８年）；Ｚａｎｅｌｌａら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、１５６巻：２０５～２１５頁（１９９２年）；Ｇｕｓｔａｆｓｓｏｎら、Ｈｕｍ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ、２巻：２６～３２頁（１９９１年）を参照されたい）。融合または不死化抗体産生細胞（ハイブリドーマ）は、選択的培養条件を使用して単離し、限界希釈法によってクローニングすることができる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適したアッセイを使用して同定することができる（たとえばＥＬＩＳＡ（たとえばマイクロタイターウェル上に固定された免疫原、たとえばＴＯＫ１０７－ｈＩｇＧを用いる）またはＧＣＣもしくはその部分を発現する細胞、たとえばｐＬＫＴＯＫ１１１産物を発現する細胞に対するＦＡＣＳによって）。たとえば、ＧＣＣ免疫原が親和性試薬である融合成分を含む場合、この成分は、ＧＣＣを含む融合タンパク質またはその部分がマトリックス、たとえばプロテインＧコート、ストレプトアビジンコート、グルタチオン誘導体化、または抗体コートマイクロタイタープレートまたはアッセイチップに結合するのを可能にすることができ、これは、次いで、免疫血清またはハイブリドーマもしくは抗体発現組換え細胞由来の順化培地と組み合わせられ、その混合物は、複合体形成を促す条件下で（たとえば塩およびｐＨについての生理学的条件で）培養される。インキュベーションに続いて、マイクロタイタープレートウェルまたはチップの細胞は、あらゆる非結合構成要素を除去するために洗浄され、抗ＧＣＣ抗体による結合が測定される。

【０１１９】

実施形態では、治療上の適用については、本発明の抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。ヒト抗体またはヒト化抗体の利点は、それらが、宿主レシピエントにおける抗体の免疫原性を潜在的に減少させまたは排除し、生物学的利用能の増加および有害な免疫反応の可能性の低下を可能にし、したがって、潜在的に、複数回の抗体投与を可能にすることである。

【０１２０】

改変抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはＣＤＲ移植抗体を含む。ヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）応答により、キメラ抗体または別の方法でヒト化抗体の開発に至った。キメラ抗体は、ヒト定常領域およびマウス可変領域を有するが、特に、抗体の慢性的なまたは多用量の利用において、ある種のヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）応答が観察されるということが予想される。そのようなマウスまたはラット誘導タンパク質の存在は、抗体の急速な排除をもたらし得るか、あるいは患者による抗体に対する免疫応答の生成をもたらし得る。マウスまたはラット誘導抗体の利用を回避するために、配列が抗体配列に導入され、その抗体配列をヒト抗体配列により近いものにしたヒト化抗体またはげっ歯動物ヘヒト抗体機能を導入することによって生成される完全ヒト抗体が開発され、それによりげっ歯動物が完全ヒト配列を有する抗体を産生するようになった。ヒト抗体は、マウス、ウサギ、またはラットの可変領域および／または定常領域を有する抗体と関連するいくつかの問題を回避する。

ヒト抗体

完全ヒト抗体分子は、マウスｍＡｂまたはマウス誘導体化ｍＡｂに固有の免疫原性応答およびアレルギー性応答を最小限にし、したがって、投与される抗体の効力および安全性を増加させることができる。完全ヒト抗体分子の使用は、繰り返しの抗体投与を必要とする、炎症、自己免疫、およびがんなどの、慢性的なおよび再発性のヒト疾患の処置におい

て実質的な利点を提供することができる。さらに、ヒト抗体分子は、動物の抗体遺伝子発現が抑制され、ヒト抗体分子遺伝子発現と機能的に置き換えられた動物の遺伝子操作された株を使用して産生することができる。

【０１２１】

ヒト抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。ヒト抗体を作製するための１つの方法は、トランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物の利点を利用する。これらのトランスジェニック動物は、自身のゲノムに挿入された、ヒト抗体産生ゲノムの実質的な部分、たとえば、機能的な再構成を受け得るヒト免疫グロブリン座を含有し、動物自体の内因性の抗体産生は、抗体の産生において欠損させる。そのようなトランスジェニック動物を作製するための方法は、当技術分野において公知である。そのようなトランスジェニック動物は、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術を使用してまたは「ミニローカス（ｍｉｎｉｌｏｃｕｓ）」アプローチを使用して作製することができる。ＸＥＮＯＭＩＣＥ（商標）を作製するための方法は、参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第６，１６２，９６３号、第６，１５０，５８４号、第６，１１４，５９８号、および第６，０７５，１８１号において記載されている。「ミニローカス」アプローチを使用して、トランスジェニック動物を作製するための方法は、米国特許第５，５４５，８０７号、第５，５４５，８０６号、および第５，６２５，８２５号において記載されており、国際特許出願公開ＷＯ９３／１２２２７もまた参照されたい。これらはそれぞれ参照によって本明細書において組み込まれる。他のトランスジェニックヒト抗体産生マウスは、ＨＵＭＡＢ－ＭＯＵＳＥ（登録商標）、ＫＩＲＩＮ　ＴＣ　ＭＯＵＳＥ（商標）トランスクロモソームマウス、ＫＭ－ＭＯＵＳＥ（登録商標）（ＭＥＤＡＲＥＸ、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、ＮＪ）を含む。

【０１２２】

ヒト抗体トランスジェニック動物技術、たとえばＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術を使用して、ヒト抗体は、対象の抗原を用いて、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）マウス（Ａｂｇｅｎｉｘ、Ｆｒｅｍｏｎｔ、Ｃａｌｉｆ．）を免疫することによって得ることができる。リンパ細胞（Ｂ細胞など）は、抗体を発現するマウスから回収される（たとえば、脾臓組織から単離される）。これらの回収された細胞は、標準的な方法論を使用して、不死ハイブリドーマ細胞系を調製するために骨髄型の細胞系と融合することができる。これらのハイブリドーマ細胞系は、対象の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を同定するためにスクリーニングし、かつ選択することができる。

【０１２３】

ヒト抗体トランスジェニック動物は、特異性および親和性などの所望の特性を有する抗体をコードする核酸が富化され得る核酸の供給源を提供する。たとえば、抗体または抗体可変領域をコードする核酸は、ＧＣＣタンパク質またはその改変体もしくは部分を用いて免疫されたヒト抗体トランスジェニックマウスから単離されてもよい。単離核酸またはその部分（たとえば、可変領域、ＣＤＲ、フレームワーク領域をコードする部分）は、ＧＣＣタンパク質に結合する抗体または抗原結合断片に対して富化された抗体または抗体の抗原結合断片（たとえば単鎖抗原結合断片、二重鎖抗原結合断片）のライブラリーを産生するために、任意の適した方法（たとえばファージディスプレイ）を使用して発現することができる。そのようなライブラリーは、免疫されたヒト抗体トランスジェニック動物において産生される抗体のレパートリーに比べて、増強された多様性（たとえば重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対形成を通してのコンビナトリアル多様性）を示すことができる。そのライブラリーは、所望の特性（たとえば特異性、親和性）を有する抗体または抗原結合断片を同定するために任意の適したアッセイ（たとえばＧＣＣタンパク質結合アッセイ）を使用してスクリーニングすることができる。所望の特性を有する抗体または抗原結合断片をコードする核酸は、任意の適した方法を使用して回収することができる（たとえば米国特許第５，８７１，９０７号（Ｗｉｎｔｅｒら）および米国特許第６，０５７，０９８号（Ｂｕｅｃｈｌｅｒら）を参照されたい）。

【０１２４】

その代わりに、抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現することができる。より具体的には、特定の抗体をコードする配列は、抗体を産生する細胞からクローニングし、適した哺乳動物の宿主細胞の形質転換に使用することができる。好ましい方法において、免疫マウス由来の脾臓および／またはリンパ節のリンパ球は、マウスから単離され、参照によって本明細書において組み込まれるＢａｂｃｏｏｋら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．９３巻：７８４３～８頁（１９９６年）において以前に記載されるように、プラークアッセイにおいて培養される。手短に言えば、細胞は、ＧＣＣ抗原を用いてコートされた、ヒツジ赤血球を有する寒天で培養され、ＧＣＣ抗原に対してｍＡｂを分泌する細胞は、補体を固定し、ｍＡｂ産生細胞の周囲の赤血球を直ちに溶解する。澄明化したプラーク内の細胞は、免疫グロブリン配列の配列決定および発現ベクター内へのサブクローニングのために採取される。ＧＣＣ特異的なｍＡｂを含有する一時的にトランスフェクトされた細胞由来の上清は、続いて、ＥＬＩＳＡによっておよびフローサイトメトリーによって細胞への結合についてスクリーニングされる。特定のエピトープに結合するＣＤＲを含む産生ヒト抗体の可変配列またはその部分は、改変抗体の産生のために利用されてもよい。たとえば、産生抗体の可変領域は、構築物の移入、構築物の発現の増加、および／または完全長抗体を発現することができるベクターへの構築物の組み込みを容易にするために、発現カセットの中にスプライシングされてもよい。たとえばＵＳ２００６０１４７４４５を参照されたい。特定の実施形態では、発現カセットは、ＩｇＧ１アイソタイプの重鎖定常領域を含む。

【０１２５】

Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｅｔｈｏｄ（ＳＬＡＭ、米国特許第５，６２７，０５２号、Ｂａｂｃｏｏｋら Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ． ９３巻：７８４３～７８４８頁（１９９６年）を参照されたい）もまた、対象の抗体を提供することができる細胞を同定するために使用することができる。ＳＬＡＭでは、Ｂ細胞が直接培養され、したがって、典型的には、マウスによってもともと生成されるわずかな割合の抗体しか捕捉しないハイブリドーマ技術が回避される。マイクロプレートベースのアッセイを使用して、Ｂ細胞は、数日の期間にわたって速やかにアッセイされる。典型的に、何千もの抗原反応性細胞クローンが同定され、それは、何千もの個々の抗原特異的、たとえばＧＣＣ特異的モノクローナル抗体を表わす。単一の実験において同定される異なる抗原反応性モノクローナル抗体の数は、典型的に、何倍にも増加する。親和性および機能によって抗体を測定し、ランク付けるためのさらなる迅速なマイクロプレートベースのアッセイを適用した後に、非常に高品質の抗体を産生する個々のＢ細胞クローンを選択することができる。さらに、ハイブリドーマ生成ステップを回避することによって、産出物を、組換え生産細胞系中に速やかに移動することができる。本技術を使用して選択された個々のＢ細胞は、単離され、その抗体遺伝子は、生産細胞系に直接導入することができる。次いで、結果として生じる細胞系は、ハイブリドーマ細胞系開発のために必要とされるものと本質的に同じ時間軸（ｔｉｍｅｌｉｎｅ）にわたって臨床試験のために発達させることができる。

【０１２６】

ヒトｍＡｂ ５Ｆ９（ＩｇＧ２、カッパ）は、ハイブリドーマ４６．５Ｆ９．８．２とも呼ばれるハイブリドーマ５Ｆ９によって産生することができ、これは、受託番号ＰＴＡ－８１３２の下で、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ、Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖｉｒｇｉｎｉａ ２０１１０、Ｕ．Ｓ．Ａ．に、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ Ｉｎｃ．、４０ Ｌａｎｄｓｄｏｗｎｅ Ｓｔｒｅｅｔ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ、０２１３９、ＵＳＡを代表して２００７年１月１０日に寄託された（その寄託は、Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙ ｏｎ ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｄｅｐｏｓｉｔ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｕｒｐｏｓｅｓ ｏｆ Ｐａｔｅｎｔ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅに従って成され、その要求を満たす）。本発明は、ハイブリドーマ５Ｆ９、それが産

生する抗体、その抗原結合断片、ならびに抗体およびその部分（たとえば重鎖、重鎖可変領域、軽鎖、軽鎖可変領域、ＣＤＲ）をコードする核酸に関する。本明細書に記載のとおり、ハイブリドーマ５Ｆ９は、ＩｇＧ２（カッパ抗体）を産生する。

【０１２７】

ヒト化およびディスプレイ技術および抗体に対する改変

上記に議論されるように、免疫原性が低下した抗体を産生することは有利である。これは、ヒト化の技術および適切なライブラリーを使用したディスプレイ技術に関連して行うことができる。マウス抗体または他の種由来の抗体は、当技術分野において公知の技術を使用して、ヒト化または霊長類化する（ｐｒｉｍａｔｉｚｅ）ことができることが十分に理解される。たとえばＷｉｎｔｅｒおよびＨａｒｒｉｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｔｏｄａｙ　１４巻：４３～４６頁（１９９３年）およびＷｒｉｇｈｔら　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１２１２５～１６８頁（１９９２年）を参照されたい。対象の抗体は、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジドメイン、および／またはフレームワークドメインを対応するヒト配列と置換するための組換えＤＮＡ技術によって操作されてもよい（ＷＯ９２／０２１９０ならびに米国特許第５，５３０，１０１号、第５，５８５，０８９号、第５，６９３，７６１号、第５，６９３，７９２号、第５，７１４，３５０号、および第５，７７７，０８５号を参照されたい）。さらに、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのＩｇ　ｃＤＮＡの使用は、当技術分野において公知である（Ｌｉｕら　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．８４巻：３４３９（１９８７年）およびＪ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９巻：３５２１頁（１９８７年））。ｍＲＮＡは、抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞から単離され、ｃＤＮＡを生成するために使用される：対象のｃＤＮＡは、特異的なプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅されてもよい（米国特許第４，６８３，１９５号および第４，６８３，２０２号）。

【０１２８】

その代わりに、ファージディスプレイ技術（たとえばＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ，３４８巻：５５２～５５３頁（１９９０年）を参照されたい）は、免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子から、たとえば、非免疫ドナー由来のレパートリーからｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてヒト抗体および抗体断片を産生するために使用することができる。この技術に従って、抗体Ｖドメイン遺伝子は、Ｍ１３またはｆｄなどの、糸状バクテリオファージの主要なまたは微量のコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面に機能的な抗体断片として示される。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するので、抗体の機能的な特性に基づく選択はまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をももたらす。したがって、ファージは、Ｂ細胞の特性のうちのいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、様々な方式において実行することができる；それらの総説については、たとえばＪｏｈｎｓｏｎおよびＣｈｉｓｗｅｌｌ、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　３巻：５６４～５７１頁（１９９３年）を参照されたい。Ｖ遺伝子セグメントのいくつかの供給源は、ファージディスプレイに使用することができる。Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２巻：６２４～６２８頁（１９９１年）は、免疫マウスの脾臓から誘導されたＶ遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様な配列を単離した。非免疫ヒトドナー由来のＶ遺伝子のレパートリーを構築することができ、Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２巻：５８１～５９７頁（１９９１年）またはＧｒｉｆｆｉｔｈら、ＥＭＢＯ　Ｊ．，１２巻：７２５～７３４頁（１９９３年）によって記載される技術に本質的に従って、多様な一群の抗原（自己抗原を含む）に対する抗体を単離することができる。米国特許第５，５６５，３３２号および第５，５７３，９０５号もまた参照されたい。ディスプレイライブラリーは、人工アミノ酸配列を含有する抗体または抗体の抗原結合断片を含有することができる。たとえば、そのライブラリーは、人工ＣＤＲ（たとえばランダムアミノ酸配列）およびヒトフレームワーク領域を含有するＦａｂ断片を含有することができる（たとえば米国特許第６，３００，０６４号（Ｋｎａｐｐｉｋら）を参照されたい）。

【０１２９】
ヒト抗体はまた、ｉｎ ｖｉｔｒｏ活性化Ｂ細胞によって生成されてもよい（米国特許第５，５６７，６１０号および第５，２２９，２７５号を参照されたい）。
【０１３０】
ヒト定常領域遺伝子の配列は、Ｋａｂａｔら（１９９１年）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、Ｎ．Ｉ．Ｈ．ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｎｏ．９１－３２４２において見出してもよい。ヒトＣ領域遺伝子は、公知のクローンから容易に入手可能である。アイソタイプの選択は、補体固定または抗体依存性細胞傷害における活性などの所望のエフェクター機能によって導かれる。アイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４とすることができる。特定の実施形態では、本発明の抗体分子は、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２である。ヒト軽鎖定常領域（カッパまたはラムダ）のどちらでも使用されてもよい。次いで、キメラ抗体、ヒト化抗体は、従来の方法によって発現される。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、ＧＣＣを発現する細胞（たとえば腫瘍細胞）に対して抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）をも引き出すことができる。ＩｇＧ１およびＩｇＧ３アイソタイプを有する抗体は、Ｆｃ受容体に結合するそれらの能力により、抗体依存性の細胞傷害性能力においてエフェクター機能を誘発するのに有用である。ＩｇＧ２およびＩｇＧ４アイソタイプを有する抗体は、Ｆｃ受容体に結合する能力が低いために、ＡＤＣＣ応答を最小限にするのに有用である。関連する実施形態では、たとえば改変真核生物細胞系における成長による、Ｆｃ領域における置換または抗体のグリコシル化組成における変化は、抗ＧＣＣ抗体が結合する細胞を認識する、その細胞に結合する、および／またはその細胞に対する細胞傷害性を媒介する、Ｆｃ受容体の能力を増強するために成すことができる（たとえば米国特許第７，３１７，０９１号、第５，６２４，８２１号、およびＷＯ００／４２０７２、Ｓｈｉｅｌｄｓら Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６巻：６５９１～６６０４頁（２００１年）、Ｌａｚａｒら Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ． １０３巻：４００５～４０１０頁（２００６年）、Ｓａｔｏｈら Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ． ６巻：１１６１～１１７３頁（２００６年）を含む刊行物を参照されたい）。ある実施形態では、抗体または抗原結合断片（たとえばヒト起源の抗体、ヒト抗体）は、機能（たとえばエフェクター機能）を改変するまたは調整するアミノ酸置換または交換を含むことができる。たとえば、ヒト起源の定常領域（たとえばγ１定常領域、γ２定常領域）は、補体活性化および／またはＦｃ受容体結合を低下させるように設計することができる（たとえば、これらの全教示が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第５，６４８，２６０号（Ｗｉｎｔｅｒら）、第５，６２４，８２１号（Ｗｉｎｔｅｒら）、および第５，８３４，５９７号（Ｔｓｏら）を参照されたい）。好ましくは、そのようなアミノ酸置換または交換を含有するヒト起源の定常領域のアミノ酸配列は、ヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対して完全長にわたって少なくとも約９５％同一である、より好ましくは、ヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対して完全長にわたって少なくとも約９９％同一である。
【０１３２】
他のさらなる実施形態では、エフェクター機能はまた、抗体のグリコシル化パターンを調整することによって改変することができる。改変とは、抗体において認められる１つ以上の炭水化物成分の欠失および／または抗体に存在しない１つ以上のグリコシル化部位の追加を意味する。たとえば、抗体のＦｃ領域に結合するフコースを欠く成熟炭水化物構造物を有する増強されたＡＤＣＣ活性を有する抗体は、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号（Ｐｒｅｓｔａ）において記載されている。米国特許出願公開第２００４／００９３６２１号（Ｋｙｏｗａ Ｈａｋｋｏ Ｋｏｇｙｏ Ｃｏ．，Ｌｔｄ）もまた参照されたい。Ｇｌｙｃｏｆｉもまた、抗体の特定のグリコフォームを産生することができる酵母細胞系を開発した。

【０１３３】
さらにまたはその代わりに、フコシル残基の量が低下した低フコシル化（ｈｙｐｏｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ）抗体または２つに枝分かれした（ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ）ＧｌｃＮａｃ構造物が増加した抗体などの改変されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を増加させることが実証されている。そのような炭水化物改変物は、たとえば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって行うことができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野において記載されており、本発明の組換え抗体を発現するように操作される宿主細胞として使用し、それによって、グリコシル化が改変された抗体を産生することができる。たとえば、ＨａｎｇらによるＥＰ　１，１７６，１９５は、そのような細胞系において発現される抗体が低フコシル化（ｈｙｐｏｆｕｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）を示すように、フコシルトランスフェラーゼをコードする、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞系を記載する。ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴ公開ＷＯ０３／０３５８３５は、アスパラギン（２９７）連結炭水化物にフコースを付加する能力が低下した改変体ＣＨＯ細胞系、Ｌｅｃ１３細胞を記載し、これもまた、その宿主細胞において発現される抗体の低フコシル化をもたらす（たとえばＳｈｉｅｌｄｓ，　Ｒ．Ｌ．ら、２００２年　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２７７巻：２６７３３～２６７４０頁を参照されたい）。ＵｍａｎａらによるＰＣＴ公開ＷＯ９９／５４３４２は、操作された細胞系において発現される抗体が、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、２つに枝分かれしたＧｌｃＮａｃ構造物の増加を示すように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ（たとえばベータ（１，４）－ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作された細胞系を記載する（Ｕｍａｎａら、１９９９年　Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．　１７巻：１７６～１８０頁もまた、参照されたい）。

【０１３４】
ヒト化抗体はまた、ＣＤＲ移植アプローチを使用して作製することもできる。そのようなヒト化抗体の生成の技術は、当技術分野において公知である。一般に、ヒト化抗体は、ＧＣＣに結合する抗体の可変重配列および可変軽配列をコードする核酸配列を得、可変重配列および可変軽配列における相補性決定領域または「ＣＤＲ」を同定し、かつヒトフレームワーク核酸配列にＣＤＲ核酸配列を移植することによって産生される（たとえば米国特許第４，８１６，５６７号および第５，２２５，５３９号を参照されたい）。ＣＤＲおよびフレームワーク残基の位置は、決定することができる（Ｋａｂａｔ，　Ｅ．Ａ．ら（１９９１年）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．９１－３２４２およびＣｈｏｔｈｉａ，　Ｃ．ら　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６巻：９０１～９１７頁（１９８７年）を参照されたい）。本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子は、表５および表６に列挙されるＣＤＲをコードするＣＤＲアミノ酸配列およびＣＤＲ核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、表５および表６由来の配列は、本明細書に記載の治療方法または診断方法における使用のためにＧＣＣを認識する分子に組み込むことができる。選択されるヒトフレームワークは、ｉｎ　ｖｉｖｏ投与に適したものであり、それが免疫原性を示さないことを意味する。たとえば、そのような決定は、そのような抗体のｉｎ　ｖｉｖｏにおける使用を伴う先の知見およびアミノ酸類似性に関する研究によって成すことができる。適したフレームワーク領域は、ドナー抗体、たとえば抗ＧＣＣ抗体分子（たとえば３Ｇ１）の等価な部分（たとえばフレームワーク領域）のアミノ酸配列内のフレームワーク領域の全長にわたって、少なくとも約６５％のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約７０％、８０％、９０％、または９５％のアミノ酸配列同一性を有するヒト起源の抗体から選択することができる。アミノ酸配列同一性は、デフォルトパラメータを使用して、ＣＬＵＳＴＡＬ　Ｗなどの適したアミノ酸配列アライメントアルゴリズムを使用して決定することができる（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　Ｊ．Ｄ．ら、Ｎｕｃｌｅ

ｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． ２２巻：４６７３～４６８０頁（１９９４年））。

【０１３５】

ヒト化されることとなるクローニング抗体のＣＤＲおよびＦＲが一度同定されたら、ＣＤＲをコードするアミノ酸配列が、同定され、対応する核酸配列が、選択されるヒトＦＲ上に移植される。これは、公知のプライマーおよびリンカーを使用して行うことができ、これらの選択は、当技術分野において公知である。特定のヒト抗体のＣＤＲはすべて、非ヒトＣＤＲの少なくとも１つの部分と置き換えられてもよいし、またはＣＤＲのうちのごく一部が非ヒトＣＤＲで置き換えられてもよい。所定の抗原へのヒト化抗体の結合に必要とされるＣＤＲの数を置き換えることのみが必要である。ＣＤＲが選択されたヒトＦＲ上に移植された後に、結果として生じる「ヒト化」可変重配列および可変軽配列は、ＧＣＣに結合するヒト化Ｆｖまたはヒト化抗体を産生するように発現される。好ましくは、ＣＤＲ移植（たとえばヒト化）抗体は、ドナー抗体に類似する、実質的にドナー抗体と同じ、またはドナー抗体の親和性より好適な親和性で、ＧＣＣタンパク質に結合する。典型的に、ヒト化可変重配列および軽配列は、ＧＣＣに結合する完全な抗体が得られるように、ヒト定常ドメイン配列を有する融合タンパク質として発現される。しかしながら、定常配列を含有しないヒト化Ｆｖ抗体を産生することができる。

【０１３６】

特定のアミノ酸が置換された、欠失した、または付加されたヒト化抗体もまた、本発明の範囲内である。特に、ヒト化抗体は、抗原への結合を改善するように、フレームワーク領域におけるアミノ酸置換を有することができる。たとえば、ヒト化免疫グロブリン鎖の、選択される少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸によって置き換えることができる。置換の位置は、ＣＤＲに近接するまたはＣＤＲと相互作用することができるアミノ酸残基を含む（たとえば米国特許第５，５８５，０８９号または第５，８５９，２０５号を参照されたい）。アクセプターフレームワークは、成熟ヒト抗体フレームワーク配列またはコンセンサス配列とすることができる。本明細書において使用されるように、用語「コンセンサス配列」は、最も頻繁に認められるまたは関連するファミリーメンバーの間で領域内の配列におけるそれぞれの位置で最も共通する残基から考えられる配列を指す。ヒト可変領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列を含む、多くのヒト抗体コンセンサス配列が、入手可能である（Ｋａｂａｔ， Ｅ．Ａ．ら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、Ｕ．Ｓ．Ｇｏｖｅｒｎｍｅｎｔ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｏｆｆｉｃｅ（１９９１年）を参照されたい）。Ｋａｂａｔデータベースおよびそのアプリケーションは、たとえば、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤのＩｇＢＬＡＳＴを介してオンラインで自由に入手可能である（Ｊｏｈｎｓｏｎ， Ｇ．およびＷｕ， Ｔ．Ｔ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２９巻：２０５～２０６頁（２００１年）もまた参照されたい）。

【０１３７】

抗体をヒト化するための他の技術は、１９９２年１２月２３日に公開されたＰａｄｌａｎら ＥＰ ５１９５９６ Ａ１において記載されている。

【０１３８】

抗ＧＣＣ抗体分子は、ヒトＴ細胞エピトープの特異的な欠失またはこれらの内容が参照によって本明細書において組み込まれるＰＣＴ公開ＷＯ９８／５２９７６およびＷＯ００／３４３１７において開示される方法による「脱免疫」によって改変されてもよい他のヒト化抗体を含む。手短に言えば、抗ＧＣＣ抗体のマウス重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、ＭＨＣクラスＩＩに結合するペプチドについて分析することができる；これらのペプチドは、潜在的なＴ細胞エピトープを表す。潜在的なＴ細胞エピトープの検出については、「ペプチドスレッディング（ｐｅｐｔｉｄｅ ｔｈｒｅａｄｉｎｇ）」と称されるコンピューターモデリングアプローチを適用することができ、さらに、ヒトＭＨＣクラスＩＩ

結合ペプチドのデータベースは、ＰＣＴ公開ＷＯ９８／５２９７６およびＷＯ００／３４３１７に記載のとおりマウスＶＨおよびＶＬ配列に存在するモチーフについて検索することができる。これらのモチーフは、１８の主要なＭＨＣクラスＩＩ　ＤＲアロタイプのいずれかに結合し、したがって潜在的なＴ細胞エピトープを構築する。検出された潜在的なＴ細胞エピトープは、可変領域における少数のアミノ酸残基の置換によってまたは好ましくは単一アミノ酸置換によって排除することができる。可能な限り、保存的置換は、排他的ではないが多くの場合に行なわれ、ヒト生殖細胞系列抗体配列におけるその位置で、共通のアミノ酸が使用されてもよい。ヒト生殖細胞系列配列は、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，　Ｉ．Ａ．ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７巻：７７６～７９８頁（１９９２年）；Ｃｏｏｋ，　Ｇ．Ｐ．ら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ　１６巻（５号）：２３７～２４２頁（１９９５年）；Ｃｈｏｔｈｉａ，　Ｄ．ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．２２７巻：７９９～８１７頁（１９９２年）において開示されている。Ｖ　ＢＡＳＥディレクトリーは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリーを提供する（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，　Ｉ．Ａ．ら　ＭＲＣ　Ｃｅｎｔｒｅ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫによって編集）。抗ＧＣＣ抗体の脱免疫ＶＨおよびＶＬをマウスＶＨおよびＶＬ遺伝子の変異誘発によって構築した後に、その変異誘発された可変配列は、必要に応じて、ヒト定常領域、たとえばヒトＩｇＧ１定常領域またはκ定常領域に融合することができる。

【０１３９】

他の実施形態では、ＣＤＲ移植抗体による免疫原性応答の低下は、ＣＤＲ中のアミノ酸残基の変化、たとえば欠失、置換によって達成することができる（Ｋａｓｈｍｉｒｉら　Ｍｅｔｈｏｄｓ　３６巻：２５～３４頁（２００５年）、米国特許第６，８１８，７４９号、Ｔａｎら　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１６９巻：１１１９～１１２５頁（２００６年））。たとえば、抗原との接触に関与する位置の残基は、好ましくは、変化されない。典型的に、そのような残基、ＳＤＲは、抗体の間で高レベルの可変性を示す位置にある。たとえば、抗ＧＣＣ抗体分子から、たとえば、本明細書に記載の抗体から、Ｃｌｕｓｔａｌ法（Ｈｉｇｇｉｎｓ　Ｄ．Ｇ．ら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．　２６６巻：３８３～４０２頁（１９９６年））によって誘導されるコンセンサス配列（たとえば配列番号３０２～３０７、表５）は、ＳＤＲを同定するのを促進する。本明細書に記載のヒト抗ＧＣＣ抗体分子において、ＳＤＲは、以下の、重鎖ＣＤＲ１の少なくとも最初の残基またはいくつかの実施形態では、最初の４つの残基；重鎖ＣＤＲ２の少なくともＮ末端部分、たとえば最初の７個、１０個、または１３個の残基；重鎖ＣＤＲ３のほぼすべて；軽鎖ＣＤＲ１のＣ末端部分、たとえば、残基６、８、または９の後；軽鎖ＣＤＲ２のほぼ最初の、中央の、および／または最後の残基；ならびに軽鎖ＣＤＲ３の大部分または少なくとも、残基２もしくは３の後、である。したがって、抗ＧＣＣ抗体分子のヒト化または改変の後にＧＣＣタンパク質への結合を維持するために、抗ＧＣＣ抗体分子のＣＤＲのそのようなＳＤＲ残基は、ＣＤＲの他の残基またはフレームワーク領域の残基よりも、変化を、たとえば、マウス残基からヒトコンセンサス残基への変化を受けにくい。反対に、非ヒト、たとえばマウスＣＤＲ中の残基を、ヒトＣＤＲ、たとえば本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子のＣＤＲ（たとえば表５に列挙される配列）中のコンセンサスとして同定される残基に変化させることは有益であり得る。たとえば、セリンは、重鎖ＣＤＲ１のＣ末端についてのヒト残基を表わし得る、および／またはチロシンは、重鎖ＣＤＲ１の第２のおよび／もしくは第３の残基についてのヒト残基を表わし得る；重鎖ＣＤＲ２は、Ｓ－（Ｌ／Ｖ）－Ｋ－（Ｓ／Ｇ）（配列番号３１２）で終わり、ヒトＣＤＲを表わし得る；ヒトＣＤＲ３を表わすように、重鎖ＣＤＲ３における４～６個の残基および／またはアスパルテート６～９個の残基の後にグリシンであり得る；軽鎖ＣＤＲ１は、（Ｋ／Ｒ）－（Ａ／Ｓ）－ＳＱＳ－（Ｖ／Ｌ）－（Ｓ／Ｌ）（配列番号３１３）で始まり、ヒトＣＤＲを表わし得る；軽鎖ＣＤＲ２は、第３の残基にセリンおよび／もしくは第５の残基にアルギニンを有し、ヒトＣＤＲを表わし得る；ならびに／または軽鎖ＣＤＲ３は、第２の残基にグルタミンおよび／または第３の残基にチロシンもしくはセリンを有し、ヒトＣＤＲを表わし得る。

【０１４０】
完全な抗体でない抗ＧＣＣ抗体もまた、本発明に有用である。そのような抗体は、上に記載される抗体のいずれかからも誘導されてもよい。このタイプの有用な抗体分子は、（ｉ）Ｆａｂ断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、およびＣＨ１ドメインから成る一価断片；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインから成るＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単一のアームのＶＬおよびＶＨドメインから成るＦｖ断片、（ｖ）ＶＨドメインから成るｄＡｂ断片（Ｗａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ　３４１巻：５４４～５４６頁（１９８９年））；（ｖｉｉ）ＶＨＨドメイン（ナノボディとして公知）から成る単一ドメイン機能的重鎖抗体、たとえばＣｏｒｔｅｚ－Ｒｅｔａｍｏｚｏら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　６４巻：２８５３～２８５７頁（２００４年）およびその中に引用される参考文献を参照されたい；ならびに（ｖｉｉ）単離ＣＤＲ、たとえば、抗原結合断片を提供するのに十分なフレームワークと一緒の１つ以上の単離ＣＤＲを含む。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメイン、ＶＬおよびＶＨは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは合成リンカーによって組換え法を使用して連結することができる。その合成リンカーにより、上記ＶＬおよびＶＨは、そのＶＬおよびＶＨ領域が対になって一価分子（単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知）を形成する単一タンパク質鎖として作製することが可能となる；たとえばＢｉｒｄら　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２巻：４２３～４２６頁（１９８８年）；およびＨｕｓｔｏｎら　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５巻：５８７９～５８８３頁（１９８８年）を参照されたい。そのような単鎖抗体もまた、抗体の用語「抗原結合断片」の範囲内に包含されるように意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、その断片は、完全な抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦａｂなどの抗体断片は、完全なタンパク質の切断によって、たとえば、プロテアーゼによるまたは化学的な切断によって調製されてもよい。

【０１４１】
実施形態では、重鎖および軽鎖の一方または両方のＣＤＲ配列のうちの一部またはすべては、他の抗体分子に、たとえばＣＤＲ移植、ヒト化、またはキメラ抗体分子に使用することができる。

【０１４２】
実施形態は、細胞表面ＧＣＣへの結合を可能にするために、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つ由来の十分なＣＤＲ、たとえば６つのＣＤＲすべてを含む抗体分子を含む。

【０１４３】
一実施形態では、ＣＤＲ、たとえばＨＣＤＲのすべてまたはＬＣＤＲのすべてまたは６つすべては、ヒトまたはヒト誘導フレームワーク領域（複数可）に埋め込まれる。ヒトフレームワーク領域の例は、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列、親和性成熟したヒト生殖細胞系列配列（ｉｎ　ｖｉｖｏもしくはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかにおいて）、または合成ヒト配列、たとえばコンセンサス配列を含む。一実施形態では、重鎖フレームワークは、ＩｇＧ１またはＩｇＧ２フレームワークである。一実施形態では、軽鎖フレームワークは、カッパフレームワークである。

【０１４４】
一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえばＣＤＲ移植抗体分子またはヒト化抗体分子は、ＧＣＣへの結合を可能にするように、十分なＣＤＲ、たとえば、本明細書に記載の抗体、たとえば表５に列挙される配列のうちの１つ由来の６つのＣＤＲすべてを含む（表５に列挙されるＣＤＲアミノ酸配列をコードすることができる例示的な核酸配列は、本明細書において表６に提供される）。特定の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、５Ｆ９またはＡｂｘ－２２９由来のＣＤＲを含むことができる。

【０１４５】
ｉｎ　ｖｉｖｏにおける治療用または診断用の使用のための抗体断片は、それらの血清

半減期を改善する改変から利益を得ることができる。抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ血清半減期を増加させるように意図される適した有機成分は、親水性のポリマー基（たとえば線状または分枝ポリマー（たとえばポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、およびその他同種のものなどのポリアルカングリコール）、炭水化物（たとえばデキストラン、セルロース、多糖、およびその他同種のもの）、親水性アミノ酸のポリマー（たとえばポリリシン、ポリアスパルテート、およびその他同種のもの）、ポリアルカンオキシド、ならびにポリビニルピロリドン）、脂肪酸基（たとえばモノカルボン酸もしくはジカルボン酸）、脂肪酸エステル基、脂質基（たとえばジアシルグリセロール基、スフィンゴリピド基（たとえばセラミジル））、またはリン脂質基（たとえばホスファチジルエタノールアミン基）から選択される１または２以上の線状成分または分枝成分を含むことができる。好ましくは、有機成分は、所定の部位に結合され、その有機成分は、非結合体化抗体成分と比較して、得られる免疫結合体の機能を損なわない（たとえば、抗原結合親和性を減少させない）。その有機成分は、約５００Ｄａ～約５０，０００Ｄａ、好ましくは約２０００、５０００、１０，０００、または２０，０００Ｄａの分子量を有することができる。有機成分を用いてポリペプチド、たとえば抗体を改変するための例および方法は、たとえば、米国特許第４，１７９，３３７号および第５，６１２，４６０号、ＰＣＴ公開ＷＯ９５／０６０５８およびＷＯ００／２６２５６、ならびに米国特許出願公開第２００３００２６８０５号に見出すことができる。

【０１４６】

抗ＧＣＣ抗体分子は、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの重鎖および軽鎖の一方または両方の可変領域のすべてまたはその抗原結合断片を含むことができる。

【０１４７】

一実施形態では、（ａ）の軽鎖アミノ酸配列は、１、２、３、４、５、１０、または１５もの数の残基に対して（ａ）（ｉ～ｉｉ）において言及される参照アミノ酸配列（複数可）のうちの１つと異なり得る。実施形態では、その差異は、保存的置換である。実施形態では、その差異は、フレームワーク領域にある。一実施形態では、（ｂ）の重鎖アミノ酸配列は、１、２、３、４、５、１０、または１５もの数の残基に対して（ｂ）（ｉ～ｉｉ）において言及される参照アミノ酸配列（複数可）のうちの１つと異なり得る。実施形態では、その差異は、保存的置換である。実施形態では、その差異は、フレームワーク領域にある。

【０１４８】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、以下：

（ａ）（ｉ）表３由来の軽鎖可変領域アミノ酸配列、たとえば配列番号２０または（ｉｉ）表４由来のヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖可変領域アミノ酸、たとえば配列番号１９のいずれかの、すべての軽鎖アミノ酸配列または上記いずれかの抗原結合断片；および

（ｂ）（ｉ）表３由来の重鎖可変領域アミノ酸配列、たとえば配列番号１８または（ｉｉ）表４由来のヌクレオチド配列によってコードされる重鎖アミノ酸配列、たとえば配列番号１７のいずれかの、すべての重鎖アミノ酸配列または上記いずれかの抗原結合断片、の一方または両方を含む。

【０１４９】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、以下：

ａ）本発明の抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの軽鎖可変領域と少なくとも８５、９０、９５、９７、または９９％の相同性を有する軽鎖可変領域またはその抗原結合断片；および

ｂ）本発明の抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの１つの重鎖可変領域と少なくとも８５、９０、９５、９７、または９９％の相同性を有する重鎖可変領域またはその抗原結合断片、の一

方または両方を含む。

【０１５０】

ヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、およびマウス抗体の可変領域のアミノ酸配列は、表３に見出すことができる。

【０１５１】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、５Ｆ９抗体分子であり、ａ）配列番号２３１由来の重鎖定常領域のすべてまたは上記領域の断片；およびｂ）配列番号２３３由来の軽鎖定常領域のすべてまたは上記領域の断片の一方または両方を含む。

【０１５２】

他の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、Ａｂｘ－２２９抗体分子であり、ａ）配列番号４６由来の重鎖可変領域のすべてまたは上記領域のＧＣＣ結合断片；およびｂ）配列番号４８由来の軽鎖可変領域のすべてまたは上記領域のＧＣＣ結合断片の一方または両方を含む。

【０１５３】

１つのアプローチにおいて、重鎖Ｊ領域および軽鎖Ｊ領域をコードするコンセンサス配列は、ヒトＣ領域セグメントへのＶ領域セグメントのその後の連結のためにＪ領域に有用な制限酵素認識部位を導入するためのプライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを設計するのに使用してもよい。Ｃ領域ｃＤＮＡは、ヒト配列における類似の位置に制限酵素認識部位を配置するために部位特異的変異誘発によって改変することができる。

【０１５４】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、ＹＡＣ、ＥＢＶ由来のエピソーム、およびその他同種のものを含む。好都合なベクターは、任意のＶＨまたはＶＬの配列が容易に挿入され、発現することができるように操作された、適切な制限酵素認識部位を有する、機能的に完全なヒトＣＨ免疫グロブリン配列またはＣＬ免疫グロブリン配列をコードするベクターである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは、普通、挿入されたＪ領域におけるスプライスドナー部位とヒトＣ領域に先行するスプライスアクセプター部位の間で生じ、またヒトＣＨエクソン内に生じるスプライス領域でも生じる。適した発現ベクターは、多くの構成要素、たとえば複製起点、選択マーカー遺伝子、転写制御エレメント（たとえばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター）などの１つ以上の発現制御エレメントおよび／または１つ以上の翻訳シグナル、シグナル配列またはリーダー配列、ならびにその他同種のものを含有することができる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体部位で生じる。結果として生じるキメラ抗体は、任意の強力なプロモーターにつながれてもよい。使用することができる適したベクターの例は、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、アデノウイルス２、ウシ乳頭腫ウイルス（ＢＰＶ）、パポバウイルスＢＫ変異体（ＢＫＶ）、またはマウスおよびヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ならびにモロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）、天然のＩｇプロモーターなどの、哺乳動物の宿主に適しており、ウイルス複製系をベースとするベクターを含む。単一のコピーもしくは複数のコピーで維持されるかまたはたとえば、ＬＴＲを介してもしくは複数の組込み部位を用いて操作された人工染色体を介して宿主細胞染色体に組込まれるようになるベクターを含む様々な適したベクターが、当技術分野において公知である（Ｌｉｎｄｅｎｂａｕｍら Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３２巻：ｅ１７２（２００４年）、Ｋｅｎｎａｒｄら Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．Ｏｎｌｉｎｅ ２００９年５月２０日）。適したベクターのさらなる例は、後の部において列挙される。

【０１５５】

したがって、本発明は、抗体、抗体の抗原結合断片（たとえば、前述のもののいずれかのヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、もしくは前述のものの抗原結合断片）、抗体鎖（たとえば重鎖、軽鎖）、またはＧＣＣタンパク質に結合する抗体鎖のうちの抗原結合部分をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。

【０１５６】

真核生物の宿主細胞における発現は、そのような細胞が、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性のある抗体を構築し、分泌する可能性が原核生物細胞よりも高いので、有用である。しかしながら、不適切な折り畳みにより不活性な、産生されたいかなる抗体も、公知の方法に従って復元することができる（ＫｉｍおよびＢａｌｄｗｉｎ、「Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｆｏｌｄｉｎｇ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｓｍａｌｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｆｏｌｄｉｎｇ」、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ５１巻、４５９～８９頁（１９８２年））。宿主細胞が、軽鎖二量体または重鎖二量体などの、完全な抗体の一部を産生することは可能であり、これらもまた、本発明によれば抗体相同体である。

【０１５７】

さらに、本明細書において別記されるように、ヒト抗体または他の種由来の抗体は、当技術分野において周知の技術を使用する、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技術を含むがそれに限定されないディスプレイ型の技術を通して生成することができ、結果として生じる分子は、そのような技術が当技術分野において公知のように、親和性成熟などのさらなる成熟にかけることができる。ＷｉｎｔｅｒおよびＨａｒｒｉｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ １４巻：４３～４６頁（１９９３年）およびＷｒｉｇｈｔら Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ． １２１２５～１６８頁（１９９２年）、ＨａｎｅｓおよびＰｌｕｃｔｈａｕ ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９４巻：４９３７～４９４２頁（１９９７年）（リボソームディスプレイ）、ＰａｒｍｌｅｙおよびＳｍｉｔｈ Ｇｅｎｅ ７３巻：３０５～３１８頁（１９８８年）（ファージディスプレイ）、Ｓｃｏｔｔ ＴＩＢＳ １７巻：２４１～２４５頁（１９９２年）、Ｃｗｉｒｌaら Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８７巻：６３７８～６３８２頁（１９９０年）、Ｒｕｓｓｅｌら Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２１巻：１０８１～１０８５頁（１９９３年）、Ｈｏｇａｎｂｏｏｍら Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｉｅｗｓ １３０巻：４３～６８頁（１９９２年）、ＣｈｉｓｗｅｌｌおよびＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ＴＩＢＴＥＣＨ １０巻：８０～８４頁（１９９２年）、および米国特許第５，７３３，７４３号。ディスプレイ技術がヒトでない抗体を産生するために利用される場合、そのような抗体は、上に記載されるようにヒト化することができる。

【０１５８】

生成される抗体は、特定の所望のアイソタイプを最初に有する必要はなく、むしろ、生成される場合、その抗体は、任意のアイソタイプを有することができることが十分に理解される。たとえば、５Ｆ９ハイブリドーマ（ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－８１３２）によって産生される抗体は、ＩｇＧ２アイソタイプを有する。その抗体のアイソタイプは、当技術分野において公知の従来の技術を使用して、その抗体が細胞上のＧＣＣに結合する場合に、ＡＤＣＣ反応を誘発するために、その後、たとえばＩｇＧ１またはＩｇＧ３に切り替えることができる。そのような技術は、とりわけ、直接組換え技術（たとえば米国特許第４，８１６，３９７号を参照されたい）、細胞間融合技術（たとえば米国特許第５，９１６，７７１号を参照されたい）の使用を含む。細胞間融合技術において、任意の所望のアイソタイプを有する重鎖を有するミエローマ細胞系または他の細胞系が調製され、軽鎖を有する他のミエローマ細胞系または他の細胞系が調製される。そのような細胞は、その後、融合することができ、完全な抗体を発現する細胞系を単離することができる。

【０１５９】

ある実施形態では、ＧＣＣ抗体分子は、ヒト抗ＧＣＣ ＩｇＧ１抗体である。そのような抗体が、ＧＣＣ分子への所望の結合を有するので、そのような抗体のうちの任意の１つは、たとえば、なお同じ可変領域（これは、ある程度まで、抗体の特異性および親和性を決定する）を有しながら、容易にアイソタイプを切り替え、ヒトＩｇＧ４アイソタイプを生成することができる。したがって、上記に議論される所望の「構造的な」属性を満たす抗体候補が、生成されるので、それらに、一般に、アイソタイプ切り替えを通して、所望

される少なくともある種のさらなる「機能的な」属性を提供することができる。

【０１６０】

一実施形態では、可変領域またはその抗原結合断片は、それが共に生成される定常領域以外の定常領域（もしくはその断片）たとえば、他の抗体由来の定常領域（もしくはその断片）にまたは合成定常領域（もしくはその断片）に結合することができる。実施形態では、その定常領域は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ２の定常領域（またはその断片）である。配列変化は、抗体分子のエフェクター活性を改変するために可変領域または定常領域において成すことができる。

他の治療薬の設計および生成

ＧＣＣに関して本明細書において産生され、特徴付けられる抗体は、他の抗体、他のアンタゴニスト、または抗体以外の化学的な成分を含む他の治療様式の設計を提供し、それによりその設計が促進される。そのような様式は、限定を伴うことなく、類似する結合活性または機能性を有する抗体、二重特異性抗体、免疫結合体、および放射標識治療薬などの高度な抗体治療薬、ペプチド治療薬、特にイントラボディの生成、ならびに小分子を含む。さらに、上記に議論されるように、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用の使用について、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＥ、またはＩｇＭにアイソタイプを切り替えることによって変化させてもよい。

【０１６１】

二重特異性抗体に関連して、（ｉ）２つの抗体、一方はＧＣＣに対する特異性を有し、他方は一緒に結合体化させる第２の分子に対する特異性を有する、（ｉｉ）ＧＣＣに特異的な１つの鎖および第２の分子に特異的な第２の鎖を有する単一抗体、または（ｉｉｉ）ＧＣＣおよび他の分子に対する特異性を有する単鎖抗体を含む二重特異性抗体を生成することができる。そのような二重特異性抗体は、公知の技術を使用して生成することができる。たとえば、二重特異性抗体は、２つ以上の抗体（同じタイプまたは異なるタイプの）を架橋することによって産生されてもよい。適した架橋剤は、適切なスペーサーによって分離された２つの別個に反応性の基を有するヘテロ二官能性のもの（たとえばｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）またはホモ二官能性のもの（たとえばジスクシンイミジルスベレート）を含む。そのようなリンカーは、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬから入手可能である。たとえばＦａｎｇｅｒら Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４巻：７２～８１頁（１９９４年）ならびにＷｉｎｔｅｒおよびＨａｒｒｉｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ １４巻：４３～４６頁（１９９３年）ならびにＷｒｉｇｈｔら Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２１２５～１６８頁（１９９２年）ならびに（ｉｉｉ）に関連して、たとえばＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ（増刊）７巻：５１～５２頁（１９９２年）．Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ ＆ Ｌａｃｈｍａｎｎ Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９巻：３１５～３２１頁（１９９０年）、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８巻：１５４７～１５５３頁（１９９２年）もまた、参照されたい。

【０１６２】

さらに「カッパボディ（Ｋａｐｐａｂｏｄｙ）」（Ｉｌｌ．ら「Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｈｙｂｒｉｄ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｄｏｍａｉｎ ｗｉｔｈ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｂｏｔｈ ｈｅａｖｙ ａｎｄ ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎｓ」Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ １０巻：９４９～５７頁（１９９７年））、「ミニボディ（Ｍｉｎｉｂｏｄｙ）」（Ｍａｒｔｉｎら ＥＭＢＯ Ｊ １３巻：５３０３～９頁（１９９４年）、米国特許第５，８３７，８２１号）、「ダイアボディ」（Ｈｏｌｌｉｇｅｒら Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９０巻：６４４４～６４４８頁（１９９３年））、または「Ｊａｎｕｓｉｎ」（Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら ＥＭＢＯ Ｊ １０巻：３６５５～３６５９頁（１９９１年）およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ 増

刊７巻：５１～５２頁（１９９２年））もまた、調製されてもよい。
核酸およびポリペプチド
他の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の抗体分子をコードするまたはそれを表わすポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列に関する。そのようなポリヌクレオチドは、重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域および定常領域の両方をコードするが、他の組み合わせが、本明細書に記載の組成物に従って本発明によって企図される。本発明はまた、開示されるポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドに相補的な核酸配列から誘導されるオリゴヌクレオチド断片を企図する。
【０１６３】
ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ形態またはＤＮＡ形態とすることができる。ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、核酸アナログ、および合成ＤＮＡの形態をしているポリヌクレオチドは、本発明の範囲内である。ＤＮＡは、二本鎖であっても一本鎖であってもよく、一本鎖である場合、コード（センス）鎖であっても非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。ポリペプチドをコードするコード配列は、本明細書において提供されるコード配列と同一であってもよいまたはコード配列が、遺伝子コードの重複性または縮重の結果として、本明細書において提供されるＤＮＡと同じポリペプチドをコードする、異なるコード配列であってもよい。
【０１６４】
提供される実施形態では、ポリヌクレオチドは、たとえば表４に要約されるように、本発明の少なくとも１つの重鎖可変領域および少なくとも１つの軽鎖可変領域をコードする。
【０１６５】
本発明はまた、ポリヌクレオチドの欠失、置換、または付加などの改変を含有する改変ポリヌクレオチドおよび改変ポリヌクレオチド配列に起因する任意のポリペプチド改変を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、本明細書において提供されるコード配列の改変体であるコード配列を有していてもよい。たとえば、改変ポリヌクレオチドは、表４に列挙されるポリヌクレオチドと、少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９７％の同一性を有することができる。実施形態では、改変ポリヌクレオチドは、抗ＧＣＣ抗体分子をコードする。
【０１６６】
本発明は、さらに、本発明の抗体を表わすポリペプチドならびにそのようなポリペプチドの断片、アナログ、および誘導体に関する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然に産生されるポリペプチド、または合成ポリペプチドであってもよい。本発明のポリペプチドの断片、誘導体、またはアナログは、１つ以上のアミノ酸残基が、保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）と置換されるもの、およびそのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であってもなくてもよい；またはそれは、１つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むものであってもよい；またはそれは、ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を増加させるための化合物（たとえばポリエチレングリコール）などの他の化合物と融合されるもの；またはそれは、さらなるアミノ酸が、リーダー配列もしくは分泌配列またはポリペプチド配列もしくはプロタンパク質配列の精製に利用される配列などのポリペプチドに融合されるものであってもよい。そのような断片、誘導体、およびアナログは、本発明の範囲内である。様々な態様では、本発明のポリペプチドは、部分的に精製されてもよいまたは精製産物であってもよい。
【０１６７】
本発明のポリペプチドは、たとえば表２もしくは表３に要約される本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列または１つ以上のアミノ酸置換に起因するわずかな変化により異なるアミノ酸配列を有することができる。変化は、典型的に、約１～５個のアミノ酸の範囲での「保存的変化」であってもよく、置換されたアミノ酸は、類似する構造的または化学的特性を有する、たとえば、ロイシンのイソロイシンとのまたはト

レオニンのセリンとの交換；リシンのアルギニンまたはヒスチジンとの交換。対照的に、変化は、非保存的変化、たとえばグリシンのトリプトファンとの交換を含んでいてもよい。類似するわずかな変化はまた、アミノ酸の欠失または挿入もしくはその両方を含んでいてもよい。生物学的または免疫学的活性を変化させることなくどのまたはどれだけのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失させてもよいかを決定する際の手引きは、当技術分野において公知のコンピュータープログラム、たとえばＤＮＡＳＴＡＲソフトウェア（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．）を使用して見出してもよい。

【０１６８】

他の態様では、本発明は、抗ＧＣＣ抗体分子をコードする単離核酸および／または組換え核酸を特徴とする。実施形態では、その核酸は、１つ以上の抗体分子、重鎖、軽鎖、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、本明細書に記載の抗体分子の重鎖および軽鎖の一部（たとえば完全長重鎖可変領域と対になった場合に、抗原結合性となる軽鎖可変領域断片または完全長軽鎖可変領域と対になった場合に、抗原結合性となる重鎖可変領域断片）、ならびにＣＤＲをコードする。実施形態は、ベクター（たとえば発現ベクター）に配置されたそのような核酸を含む。特定の実施形態では、本発明は、プラスミドｐＴＯＫ５８Ｄ－５Ｆ９ＬＣおよびｐＴＯＫ５８Ｄ－５Ｆ９ＨＣを含む。さらに、本発明は、たとえば、プラスミドｐＴＯＫ５８Ｄ－５Ｆ９ＬＣおよびｐＴＯＫ５８Ｄ－５Ｆ９ＨＣによってコードされる抗体分子を発現する宿主細胞によって産生される抗体分子を包含する。

【０１６９】

一実施形態では、

軽鎖可変領域をコードする配列、たとえば表４に列挙される配列、その抗原結合断片、または本明細書に記載の、たとえば表６に記載の軽鎖由来の１、２、もしくは３個のＣＤＲ（および必要に応じてフレームワーク領域）；ならびに

重鎖可変領域をコードする配列、たとえば表４に列挙される配列、その抗原結合断片、または本明細書に記載の、たとえば表６に記載の重鎖由来の１、２、もしくは３個のＣＤＲ（および必要に応じてフレームワーク領域）の一方または両方を含む、ベクター、たとえば発現ベクターが提供される。

【０１７０】

提供される実施形態では、ポリヌクレオチドは、本発明の抗体の少なくとも１つの重鎖可変領域または少なくとも１つの軽鎖可変領域をコードする。提供される実施形態では、ポリペプチドは、本発明の抗体の少なくとも１つの重鎖可変領域および１つの軽鎖可変領域をコードすることができる。

【０１７１】

一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、以下：

（ａ）（ｉ）本明細書に記載の、たとえば表４に記載の抗ＧＣＣ抗体分子コード核酸配列の相補体または（ｉｉ）本発明の抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば、表１および表２に要約される上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、もしくはマウス抗体のうちの１つの軽鎖をコードする任意の核酸配列と、選択されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる軽鎖可変領域またはその抗原結合断片；ならびに

（ｂ）（ｉ）本明細書に記載の、たとえば表４に記載の抗ＧＣＣ抗体分子コード核酸配列の相補体または（ｉｉ）本発明の抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば、表１および表２に要約される上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、もしくはマウス抗体のうちの１つの重鎖をコードする任意の核酸配列と、選択されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる重鎖可変領域またはその抗原結合断片の一方または両方を含む。

【０１７２】

一実施形態では、選択されるストリンジェンシー条件は、たとえば、それらの条件が本明細書に記載のとおり、高ストリンジェンシー条件または超高ストリンジェンシー条件である。

【０１７３】
さらなる態様では、上記抗体または上記抗原結合断片は、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－８１３２を有するＤＮＡによってコードされる抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。他のさらなる態様では、上記抗体または上記抗原結合断片は、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－８１３２を有するＤＮＡによってコードされる抗体の重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を含む。
【０１７４】
本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターを用いて遺伝子操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明の抗体の産生をも提供する。
【０１７５】
適切なＤＮＡ配列は、様々な手順によってベクターに挿入されてもよい。一般に、上記ＤＮＡ配列は、当技術分野において公知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。発現ベクター中のポリヌクレオチド配列は、ｍＲＮＡの合成を指示するために適切な発現制御配列（つまりプロモーター）に作用的に連結される。そのようなプロモーターの例は、ラウス肉腫ウイルスＬＴＲまたは初期もしくは後期ＳＶ４０プロモーター、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｌａｃもしくはｔｒｐ、ファージラムダP_Lプロモーター、および原核生物（たとえばＥ．ｃｏｌｉについてのｔａｃ、Ｔ３、Ｔ７プロモーター）細胞もしくは真核生物（たとえばサイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター）細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが公知の他のプロモーターを含むが、これらに限定されない。上記発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有する。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでいてもよい。たとえば、ベクターは、エンハンサーを含有することができ、これは、ＳＶ４０などのシミアンウイルス、ポリオーマウイルス、サイトメガロウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはモロニー肉腫ウイルスから誘導されたものなどのウイルス起源またはゲノム起源の転写刺激ＤＮＡ配列である。ベクターはまた、好ましくは、複製起点をも含有する。ベクターは、外因性の複製起点を含有するように構築することができるかまたはそのような複製起点は、ＳＶ４０もしくは他のウイルス供給源から誘導することができるかまたは宿主細胞の染色体複製メカニズムによるものとすることができる。
【０１７６】
さらに、上記ベクターは、様々な宿主においてメトトレキセートを用いる選択を可能にするためのジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子、またはβ－ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン抵抗性）、原核生物細胞において使用されるＴｅｔ遺伝子（テトラサイクリン抵抗性のための）もしくはネオマイシン、ＧＡ４１８（ジェネテシン、ネオマイシン誘導体）、ｇｐｔ（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはヒグロマイシン抵抗性遺伝子などの抗生物質抵抗性遺伝子、またはチミジンキナーゼ、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの不在などの、宿主細胞の遺伝子傷害を補完する遺伝子などの、トランスフェクトした宿主細胞の選択のためのマーカー遺伝子を必要に応じて含有する。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子（たとえばＬＥＵ２、ＵＲＡ３、ＨＩＳ３）は、多くの場合、酵母における選択マーカーとして使用される。
【０１７７】
本発明の抗体を得るために、本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域ならびに軽鎖および重鎖定常領域をコードする１つ以上のポリヌクレオチド配列が、ベクターに組み込まれるべきである。本発明の抗体の軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、１つまたは複数のベクターに組み込むことができ、次いで、宿主細胞に組み込まれる。
【０１７８】
哺乳動物の細胞における発現に適した発現ベクターは、たとえば、ｐＣＤＭ８、ｐＣＤＮＡ１．１／ａｍｐ、ｐｃＤＮＡ３．１、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐＥＦ－１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）、ｐＣＭＶ－

ＳＣＲＩＰＴ、ｐＦＢ、ｐＳＧ５、ｐＸＴ１（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）、ｐＣＤＥＦ３（Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｌ．Ａ．ら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，２１巻：１０１３～１０１５頁（１９９６年））、ｐＳＶＳＰＯＲＴ（ＧＩＢＣＯ ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）、ｐＥＦ－Ｂｏｓ（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ，Ｓ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１８巻：５３２２頁（１９９０年））、Ｂｉｃｉｓｔｒｏｎｉｃ ＧＰＥＸ（登録商標）Ｒｅｔｒｏｖｅｃｔｏｒ（Ｇａｌａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ、ＷＩ）、およびその他同種のものを含む。原核生物細胞（Ｅ．ｃｏｌｉ）、昆虫細胞（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓｃｈｎｉｅｄｅｒ Ｓ２細胞、Ｓｆ９）、および酵母（Ｐ．ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ、Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの様々な発現宿主において使用するのに適した発現ベクターもまた、入手可能である。例示的なベクターは、ｐＬＫＴＯＫ５８（野生型ＩｇＧ１ Ｆｃ配列）およびｐＬＫＴＯＫ５９（変異ＩｇＧ１ Ｆｃ配列）である（米国特許出願公開第２００６０１４７４４５号を参照されたい）。

【０１７９】

十分に理解されるように、本発明に従う抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現することができる。特定の抗体についてのｃＤＮＡまたはゲノムクローンをコードする配列は、適した哺乳動物または非哺乳動物の宿主細胞に使用することができる。形質転換は、たとえば、ウイルスに（またはウイルスベクターに）ポリヌクレオチドをパッケージすることおよびウイルス（もしくはベクター）を用いてまたは哺乳動物細胞に異種のポリヌクレオチドを導入するための当技術分野において公知のトランスフェクション手順によって、たとえばデキストラン媒介性のトランスフェクション、リン酸カルシウム沈澱、ポリブレン媒介性のトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームへのポリヌクレオチド（複数可）のカプセル化、およびＤＮＡ分子の直接的なマイクロインジェクションによって、宿主細胞を形質導入することを含む、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する任意の公知の方法によるものとすることができる。使用される形質転換手順は、形質転換されることとなる宿主に依存する。哺乳動物の細胞への異種のポリヌクレオチドの導入のための方法は、当技術分野において公知であり、デキストラン媒介性のトランスフェクション、リン酸カルシウム沈澱、ポリブレン媒介性のトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、リポソームへのポリヌクレオチド（複数可）のカプセル化、ペプチド結合体、デンドリマー、および核へのＤＮＡの直接マイクロインジェクションを含むが、これらに限定されない。

【０１８０】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸を含む宿主細胞を特徴とする。実施形態では、上記細胞は、本明細書に記載の抗体分子またはその構成要素を発現する。なおさらなる実施形態は、抗体分子、たとえば本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体分子を産生する方法であって、発現に適切な条件下で宿主細胞を維持する工程を含み、それによって、免疫グロブリン鎖（複数可）は、発現され、抗体分子が産生される、方法を提供する。さらなる実施形態は、重鎖および軽鎖抗体配列をコードする前述の発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。上記宿主細胞は、真核生物細胞、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核生物細胞、たとえばＥ．ｃｏｌｉとすることができる。たとえば、哺乳動物細胞は、培養細胞または細胞系とすることができる。例示的な哺乳動物細胞は、リンパ球細胞系（たとえばＮＳ０）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、ＣＯＳ細胞を含む。特定の実施形態では、培養宿主細胞は、５Ｆ９抗体分子をコードする核酸配列を含むＣＯＳ細胞である。他の実施形態では、上記宿主細胞は、ハイブリドーマ５Ｆ９（ＰＴＡ－８１３２）である。さらに、細胞は、卵母細胞およびトランスジェニック動物由来の細胞、たとえば乳腺上皮細胞を含む。たとえば、本明細書に記載の抗体分子をコードする核酸は、トランスジェニック非ヒト動物において発現することができる。

【０１８１】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当技術分野において公知であり、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳＯ細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（たとえばＨｅｐ　Ｇ２）、および多くの他の細胞系を含むが、これらに限定されない、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手可能である多くの不死化細胞系を含む。細菌、酵母、昆虫、および植物を含むが、これらに限定されない非哺乳動物細胞もまた、組換え抗体を発現するために使用することができる。グリコシル化を排除するための抗体ＣＨ２ドメインの部位特異的変異誘発は、非ヒトグリコシル化に起因する免疫原性、薬物動態、および／またはエフェクター機能における変化を防止するのに好ましい場合がある。発現方法は、どの系が最も高い発現レベルを生じさせ、構成的ＧＣＣ結合特性を有する抗体を産生するかを決定することによって選択される。

【０１８２】

なおさらなる実施形態は、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体分子を産生する方法であって、免疫グロブリンの発現に適切な条件下で、本明細書に記載の核酸、たとえば表４または表６に列挙される１つ以上の核酸配列を含む宿主細胞を維持する工程を含み、それによって、免疫グロブリン鎖が発現され、抗体分子、たとえばＧＣＣに結合するヒト抗体分子もしくはヒト化抗体分子またはその断片もしくは改変体が産生される、方法を提供する。たとえば、抗体分子の発現の方法は、宿主細胞の使用を含み、ここで、抗体分子、たとえばヒト抗体軽鎖またはヒト化抗体軽鎖をコードする第１の組換え核酸分子および抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体重鎖をコードする第２の組換え核酸分子は、単一の発現ベクターに含まれる。他の実施形態では、それらは、別個のベクターに存在する。所望の場合、上記方法は、抗体、抗体の抗原結合断片、抗体鎖、または抗体鎖の抗原結合断片を単離するまたは回収するステップをさらに含むことができる。

【０１８３】

たとえば、ＧＣＣタンパク質に結合するヒト抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸分子（つまり１つ以上の核酸分子）またはそのような核酸分子（複数可）を含む発現構築物（つまり１つ以上の構築物）は、選択される宿主細胞に適切な任意の方法を使用して（たとえば形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）、組換え宿主細胞を生成するために、適した宿主細胞に導入することができ、その結果、上記核酸分子（複数可）は、１つ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結される（たとえばベクターにおいて、上記細胞におけるプロセスによって生成される構築物において、宿主細胞ゲノムに組み込まれる）。結果として生じる組換え宿主細胞は、発現に適した条件下で維持することができ（たとえば、誘発因子の存在下において、適した非ヒト動物において、適切な塩、増殖因子、抗生物質、栄養サプリメントなどを補充した適した培地において、など）、それによってコードされたポリペプチド（複数可）が、産生される。所望の場合、コードされたタンパク質は、単離するまたは回収することができる（たとえば動物、宿主細胞、培地、ミルクから）。このプロセスは、トランスジェニック非ヒト動物（たとえば、ＷＯ９２／０３９１８、ＧｅｎＰｈａｒｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌを参照されたい）または植物の宿主細胞における発現を包含する。

【０１８４】

さらに、産生細胞系由来の本発明の抗体（またはそれ由来の他の成分）の発現は、多くの公知の技術を使用して増強することができる。たとえば、グルタミンシンテターゼおよびＤＨＦＲ遺伝子発現系は、ある特定の条件下での発現を増強するための共通のアプローチである。高発現細胞クローンは、限界希釈法クローニング（ｌｉｍｉｔｅｄ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｃｌｏｎｉｎｇ）、Ｍｉｃｒｏｄｒｏｐ技術、または当技術分野において公知の任意の他の方法などの従来の技術を使用して同定することができる。ＧＳ系は、欧州特許第０　２１６　８４６号、第０　２５６　０５５号、および第０　３２３　９９７号ならびに欧州特許出願第８９３０３９６４．４号に関連して、全体的または部分的に議論される。

【０１８５】

本発明の改変抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的な系において、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、リン酸カルシウム媒介性のトランスフェクションによって、ｄｈｆｒ－　ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖の遺伝子は、それぞれ、遺伝子の高レベルの転写を駆動するために、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（たとえば、ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントまたはＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントなどの、ＳＶ４０、ＣＭＶ、アデノウイルス、およびその他同種のものに由来する）に作用的に連結される。組換え発現ベクターはまた、ＤＨＦＲ遺伝子を担持し、これは、メトトレキセート選択／増幅を使用するベクターによってトランスフェクトされたＣＨＯ細胞の選択を可能にする。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にするために培養され、完全な抗体が培地から回収される。標準的な分子生物学技術は、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、かつ培地から抗体を回収するために使用される。

【０１８６】

本発明の抗体はまた、対象の免疫グロブリン重鎖配列および軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳動物または植物の生成によってならびにそれから回収可能な形態をしている抗体の産生によってトランスジェニックに（ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃａｌｌｙ）産生することもできる。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物のミルク中に産生し、それから回収することができる。たとえば、米国特許第５，８２７，６９０号、第５，７５６，６８７号、第５，７５０，１７２号、および第５，７４１，９５７号を参照されたい。

【０１８７】

本明細書に記載の抗体、その抗原結合断片、抗体鎖、および抗原結合部分はまた、適したｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現系において、化学合成によって、または任意の他の適した方法によって産生することができる。

融合タンパク質および免疫結合体

本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体は、１つ以上の非抗体分子実体に、任意の適した方法（たとえば化学的結合、遺伝子融合、非共有結合、または別の方法）によって機能的に連結することができる。

【０１８８】

本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子および非抗体成分が、単一の連続的なポリペプチド鎖の構成要素である融合タンパク質を産生することができる。非抗体成分は、抗体成分に関して、Ｎ－末端に、Ｃ－末端に、または内部に配置することができる。たとえば、いくつかの実施形態は、ｐＥＴベクター（たとえばｐＥＴ－１５ｂ、Ｎｏｖａｇｅｎ）、ファージベクター（たとえばｐＣＮＡＴＡＢ　５　Ｅ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、または他のベクター、たとえばｐＲＩＴ２ＴプロテインＡ融合ベクター、Ｐｈａｒｍａｃｉａ）などの適した発現ベクターへの、免疫グロブリン配列をコードする核酸の挿入によって産生することができる。結果として生じる構築物は、非抗体成分（たとえばヒスチジンタグ、Ｅタグ、またはプロテインＡのＩｇＧ結合ドメイン）を含む抗体鎖を産生するために発現させることができる。融合タンパク質は、適した親和性マトリックスを使用するクロマトグラフィーなどの任意の適した技術を使用して、単離するまたは回収することができる（たとえばＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ，　Ｆ．Ｍら編、２巻、増刊２６、１６．４．１～１６．７．８頁（１９９１年）を参照されたい）。

【０１８９】

本発明は、細胞に向けられ、実施形態では、細胞に内部移行される抗ＧＣＣ抗体分子を提供する。それらはＧＣＣを発現する細胞にまたはその細胞中に治療剤または検出可能な作用物質を送達することができるが、標的が発現していない細胞にまたはその細胞中に送達することができない。したがって、本発明はまた、治療剤または検出可能な作用物質と

結合体化させている、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子を含む抗ＧＣＣ免疫結合体を提供する。実施形態では、抗ＧＣＣ免疫結合体のＧＣＣに対する親和性は、結合体化させていない抗体の親和性の少なくとも１０、２５、５０、７５、８０、９０、または９５％である。これは、細胞表面ＧＣＣまたは単離ＧＣＣを使用して、決定することができる。一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子、たとえば免疫結合体は、１，０００、５００、２５０、１００、または５０ｐＭ未満の、本明細書に記載のアッセイによって決定されるＬＤ５０を有する。

【０１９０】

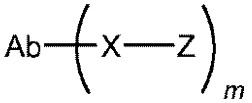
抗ＧＣＣ抗体分子は、当技術分野において公知の技術を利用して、免疫結合体として作用するように改変することができる。たとえばＶｉｔｅｔｔａ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ １４巻：２５２頁（１９９３年）を参照されたい。米国特許第５，１９４，５９４号もまた参照されたい。放射標識抗体の調製物もまた、当技術分野において公知の技術を利用して容易に調製することができる。たとえばＪｕｎｇｈａｎｓら Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ中の６５５～６８６頁（第２版、ＣｈａｆｎｅｒおよびＬｏｎｇｏ編、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｒａｖｅｎ（１９９６年））を参照されたい。米国特許第４，６８１，５８１号、第４，７３５，２１０号、第５，１０１，８２７号、第５，１０２，９９０号（米国再発行特許第３５，５００号）、第５，６４８，４７１号、および第５，６９７，９０２号もまた参照されたい。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、抗体分子および非抗体成分は、リンカーの手段によってつながれる。そのような実施形態では、免疫結合体は、式（Ｉ）によって表され、

【０１９２】

【化７】



(I)

ここで、Ａｂは、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子であり、
Ｘは、ＡｂとＺを接続する成分、たとえば、ＡｂおよびＺの一方または両方への共有結合の後の、本明細書に記載のリンカーの残基であり、
Ｚは、治療剤または標識であり、
ｍは、約１～約１５の範囲にある。

【０１９３】

変数ｍは、式（Ｉ）の免疫結合体における抗体分子当たりの－Ｘ－Ｚ成分の数を表す。様々な実施形態では、ｍは、１～１５、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、または１～２の範囲にある。いくつかの実施形態では、ｍは、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、または２～３の範囲にある。他の実施形態では、ｍは、１、２、３、４、５、または６である。式（Ｉ）の複数の免疫結合体を含む組成物において、ｍは、平均薬剤負荷量とも呼ばれる、Ａｂ当たりの－Ｘ－Ｚ成分の平均数である。平均薬剤負荷量は、Ａｂ当たり１～約１５の－Ｘ－Ｚ成分の範囲にあってもよい。いくつかの実施形態では、ｍが平均薬剤負荷量を表す場合、ｍは、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、または約８である。例示的な実施形態では、ｍは、約２～約８である。一実施形態では、ｍは、約８である。他の実施形態では、ｍは、約４である。他の実施形態では、ｍは、約２である。

【０１９４】

Ａｂ当たりの－Ｘ－Ｚ成分の平均数は、質量分析、ＥＬＩＳＡアッセイ、およびＨＰＬＣなどの従来の手段によって特徴付けられてもよい。ｍに関しての免疫結合体の量的分布もまた、決定されてもよい。いくつかの場合において、ｍが、他の薬剤負荷を有する免疫結合体と区別されるように、一定の値をしている場合の、均質な免疫結合体の分離、精製

、および特徴付けは、逆相ＨＰＬＣまたは電気泳動などの手段によって達成されてもよい。

【０１９５】

式（Ｉ）の免疫結合体は、混合物として存在してもよく、その混合物のそれぞれの構成要素は、異なるｍ値を有する。たとえば、式（Ｉ）の免疫結合体は、２つの別個の免疫結合体構成要素の混合物として存在してもよく、一方の免疫結合体構成要素は、ｍが７であり、他方の免疫結合体構成要素は、ｍが８である。

【０１９６】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、１、２、および３である。

【０１９７】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、３、４、および５である。

【０１９８】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、５、６、および７である。

【０１９９】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、７、８、および９である。

【０２００】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、９、１０、および１１である。

【０２０１】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、１１、１２、および１３である。

【０２０２】

一実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、３つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその３つの別個の免疫結合体についてのｍは、それぞれ、１３、１４、および１５である。

【０２０３】

免疫結合体を調製するのに適した様々なリンカー（たとえば治療剤または標識に抗体分子を接続するためのヘテロ二官能性試薬）および方法は、当技術分野において公知である（たとえばＣｈａｒｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２巻：１２７～１３１頁（１９９２年）を参照されたい）。上記リンカーは、リンカーの切断により、細胞内環境中に薬剤（治療剤または標識）が放出されるように、たとえば生理学的条件下で、たとえば細胞内条件下で、切断可能とすることができる。他の実施形態では、上記リンカーは、切断可能ではなく、上記薬剤は、たとえば抗体分解によって放出される。

【０２０４】

上記リンカーは、抗体成分上の化学的反応基に、たとえば、遊離アミノ基、遊離イミノ基、遊離ヒドロキシル基、遊離チオール基、または遊離カルボキシル基に（たとえばＮ末端もしくはＣ末端に、１つ以上のリシン残基のイプシロンアミノ基に、１つ以上のグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基の遊離カルボン酸基に、または１つ以上のシステイニル残基のスルフヒドリル基に）結合することができる。上記リンカーが結合する部位は、抗体成分のアミノ酸配列における天然の残基とすることができるかまたはそれは、たとえ

ばＤＮＡ組換え技術によって（たとえばアミノ酸配列にシステインもしくはプロテアーゼ切断部位を導入することによって）またはタンパク質生化学（たとえば還元、ｐＨ調整、もしくはタンパク質分解）によって抗体成分に導入することができる。

【０２０５】

共有結合の最も共通して使用される非特異的な方法のうちの１つは、化合物のカルボキシ（またはアミノ）基を抗体分子のアミノ（またはカルボキシ）基に連結するためのカルボジイミド反応である。さらに、ジアルデヒドまたはイミドエステルなどの二機官能性作用物質は、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結するために使用されてきた。シッフ塩基反応もまた、抗体分子への薬剤の付加に利用可能である。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含有する薬剤の過ヨウ素酸酸化を伴い、したがって、抗体分子と次に反応するアルデヒドを形成する。付加は、抗体分子のアミノ基とのシッフ塩基の形成を介して生じる。イソチオシアネートもまた、抗体分子に薬剤を共有結合させるための結合剤として使用することができる。他の技術は、当業者に公知であり、本発明の範囲内である。

【０２０６】

ある実施形態では、リンカー（Ｘ）の前駆体である中間体は、適切な条件下で薬剤（Ｚ）と反応する。ある実施形態では、反応基は、薬剤および／または中間体上で使用される。薬剤および中間体の間の反応の産物または誘導された薬剤は、続いて、適切な条件下で抗体分子と反応させる。

【０２０７】

免疫結合体は、当業者に周知の方法論、たとえばカラムクロマトグラフィー（たとえばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィー）、透析、ダイアフィルトレーション、または沈澱を利用することによって、反応物から精製することができる。免疫結合体は、当業者に周知の方法論、たとえばＳＤＳ－ＰＡＧＥ、質量分析、またはキャピラリー電気泳動を利用することによって評価することができる。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、上記リンカーは、細胞内環境において（たとえばリソソームまたはエンドソームまたはカベオラ（ｃａｖｅｏｌｅａ）内に）存在する切断剤によって切断可能である。上記リンカーは、たとえば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼを含むが、これらに限定されない細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーとすることができる。いくつかの実施形態では、ペプチジルリンカーは、少なくとも２アミノ酸長または少なくとも３アミノ酸長である。切断剤は、カテプシンＢおよびＤならびにプラスミンを含むことができ、これらはすべて、ジペプチド薬剤誘導体を加水分解し、標的細胞の内部で活性薬剤の放出をもたらすことが公知である（たとえばＤｕｂｏｗｃｈｉｋおよびＷａｌｋｅｒ、１９９９年、Ｐｈａｒｍ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　８３巻：６７～１２３頁を参照されたい）。非常に典型的なものは、ＧＣＣ発現細胞に存在する酵素によって切断可能なペプチジルリンカーである。たとえば、癌性組織において高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼのカテプシンＢによって切断可能なペプチジルリンカーを使用することができる（たとえばＰｈｅ－Ｌｅｕリンカーまたは－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙリンカー（配列番号３１９））。そのようなリンカーの他の例は、たとえば、その全体においておよびすべての目的のために参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第６，２１４，３４５号において記載されている。特定の実施形態では、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、Ｖａｌ－ＣｉｔリンカーまたはＰｈｅ－Ｌｙｓリンカーである（たとえば、ｖａｌ－ｃｉｔリンカーを有するドキソルビシンの合成を記載する米国特許第６，２１４，３４５号を参照されたい）。治療剤の細胞内のタンパク分解性の放出を使用するという１つの利点は、その治療剤が、結合体化させた場合、典型的に弱毒化され、その結合体の血清安定性が典型的に高いということである。

【０２０９】

他の実施形態では、切断可能なリンカーは、ｐＨ感受性である、つまり、ある特定のｐＨ値で加水分解に感受性である。典型的に、ｐＨ感受性のリンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。たとえば、リソソームにおいて加水分解可能な酸不安定なリンカー（たとえばヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シスアコニット酸アミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）を使用することができる（たとえば米国特許第５，１２２，３６８号；第５，８２４，８０５号；第５，６２２，９２９号；ＤｕｂｏｗｃｈｉｋおよびＷａｌｋｅｒ、１９９９年、Ｐｈａｒｍ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８３巻：６７～１２３頁；Ｎｅｖｉｌｌｅら、１９８９年、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ． ２６４巻：１４６５３～１４６６１頁を参照されたい）。そのようなリンカーは、血液中におけるものなどの中性のｐＨ条件下で比較的安定しているが、リソソームのおよそのｐＨであるｐＨ５．５または５．０より下では不安定となる。ある実施形態では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカーである（たとえば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に付加されるチオエーテルなど（たとえば米国特許第５，６２２，９２９号を参照されたい）。

【０２１０】

さらにまた他の実施形態では、上記リンカーは、還元条件下で切断可能である（たとえばジスルフィドリンカー）。たとえば、ＳＡＴＡ（Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチルチオアセタート）、ＳＰＤＰ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート）、ＳＰＤＢ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）ブチレート）およびＳＭＰＴ（Ｎ－スクシンイミジル－オキシカルボニル－アルファ－メチル－アルファ－（２－ピリジル－ジチオ）トルエン）、ＳＰＤＢおよびＳＭＰＴを使用して形成することができるものを含む、様々なジスルフィドリンカーは、当技術分野において公知である（たとえばＴｈｏｒｐｅら、１９８７年、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ４７巻：５９２４～５９３１頁；Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ： Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｉｎ Ｒａｄｉｏｉｍａｇｅｒｙ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ（Ｃ．Ｗ．Ｖｏｇｅｌ編、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕ．Ｐｒｅｓｓ、１９８７年中のＷａｗｒｚｙｎｃｚａｋらを参照されたい。米国特許第４，８８０，９３５号もまた参照されたい）。

【０２１１】

さらにまた他の特定の実施形態では、上記リンカーは、マロネートリンカー（Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９５年、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． １５巻：１３８７～９３頁）、マレイミドベンゾイルリンカー（Ｌａｕら、１９９５年、Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ． ３巻（１０号）：１２９９～１３０４頁）、または３’－Ｎ－アミドアナログ（Ｌａｕら、１９９５年、Ｂｉｏｏｒｇ－Ｍｅｄ－Ｃｈｅｍ． ３巻（１０号）：１３０５～１２頁）である。

【０２１２】

さらにまた他の実施形態では、上記リンカー単位は、切断可能ではなく、上記薬剤は、抗体分解によって放出される（たとえば、その全体においておよびすべての目的のために参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００５０２３８６４９号を参照されたい）。

【０２１３】

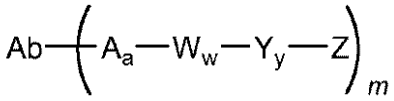
典型的に、上記リンカーは、細胞外環境に実質的に感受性ではない。本明細書において使用されるように、リンカーの文脈における「細胞外環境に実質的に感受性ではない」は、免疫結合体が細胞外環境に（たとえば血漿中に）存在する場合に、その免疫結合体の試料中のリンカーの約２０％以下、典型的には約１５％以下、より典型的には約１０％以下、そしてさらに典型的には約５％以下、約３％以下、または約１％以下しか切断されないことを意味する。リンカーが細胞外環境に実質的に感受性ではないかどうかは、たとえば、所定の期間（たとえば２、４、８、１６、または２４時間）、免疫結合体を血漿とインキュベートし、次いで、血漿中に存在する遊離薬剤の量を定量することによって決定することができる。

【０２１４】
他の相互に排他的でない実施形態では、上記リンカーは、細胞の内部移行を促進する。ある実施形態では、上記リンカーは、治療剤または標識（Ｚ）と結合体化させた場合、細胞の内部移行を促進する。さらにまた他の実施形態では、上記リンカーは、Ｚ成分および抗ＧＣＣ抗体分子の両方と結合体化させた場合、細胞の内部移行を促進する。
【０２１５】
本発明の組成物および方法と共に使用することができる、様々な例示的なリンカーは、ＷＯ２００４－０１０９５７、米国特許出願公開第２００６００７４００８号、米国特許出願公開第２００５０２３８６４９号、および米国特許出願公開第２００６００２４３１７号において記載されている（これらのそれぞれは、その全体がすべての目的のために参照によって本明細書において組み込まれる）。
【０２１６】
治療剤または標識に抗体分子を結合するのに使用することができるリンカーの例は、たとえばマレイミドカプロイル（ｍｃ）；マレイミドカプロイル－ｐ－アミノベンジルカルバメート；マレイミドカプロイル－ペプチド－アミノベンジルカルバメートリンカー、たとえばマレイミドカプロイル－Ｌ－フェニルアラニン－Ｌ－リシン－ｐ－アミノベンジルカルバメートおよびマレイミドカプロイル－Ｌ－バリン－Ｌ－シトルリン－ｐ－アミノベンジルカルバメート（ｖｃ）；Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロプリオネート（Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルジチオ）ペンタノエートまたはＳＰＰとしても公知である）；４－スクシンイミジル－オキシカルボニル－２－メチル－２－（２－ピリジルジチオ）－トルエン（ＳＭＰＴ）；Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）；Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルジチオ）ブチレート（ＳＰＤＢ）；２－イミノチオラン；Ｓ－アセチルコハク酸無水物；ジスルフィドベンジルカルバメート；カルボネート；ヒドラゾンリンカー；Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）スクシンイミドエステル；Ｎ－［４－（ｐ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＭＡＳ）；Ｎ－［β－マレイミドプロピルオキシ］スクシンイミドエステル（ＢＭＰＳ）；［Ｎ－ε－マレイミドカプロイルオキシ］スクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）；Ｎ－［γ－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）；スクシンイミジル－４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシ－［６－アミドカプロエート］（ＬＣ－ＳＭＣＣ）；スクシンイミジル６－（３－［２－ピリジルジチオ］－プロピオンアミド）ヘキサノエート（ＬＣ－ＳＰＤＰ）；ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）；Ｎ－スクシンイミジル［４－ヨードアセチル］アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）；スクシンイミジル４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）；Ｎ－スクシンイミジル３－［２－ピリジルジチオ］－プロピオンアミド（ＳＰＤＰ）；［Ｎ－ε－マレイミドカプロイルオキシ］スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＥＭＣＳ）；Ｎ－［γ－マレイミドブチリルオキシ］スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢＳ）；４－スルホスクシンイミジル－６－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート）（スルホ－ＬＣ－ＳＭＰＴ）；スルホスクシンイミジル６－（３’－［２－ピリジルジチオ］－プロピオンアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ＳＰＤＰ）；ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢＳ）；Ｎ－スルホスクシンイミジル［４－ヨードアセチル］アミノベンゾエート（スルホ－ＳＩＡＢ）；スルホスクシンイミジル４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）；スルホスクシンイミジル４－［ｐ－マレイミドフェニル］ブチレート（スルホ－ＳＭＰＢ）；エチレングリコール－ビス（コハク酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＥＧＳ）；酒石酸ジスクシンイミジル（ＤＳＴ）；１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）；ジエチレントリアミン－五酢酸（ＤＴＰＡ）；およびチオ尿素リンカーを含む。
【０２１７】

いくつかの実施形態では、リンカー－Ｘ－は、式－Ａ$_{a}$－Ｗ$_{w}$－Ｙ$_{y}$－を有し、式（Ｉ）の免疫結合体は、式（ＩＩ）によって特徴付けられ、

【０２１８】

【化８】



(II)

Ａｂは、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子であり、
－Ａ－は、ストレッチャー単位であり、
ａは、０または１であり、
－Ｗ－は、それぞれ、独立して、アミノ酸単位であり、
ｗは、０～１２の範囲の整数であり、
－Ｙ－は、自壊的（ｓｅｌｆ－ｉｍｍｏｌａｔｉｖｅ）スペーサー単位であり、
ｙは、０、１、または２であり、
Ｚは、治療剤または標識であり、
ｍは、約１～約１５の範囲にある。

【０２１９】

ストレッチャー単位（Ａ）が存在する場合、ストレッチャー単位（Ａ）はＡｂ単位を、存在する場合にはアミノ酸単位（－Ｗ－）に、存在する場合にはスペーサー単位（－Ｙ－）に、または治療剤もしくは標識（Ｚ）に連結することができる。天然にまたは化学的な操作を介して抗ＧＣＣ抗体分子上に存在し得る有用な官能基は、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、炭水化物のアノマー位ヒドロキシル基、およびカルボキシルを含むが、これらに限定されない。適した官能基は、スルフヒドリルおよびアミノである。一つの例において、スルフヒドリル基は、抗ＧＣＣ抗体分子の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成することができる。他の実施形態では、スルフヒドリル基は、２－イミノチオラン（Ｔｒａｕｔ試薬）または他のスルフヒドリル生成試薬との、抗ＧＣＣ抗体分子のリシン成分のアミノ基の反応によって生成することができる。ある実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、組換え抗体であり、１つ以上のリシンを運ぶように操作される。ある他の実施形態では、組換え抗ＧＣＣ抗体分子は、さらなるスルフヒドリル基、たとえばさらなるシステインを運ぶように操作される。

【０２２０】

一実施形態では、ストレッチャー単位は、Ａｂ単位の硫黄原子と結合を形成する。硫黄原子は、Ａｂのスルフヒドリル基から誘導することができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式（ＩＩＩａ）および（ＩＩＩｂ）の角括弧内に表され、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｚ、ｗ、およびｙは、上記に定義されるとおりであり、Ｒ^{a}は、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－、－カルボシクロ－、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキレン）－、Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルケニレン）－、－Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルキニレン）－、－アリーレン－、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－アリーレン－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－アリーレン、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－アリーレン、－アリーレン－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－、－アリーレン－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－、－アリーレン－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－（カルボシクロ）－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－（カルボシクロ）－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－（カルボシクロ）－、－（カルボシクロ）－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－、－（カルボシクロ）－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－、－（カルボシクロ）－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン、ヘテロシクロ－、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－（ヘテロシクロ）－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－（ヘテロシクロ）－、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－（ヘテロシクロ）－、－（ヘテロシクロ）－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－、－（ヘテロシクロ）－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルケニレン－、－（ヘテロシクロ）－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{10}$アルキニレン－、－（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｏ）$_{r}$－、または－（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｏ）$_{r}$－ＣＨ$_{2}$－から選択

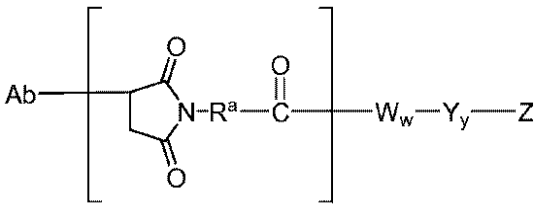
され、ｒは、１～１０の範囲にある整数であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロ、およびアリーレンラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換される。いくつかの実施形態では、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロおよびアリーレンラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、置換されていない。いくつかの実施形態では、R^aは、－C_1～C_{10}アルキレン－、－カルボシクロ－、－Ｏ－（C_1～C_8アルキレン）－、－アリーレン－、－C_1～C_{10}アルキレン－アリーレン－、－アリーレンC_1～C_{10}アルキレン－、－C_1～C_{10}アルキレン－（カルボシクロ）－、－（カルボシクロ）－C_1～C_{10}アルキレン－、－C_3～C_8ヘテロシクロ－、－C_1～C_{10}アルキレン－（ヘテロシクロ）－、－（ヘテロシクロ）－C_1～C_{10}アルキレン－、－（CH_2CH_2O）$_r$－、および－（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－から選択され、ｒは、１～１０の範囲にある整数であり、当該アルキレン基は、置換されておらず、残りの基は、必要に応じて置換される。

【０２２１】

明らかに示されない場合でさえ、１～１５の薬剤成分を、Ａｂに連結することができることをすべての例示的な実施形態から理解される（ｍ＝１～１５）。

【０２２２】

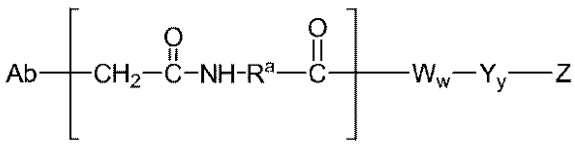
【化９】



(*IIIa*)

【０２２３】

【化１０】

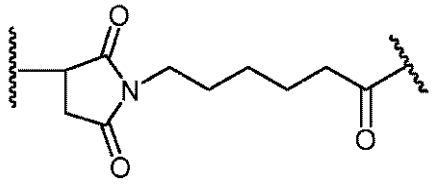


(*IIIb*)

例示のストレッチャー単位は、式（ＩＩＩａ）のものであり、R^aは、－（CH_2）$_5$－である。

【０２２４】

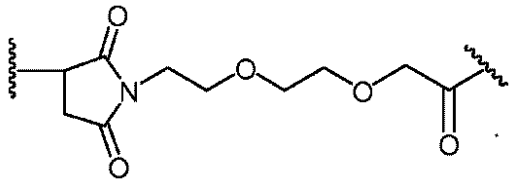
【化１１】



他の例示のストレッチャー単位は、式（ＩＩＩａ）のものであり、R^aは、－（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－であり、ｒは、２である。

【０２２５】

【化１２】



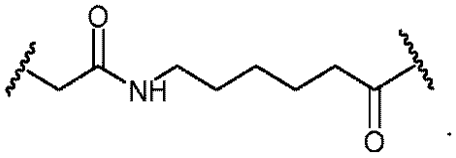
他の例示のストレッチャー単位は、式（ＩＩＩａ）のものであり、Ｒ^{a}は、－アリーレンまたはアリーレン－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキレン－である。いくつかの実施形態では、アリール基は、置換されていないフェニル基である。

【０２２６】

他の例示のストレッチャー単位は、式（ＩＩＩｂ）のものであり、Ｒ^{a}は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－である。

【０２２７】

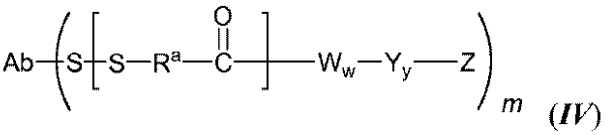
【化１３】



ある実施形態では、ストレッチャー単位は、Ａｂ単位の硫黄原子およびストレッチャー単位の硫黄原子の間のジスルフィド結合を介してＡｂ単位に連結される。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式（ＩＶ）の角括弧内に表され、Ｒ^{a}、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｚ、ｗ、およびｙは、上記に定義されるとおりである。

【０２２８】

【化１４】

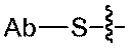


(*IV*)

本出願の全体にわたって、下記の式中のＳ成分は、文脈によって他に示されない限り、Ａｂ単位の硫黄原子を指すことに注意されたい。

【０２２９】

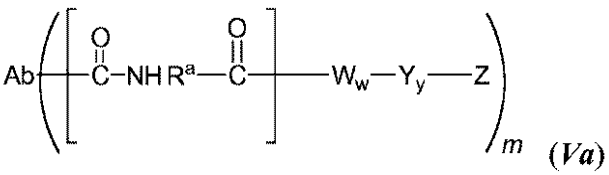
【化１５】



他の実施形態では、ストレッチャーは、Ａｂへの結合前に、Ａｂの第一級または第二級アミノ基と結合を形成することができる反応部位を含有する。これらの反応部位の例は、スクシンイミドエステル、４ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、酸無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、およびイソチオシアネートなどの活性化エステルを含むが、これらに限定されない。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式（Ｖａ）および（Ｖｂ）の角括弧内に表され、－Ｒ^{a}－、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｚ、ｗ、およびｙは、上記に定義されるとおりである。

【０２３０】

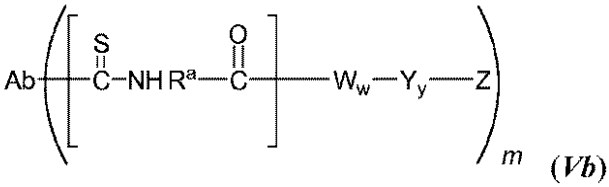
【化１６】



(*Va*)

【０２３１】

【化１７】

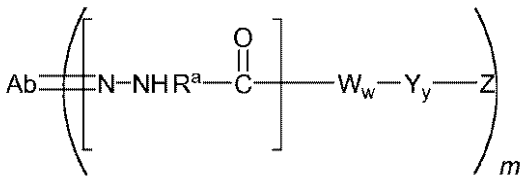


(*Vb*)

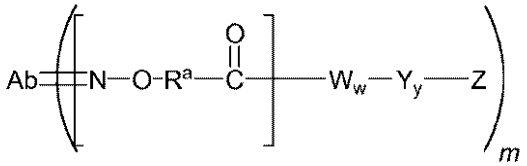
いくつかの実施形態では、ストレッチャーは、Ａｂ上に存在し得る修飾炭水化物の（－ＣＨＯ）基に対し反応性である反応部位を含有する。たとえば、炭水化物は、過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬を使用して穏やかに酸化することができ、酸化された炭水化物の結果として生じる（－ＣＨＯ）単位は、Ｋａｎｅｋｏら、１９９１年、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．　２巻：１３３～４１頁に記載されるものなどのヒドラジド、オキシム、第一級または第二級アミン、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドなどの官能基を含有するストレッチャーと縮合することができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式（ＶＩａ）、（ＶＩｂ）、および（ＶＩｃ）の角括弧内に表され、－Ｒａ－、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｚ、ｗ、およびｙは、上記に定義されるとおりである。

【０２３２】

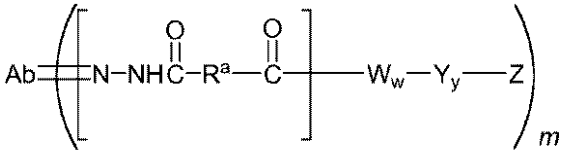
【化１８】



(*VIa*)



(*VIb*)



(*VIc*)

アミノ酸単位（－Ｗ－）が存在する場合、アミノ酸単位（－Ｗ－）はストレッチャー単位を、スペーサー単位が存在する場合にはスペーサー単位に連結し、スペーサー単位が不在である場合にはストレッチャー単位を薬剤成分に連結し、ストレッチャー単位およびスペーサー単位が不在である場合にはＡｂ単位を治療剤または標識成分に連結する。

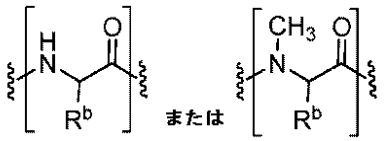
【０２３３】

W_w－は、たとえばモノペプチド、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペン

タペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチド単位とすることができる。それぞれの－Ｗ－単位は、角括弧において下記に示される式を独立して有し、ｗは、０～１２の範囲の整数であり、

【０２３４】

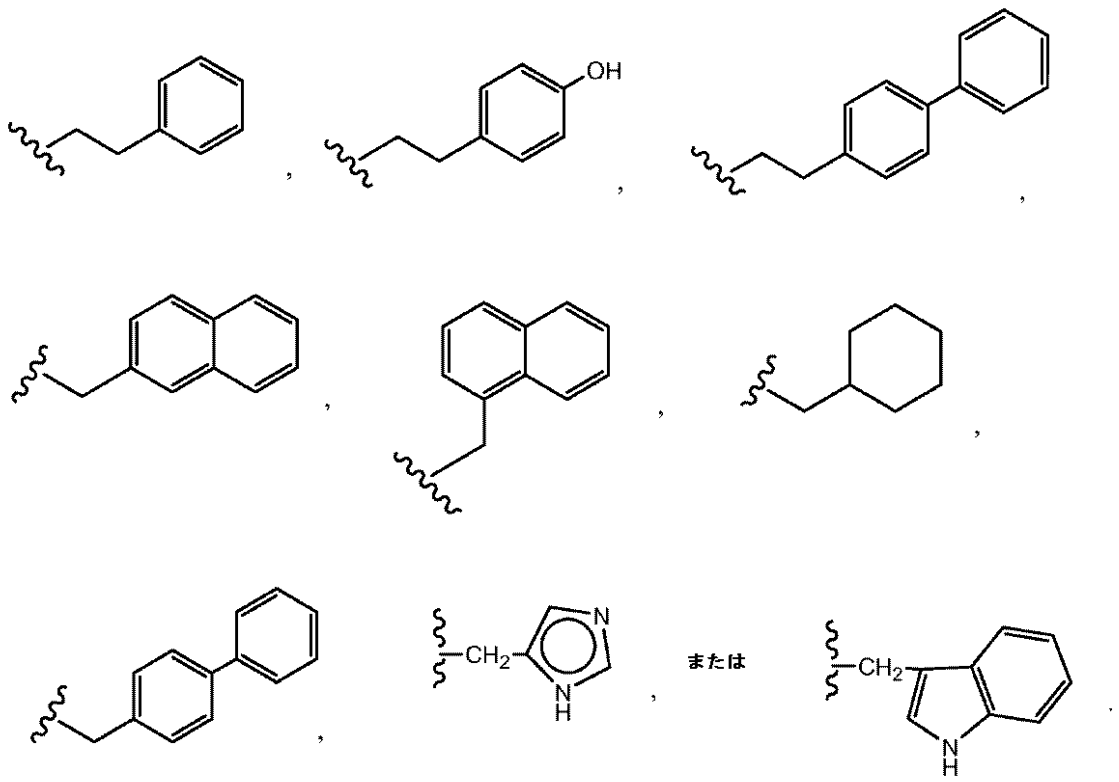
【化１９】



Ｒ^{b}は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ベンジル、ｐ－ヒドロキシベンジル、－ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＳＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＯＯＨ、－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$、－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨ$_2$、－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＨＯ、－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$、－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨ$_2$、－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨＣＯＣＨ$_3$、－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨＣＨＯ、－（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、－（ＣＨ$_2$）$_4$ＮＨＣＯＮＨ$_2$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$、２－ピリジルメチル－、３－ピリジルメチル－、４－ピリジルメチル－、フェニル、シクロヘキシル、

【０２３５】

【化２０】



である。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、アミノ酸単位は、癌または腫瘍関連のプロテアーゼを含む１つ以上の酵素によって酵素的に切断することができ、治療剤または標識成分（－Ｚ）を遊離し、これは、放出に際してｉｎ　ｖｉｖｏにおいて一実施形態においてプロトン化され、治療剤または標識（Ｚ）を提供する。

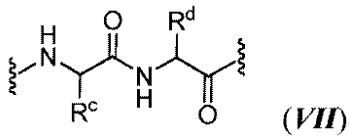
【０２３７】

ある実施形態では、アミノ酸単位は、天然アミノ酸を含むことができる。他の実施形態

では、アミノ酸単位は、非天然アミノ酸を含むことができる。例示のW_w単位は、式（ＶＩＩ）～（ＩＸ）によって表される。

【０２３８】

【化２１】

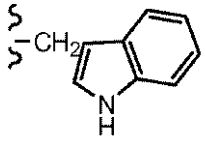


(*VII*)

式中のR^cおよびR^dは、以下のとおりである。

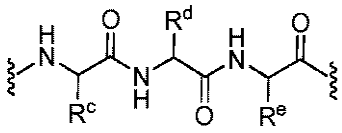
【０２３９】

【化２２】

R^c	R^d
ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
メチル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
ベンジル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
イソブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-ブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
ベンジル	メチル ;
ベンジル	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

【０２４０】

【化２３】



(*VIII*)

式中のR^c、R^d、およびR^eは、以下のとおりである。

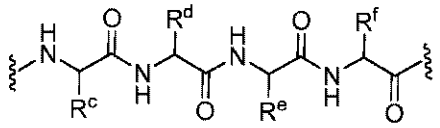
【０２４１】

【化２４】

R^c	R^d	R^e
ベンジル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$; および
H	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;

【０２４２】

【化２５】



(IX)

式中のＲ^{c}、Ｒ^{d}、Ｒ^{e}、およびＲ^{f}は、以下のとおりである。

【０２４３】

【化２６】

R^c	R^d	R^e	R^f
H	ベンジル	イソブチル	H; および
メチル	イソブチル	メチル	イソブチル

例示的なアミノ酸単位は、Ｒ^{c}はベンジルでありかつＲ^{d}は－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$ＮＨ$_{2}$である場合、Ｒ^{c}はイソプロピルでありかつＲ^{d}は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$ＮＨ$_{2}$である場合、またはＲ^{c}はイソプロピルでありかつＲ^{d}は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$ＮＨＣＯＮＨ$_{2}$である場合の式（ＶＩＩ）の単位を含むが、これに限定されない。他の例示的なアミノ酸単位は、式（ＶＩＩ）の単位であり、Ｒ^{c}は、ベンジルであり、Ｒ^{d}は、ベンジルであり、Ｒ^{e}は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4}$ＮＨ$_{2}$である。

【０２４４】

有用な－Ｗ$_{w}$－単位は、特定の酵素、たとえば腫瘍関連のプロテアーゼによる酵素的切断でのそれらの選択性について設計し、最適化することができる。一実施形態では、－Ｗ$_{w}$－単位は、その切断がカテプシンＢ、Ｃ、およびＤまたはプラスミンプロテアーゼによって触媒されるものである。

【０２４５】

一実施形態では、－Ｗ$_{w}$－は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペンタペプチドである。Ｒ^{b}、Ｒ^{c}、Ｒ^{d}、Ｒ^{e}、またはＲ^{f}が水素以外である場合、Ｒ^{b}、Ｒ^{c}、Ｒ^{d}、Ｒ^{e}、またはＲ^{f}が結合する炭素原子は、キラルである。

【０２４６】

Ｒ^{b}、Ｒ^{c}、Ｒ^{d}、Ｒ^{e}、またはＲ^{f}が結合する炭素原子はそれぞれ、独立して（Ｓ）または（Ｒ）配置である。

【０２４７】

アミノ酸単位の一態様では、アミノ酸単位は、バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）である。他の態様では、アミノ酸単位は、フェニルアラニン－リシン（つまりｆｋ）である。アミノ酸単位の他の態様では、アミノ酸単位は、Ｎ－メチルバリン－シトルリンである。他の態様では、アミノ酸単位は、５－アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリシン、テトライソキノリンカルボキシレートリシン、シクロヘキシルアラニンリシン、イソニペコチン酸（ｉｓｏｎｅｐｅｃｏｔｉｃ ａｃｉｄ）リシン、ベーター－アラニンリシン、グリシンセリンバリングルタミン、およびイソニペコチン酸である。

【０２４８】

スペーサー単位（－Ｙ－）は、存在する場合、アミノ酸単位が存在する場合、アミノ酸単位を治療剤または標識成分（－Ｚ－）に連結する。あるいは、スペーサー単位は、アミノ酸単位が不在である場合、ストレッチャー単位を治療剤または標識成分に連結する。スペーサー単位はまた、アミノ酸単位およびストレッチャー単位の両方が不在である場合、治療剤または標識成分をＡｂ単位に連結する。

【０２４９】

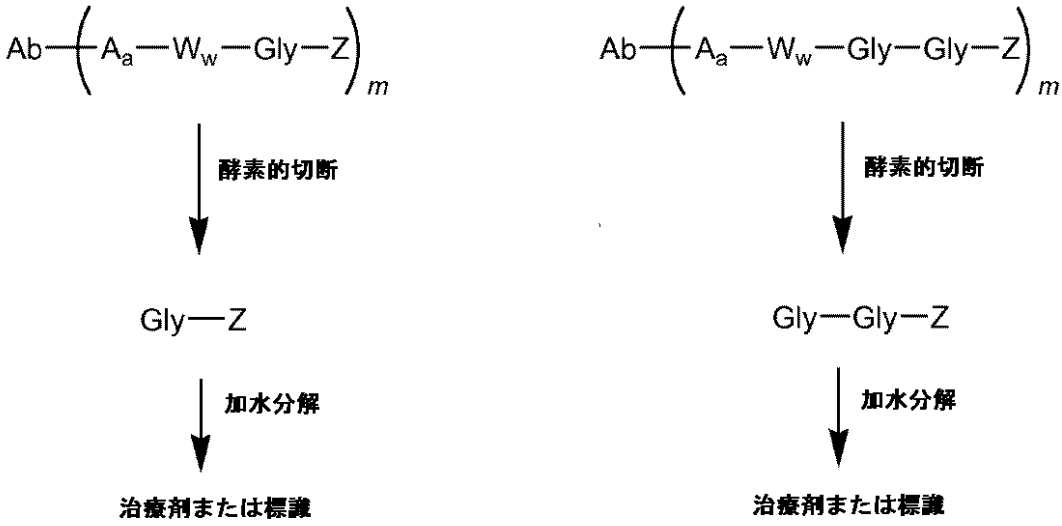
スペーサー単位は、２つの一般的なタイプ、非自壊的単位、自壊的単位がある。非自壊的スペーサー単位は、スペーサー単位の一部またはすべてが、抗体－医薬結合体からのア

ミノ酸単位の切断（特に酵素的切断）の後に、治療剤または標識成分に結合したままであるものである。非自壊的スペーサー単位の例は、（グリシン－グリシン）スペーサー単位およびグリシンスペーサー単位（共にスキーム１に表される）（下記）を含むが、これらに限定されない。グリシン－グリシンスペーサー単位またはグリシンスペーサー単位を含有する結合体が、酵素（たとえば腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、またはリンパ球関連プロテアーゼ）を介して酵素的切断を受ける場合、グリシン－グリシン－Ｚ成分またはグリシン－Ｚ成分は、Ａｂ－Ａａ－Ｗｗ－から切断される。一実施形態では、独立した加水分解反応が、標的細胞内で起こり、グリシン－Ｚ成分結合を切断し、治療剤または標識を遊離させる。

【０２５０】

【化２７】

スキーム１



いくつかの実施形態では、非自壊的スペーサー単位（－Ｙ－）は、－Ｇｌｙ－である。いくつかの実施形態では、非自壊的スペーサー単位（－Ｙ－）は、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－である。

【０２５１】

一実施形態では、本発明は、スペーサー単位が不在（ｙ＝０）である、式（ＩＩ）の免疫結合体またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【０２５２】

あるいは、自壊的スペーサー単位を含有する結合体は、－Ｚを放出することができる。本明細書において使用されるように、用語「自壊的スペーサー」は、間を置いて配置された２つの化学成分を一緒に共有結合で連結し、安定した三連の分子にすることができる二官能性化学成分を指す。第１の成分へのその結合が切断される場合、それは、自発的に、第２の化学成分から分離する。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、－Y_y－は、フェニレン部分がQ_nで置換されるｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）単位であり（スキーム２および３を参照されたい）、Ｑは、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、－Ｏ－（C_1～C_8アルキル）、－Ｏ－（C_2～C_8アルケニル）、－Ｏ－（C_2～C_8アルキニル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり、ｎは、０～４の範囲の整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

【０２５４】

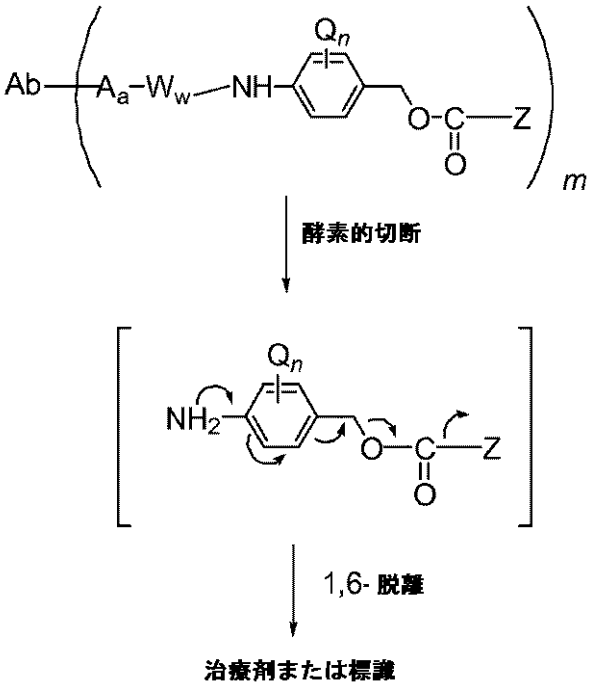
いくつかの実施形態では、－Ｙ－は、ＰＡＢ基のアミノ窒素原子を介して－W_w－に連

結され、カーボネート、カルバメート、またはエーテル基を介して－Ｚに直接つながれるＰＡＢ基である。あらゆる特定の理論またはメカニズムによって拘束されることなく、スキーム２は、Ｔｏｋｉら、２００２年、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６７巻：１８６６～１８７２頁に記載されるように、カルバメートまたはカーボネート基を介して－Ｚに直接結合しているＰＡＢ基からの治療剤または標識（－Ｚ）の放出の、可能性のあるメカニズムを表す。

【０２５５】

【化２８】

スキーム２



スキーム２では、Ｑは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり、ｍは、０～４の範囲の整数であり、ｍは、１～約２０の範囲にある。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

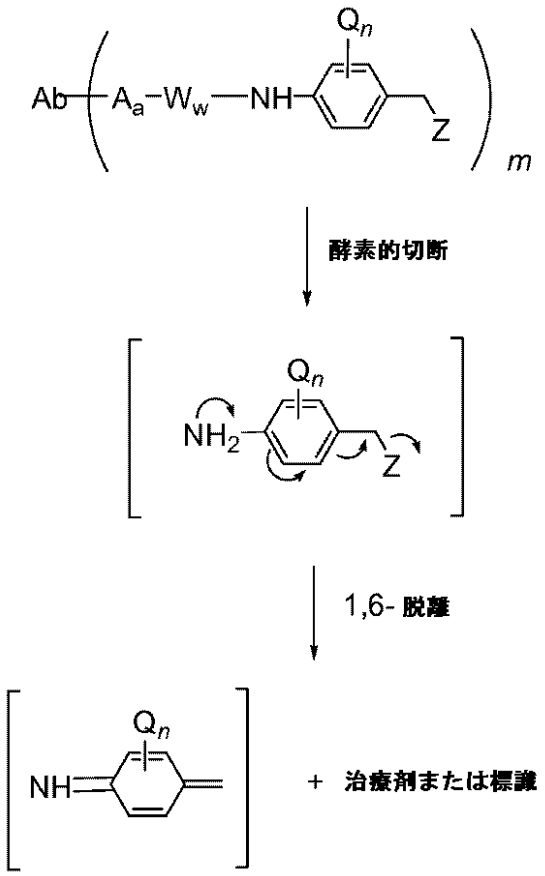
【０２５６】

あらゆる特定の理論またはメカニズムによって拘束されることなく、スキーム３は、エーテル結合またはアミン結合を介して－Ｚに直接結合しているＰＡＢ基からの治療剤または標識成分（－Ｚ）の放出の、可能性のあるメカニズムを表し、－Ｚは、治療剤または標識成分の一部である酸素または窒素基を含む。

【０２５７】

【化２９】

スキーム３



スキーム３では、Ｑは、－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル、－Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$アルキニル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり、ｎは、０～４の範囲の整数であり、ｍは、１～約２０の範囲にある。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

【０２５８】

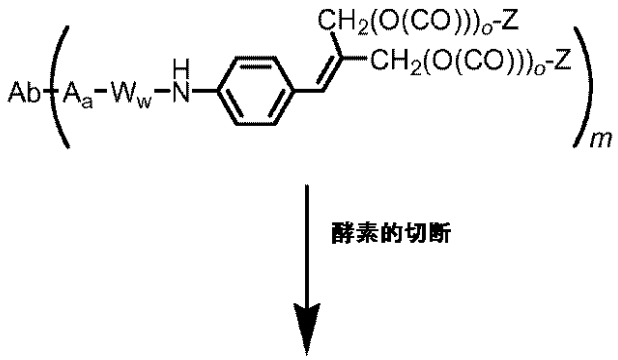
自壊的スペーサーの他の例は、２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体（Ｈａｙら、１９９９年、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．９巻：２２３７頁）およびオルトまたはパラ－アミノベンジルアセタールなどのＰＡＢ基に電子的に類似する芳香族化合物を含むが、これらに限定されない。置換および非置換４－アミノ酪酸アミド（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓら、１９９５年、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２巻：２２３頁）、適切に置換されたビシクロ［２．２．１］およびビシクロ［２．２．２］環系（Ｓｔｏｒｍら、１９７２年、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．　９４巻：５８１５頁）、ならびに２－アミノフェニルプロピオン酸アミド（Ａｍｓｂｅｒｒｙら、１９９０年、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５５巻：５８６７頁）などのアミド結合加水分解に際して環化を経るスペーサーを使用することができる。グリシンのα位で置換されるアミン含有薬剤の脱離（Ｋｉｎｇｓｂｕｒｙら、１９８４年、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２７巻：１４４７頁）もまた、自壊的スペーサーの例である。

【０２５９】

一実施形態では、スペーサー単位は、スキーム４に表される分枝ビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）単位であり、これは、多数の薬剤を組み込み、放出するために使用することができる。

【０２６０】
【化３０】

スキーム４



スキーム４では、Ｑは、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルケニル、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルキニル、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルキニル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり、ｎは、０～４の範囲の整数であり、ｏは、０または１であり、ｍは、１～約２０の整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

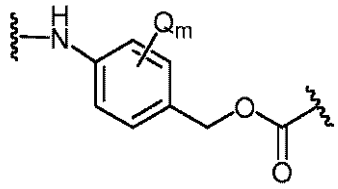
【０２６１】

いくつかの実施形態では、－Ｚ成分は、同じである。他の実施形態では、－Ｚ成分は、異なる。

【０２６２】

一態様では、スペーサー単位（－Ｙ$_{y}$－）は、式（Ｘ）～（ＸＩＩ）によって表され、

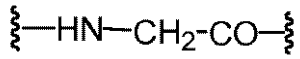
【０２６３】
【化３１】



(*X*)

Ｑは、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルケニル、－Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルキニル、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル）、－Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルケニル）、－Ｏ－（Ｃ$_{2}$～Ｃ$_{8}$アルキニル）、－ハロゲン、－ニトロ、または－シアノであり、ｍは、０～４の範囲にある整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

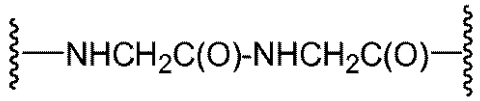
【０２６４】
【化３２】



(*XI*)

および

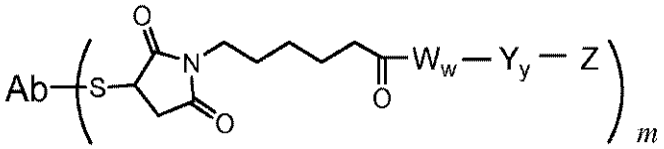
【０２６５】
【化３３】



(*XII*)

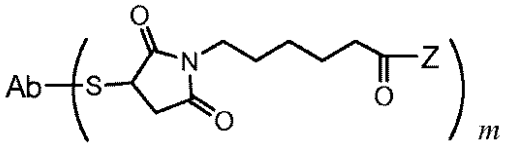
選択される実施形態の群では、式（Ｉ）および（ＩＩ）の結合体は、以下のものであり、

【０２６６】
【化３４】



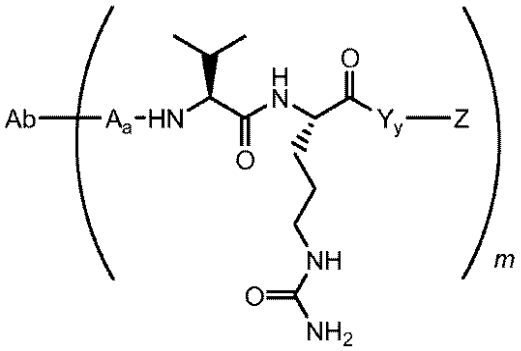
式中のｗおよびｙは、それぞれ、０、１、または２であり、

【０２６７】
【化３５】



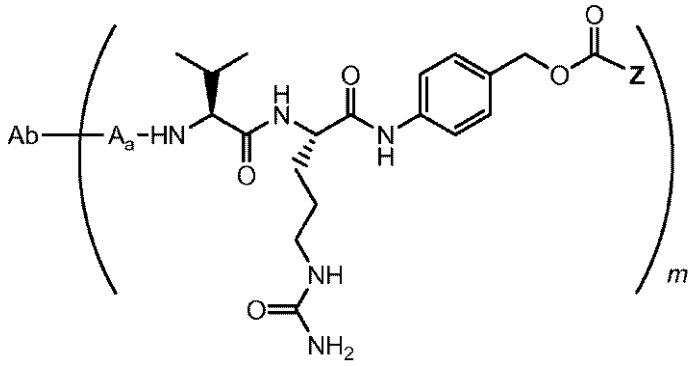
式中のｗおよびｙは、それぞれ、０であり、

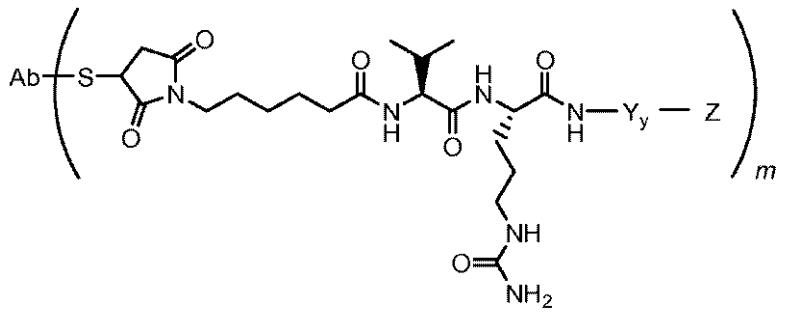
【０２６８】
【化３６】



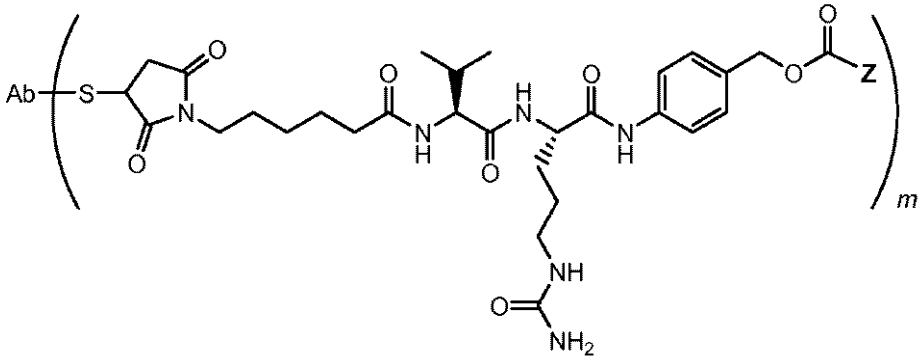
【０２６９】

【化３７】





，および



式中のＡ$_a$、Ｗ$_w$、Ｙ$_y$、Ｚ、およびＡｂは、上記にて提供された意味を有する。

【０２７０】

式（Ｉ）における可変部Ｚは、治療剤または標識である。上記治療剤は、所望の生物学的効果を及ぼすことができる任意の作用物質とすることができる。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、第２の治療様式、たとえば化学療法剤、放射線療法、免疫療法への細胞の感受性を高める。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、治療剤は、細胞増殖抑制剤または細胞傷害剤である。例として、限定を伴うことなく、代謝拮抗薬（たとえばアザチオプリン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、フロクスウリジン（ＦＵＤＲ）、シトシンアラビノシド（シタラビン）、メトトレキセート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセド）；アルキル化剤（たとえばシクロホスファミド、メクロレタミン、ウラムスチン、メルファラン、クロラムブシル、チオテパ／クロラムブシル、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ブスルファン、ジブロモマンニトール、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、トリプラチンテトラニトレート、

プロカルバジン、アルトレタミン、ダカルバジン、ミトゾロミド、テモゾロミド）；アントラサイクリン（たとえばダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン）；抗生物質（たとえばダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン、ストレプトゾトシン、グラミシジンＤ、マイトマイシン類（たとえばマイトマイシンＣ）、デュオカルマイシン類（たとえばＣＣ－１０６５）、カリケアマイシン類）；有糸分裂阻害剤（メイタンシノイド類、アウリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）類、ドラスタチン類、クリプトフィシン類、ビンカアルカロイド（たとえばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン）、タキサン類（たとえばパクリタキセル、ドセタキセル、または新規なタキサン（たとえば、２００１年５月３１日に公開された国際特許出願公開ＷＯ０１／３８３１８を参照されたい）、およびコルヒチン類；トポイソメラーゼ阻害剤（たとえばイリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、テニポシド、ミザントロン）；およびプロテアソーム阻害剤（たとえばペプチジルボロン酸）を含む。

メイタンシノイド免疫結合体

いくつかの実施形態では、上記治療剤は、メイタンシノイドである。たとえば、メイタンシノイド化合物および抗体へのそれらの結合体化のための方法は、Ｃｈａｒｉら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５２巻：１２７～１３１頁（１９９２年）；Ｗｉｄｄｉｓｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４９巻：４３９２～４４０８頁（２００６年）；ならびに米国特許第５，２０８，０２０号および第６，３３３，４１０号において記載されている。メイタンシノイドの例は、修飾芳香環を有するメイタンシン類似体（たとえばＣ－１９－デクロロ、Ｃ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ）および他の位置に修飾を有するもの（たとえばＣ－９－ＣＨ、Ｃ－１４－アルコキシメチル、Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル、Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ、Ｃ－１５－メトキシ、Ｃ－１８－Ｎ－デメチル、４，５－デオキシ）を含む。ある実施形態では、上記メイタンシノイドは、$N^{2'}$－デアセチル－$N^{2'}$－（４－メルカプト－１－オキソペンチル）メイタンシン（ＤＭ３）、$N^{2'}$－デアセチル－$N^{2'}$－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシン（ＤＭ１）、または$N^{2'}$－デアセチル－$N^{2'}$－（４－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）メイタンシン（ＤＭ４）である。

【０２７２】

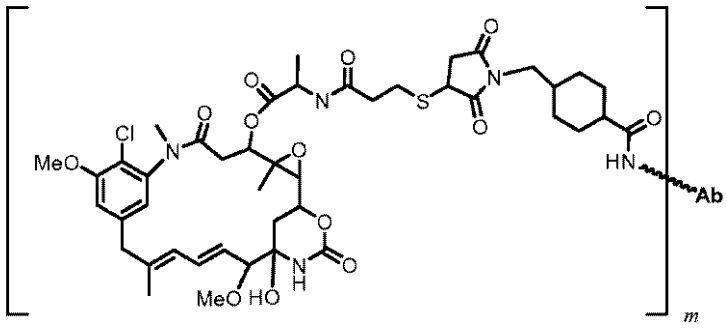
スルフヒドリル基を含むメイタンシノイド化合物は、チオエーテルまたはジスルフィド結合によってメイタンシノイド化合物につながれるヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体に結合することができる。いくつかのそのような実施形態では、上記リンカーは、抗体上のアミノ基（たとえば末端アミノ基またはリシン残基のイプシロンアミノ基）に結合される。いくつかの実施形態では、メイタンシノイド化合物を抗体に結合するために使用されるヘテロ二官能性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロプリオネート（Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルジチオ）ペンタノエート、もしくはＳＰＰ）、４－スクシンイミジル－オキシカルボニル－２－メチル－２－（２－ピリジルジチオ）－トルエン（ＳＭＰＴ）、Ｎ－スクシンイミジル４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）；Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルジチオ）ブチレート（ＳＰＤＢ）、２－イミノチオラン、またはＳ－アセチルコハク酸無水物である。

【０２７３】

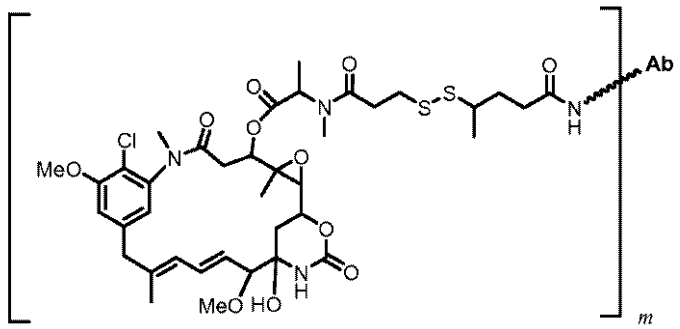
ある実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、式Ａｂ－（ＳＭＣＣ－ＤＭ１）$_m$（式（Ｉ－１）；Ａｂ－（ＳＰＰ－ＤＭ１）$_m$（式（Ｉ－２）；またはＡｂ－（ＳＰＤＢ－ＤＭ４）$_m$（式（Ｉ－３）によって特徴付けられ、ここで、Ａｂは本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子であり、ｍは、式（Ｉ）について上に記載される値および好ましい値を有する。

【０２７４】

【化３８】



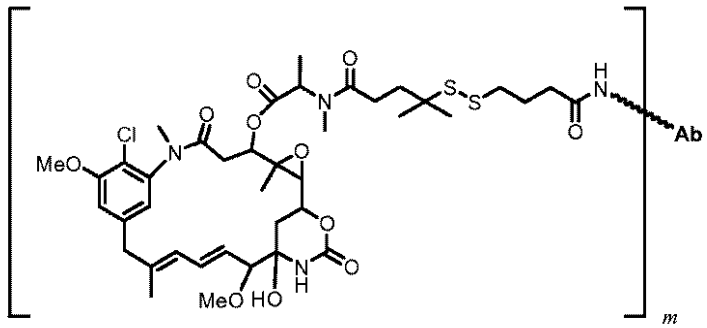
(*I-1*)



(*I-2*)

【０２７５】

【化３９】



(*I-3*)

いくつかの実施形態では、式（Ｉ－１）、（Ｉ－２）、または（Ｉ－３）における可変部Ａｂは、表１～６において要約される特徴を有する抗体分子である。ある実施形態では、可変部Ａｂは、５Ｆ９抗体分子またはＡｂｘ－２２９抗体分子である。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、式（Ｉ－１）、（Ｉ－２）、または（Ｉ－３）における変数ｍは、約１～約１０、約３～約７、または約３～約５の範囲にある。

【０２７７】

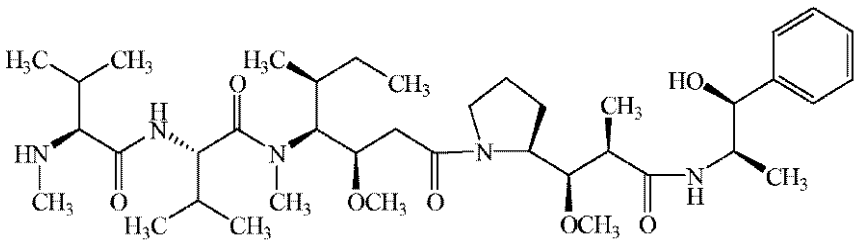
ある特定の実施形態では、本発明は、式（Ｉ－１）、（Ｉ－２）、または（Ｉ－３）の免疫結合体に関しており、ここでＡｂは、５Ｆ９抗体分子であり、ｍは、約４である。

ドラスタチンおよびアウリスタチン免疫結合体

いくつかの他の実施形態では、上記治療剤は、ドラスタチンである。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、アウリスタチンＥ（ドラスチン－１０の誘導体としても当技術分野において公知）などのアウリスタチンまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、式（ＸＩＩＩ）～（ＸＸＩＩＩ）の化合物から選択される化合物またはその薬学的に許容される塩形態である。

【０２７８】

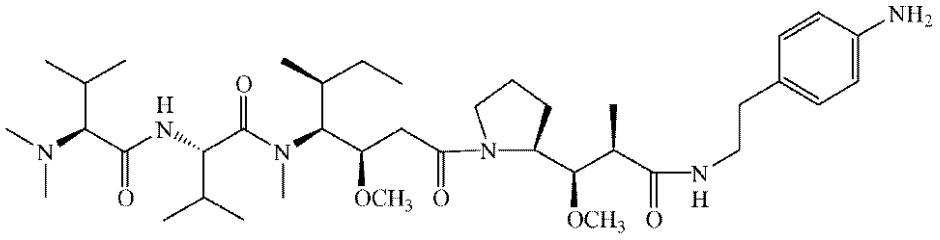
【化４０】



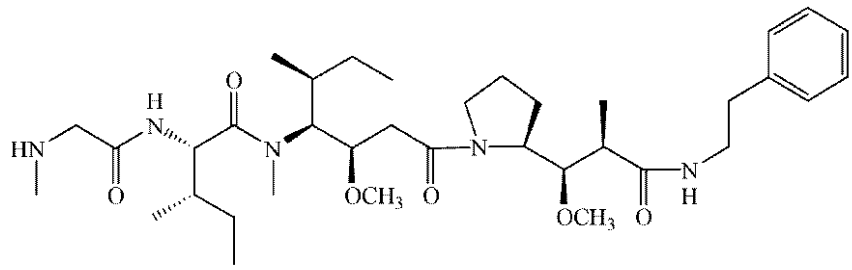
(*XIII*)

【０２７９】

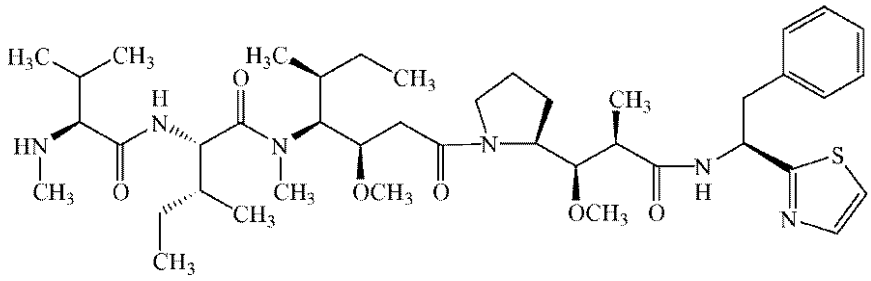
【化４１】



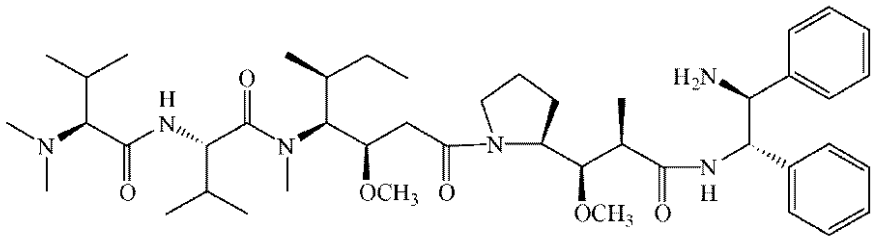
(*XIV*)



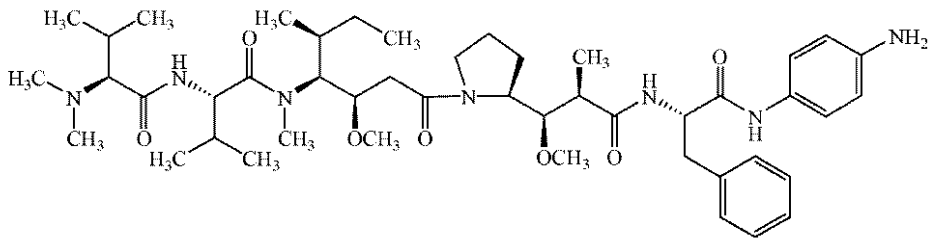
(*XV*)



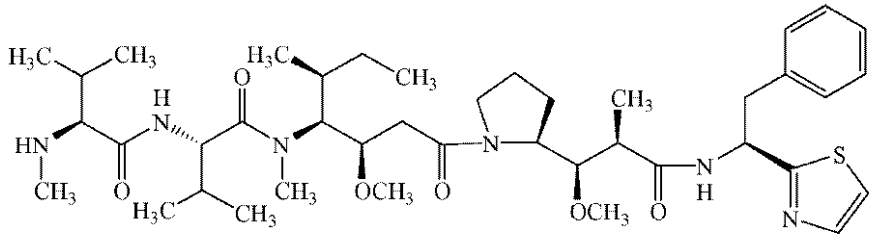
(*XVI*)



(*XVII*)



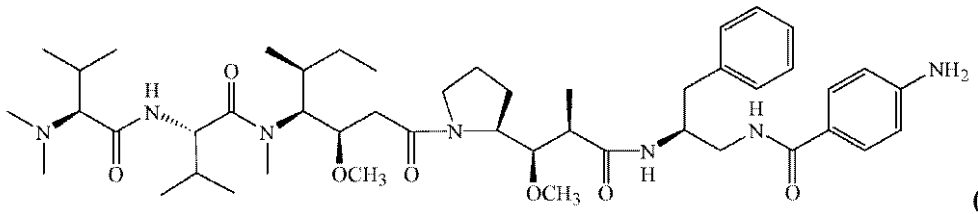
(*XVIII*)



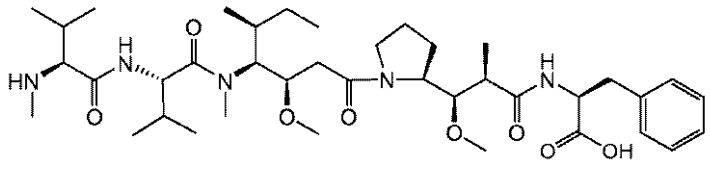
(*XIX*)

【０２８０】

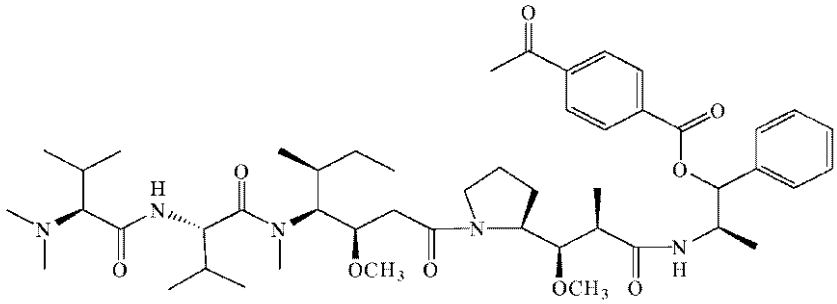
【化４２】



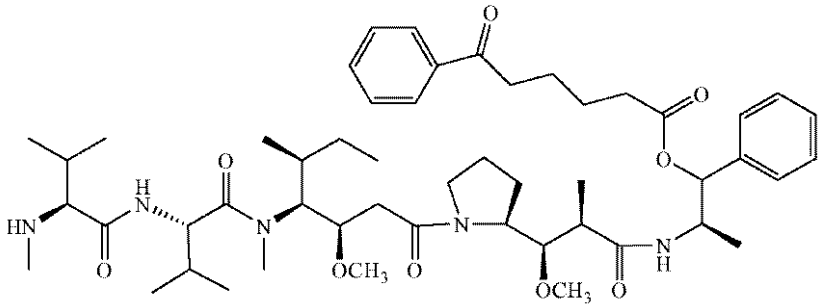
(*XX*)



(*XXI*)



(*XXII*)



(*XXIII*)

アウリスタチン化合物および抗体へのそれらの結合体形成のための方法は、たとえば、Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ.，２１巻：７７８～７８４頁（２００３年）；Ｈａｍｂｌｅｔｔら、Ｃｌｉｎ.Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ.，１０巻：７０６３～７０７０頁（２００４年）；ＣａｒｔｅｒおよびＳｅｎｔｅｒ、Ｃａｎｃｅｒ Ｊ.，１４ １５４～１６９頁（２００８年）；米国特許第７，４９８，２９８号、第７，０９１，１８６号、第６，８８４，８６９号；第６，３２３，３１５号；第６，２３９，１０４号；第６，０３４，０６５号；第５，７８０，５８８号；第５，６６５，８６０号；第５，６６３，１４９号；第５，６３５，４８３号；第５，５９９，９０２号；第５，５５４，７２５号；第５，５３０，０９７号；第５，５２１，２８４号；第５，５０４，１９１号；第５，４１０，０２４号；第５，１３８，０３６号；第５，０７６，９７３号；第４，９８６，９８８号；第４，９７８，７４４号；第４，８７９，２７８号；第４，８１６，４４４号；および第４，４８６，４１４号；米国特許出願公開第２００９００１０９４５号、第２００６００７４００８号、第２００８０３００１９２号、第２００５０００９７５１号、第２００５０２３８６４９号、および第２００３００８３２３６号；ならびに国際特許出願公開第ＷＯ０４／０１０９５７およびＷＯ０２／０８８１７２において記載されており、これらのそれぞれは、その全体においておよびすべての目的のた

めに参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２８１】

上記アウリスタチンは、たとえばアウリスタチンＥおよびケト酸の間で形成されるエステルであり得る。たとえば、アウリスタチンＥは、それぞれ、ＡＥＢおよびＡＥＶＢを生産するためにパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させることができる。他の典型的なアウリスタチンは、アウリスタチンフェニルアラニンフェニレンジアミン（ＡＦＰ；（ＸＶＩＩＩ））、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ；（ＸＩＩＩ））、およびモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ；（ＸＸＩ））を含む。

【０２８２】

アウリスタチンは、微小管動態ならびに核分裂および細胞分裂に干渉することが示されており、このものは抗がん活性を有する。本発明における使用のためのアウリスタチンは、チューブリンに結合し、ＧＣＣ発現細胞系に細胞傷害性または細胞増殖抑制性効果を及ぼすことができる。化合物がチューブリンに結合するかどうかを決定するための方法は、当技術分野において公知である。たとえば、Ｍｕｌｌｅｒら、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ ２００６年、７８巻、４３９０～４３９７頁；Ｈａｍｅｌら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ， １９９５年 ４７巻：９６５～９７６頁；およびＨａｍｅｌら、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ， １９９０年 ２６５巻：２８号、１７１４１～１７１４９頁を参照されたい。本発明の目的のために、チューブリンへの化合物の相対的な親和性を決定することができる。本発明のいくつかの好ましいアウリスタチン類は、チューブリンへのＭＭＡＥの結合親和性よりも１０倍低い（より弱い親和性）～チューブリンへのＭＭＡＥの結合親和性よりも１０倍、２０倍、またはさらに１００倍高い（より高い親和性）範囲の親和性でチューブリンに結合する。

【０２８３】

アウリスタチンまたは結果として生ずる免疫結合体が所望の細胞系に対して細胞増殖抑制性効果または細胞傷害性効果を及ぼすかどうかを決定するために使用することができる、当技術分野において公知の多くの異なるアッセイが存在する。たとえば、免疫結合体の細胞傷害性活性または細胞増殖抑制性活性は、細胞培養基に免疫結合体の標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞を曝露する工程、約６時間～約５日間の期間、細胞を培養する工程、および細胞生存率を測定するする工程によって測定することができる。細胞ベースのｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイは、免疫結合体に関して、生存率（増殖）、細胞傷害性、およびアポトーシス（カスパーゼ活性化）の誘導を測定するために使用することができる。

【０２８４】

免疫結合体が細胞増殖抑制性効果を及ぼすかどうかを決定するために、チミジン取り込みアッセイが使用されてもよい。たとえば、９６ウェルプレートの１ウェルあたり５，０００細胞の密度で、標的抗原を発現するがん細胞は、７２時間の期間、培養し、７２時間の期間の最終の８時間の間に０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンに曝露することができる。培養物の細胞中への^{3}Ｈ－チミジンの組み込みは、免疫結合体の存在および不在下において測定される。

【０２８５】

細胞傷害性を決定するために、ネクローシスまたはアポトーシス（プログラム細胞死）を測定することができる。ネクローシスには、典型的に、形質膜の透過性の増加；細胞の膨張、および形質膜の破裂が伴う。アポトーシスは、典型的に、膜のブレビング、細胞質の凝縮、および内因性エンドヌクレアーゼの活性化によって特徴付けられる。がん細胞に対するこれらの効果のいずれかの決定は、免疫結合体ががんの処置において有用であることを示す。

【０２８６】

細胞生存率は、ニュートラルレッド、トリパンブルー、またはＡＬＡＭＡＲ（商標）ブルーなどの色素の取り込みを細胞において決定することによって測定することができる（たとえばＰａｇｅら、１９９３年、Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ３巻：４７３～４

７６頁を参照されたい）。そのようなアッセイでは、上記細胞は、色素を含有する培地中で培養され、上記細胞は、洗浄され、上記色素の細胞の取り込みを反映する、残留する色素は、分光測光法で測定される。タンパク質結合色素のスルホローダミンＢ（ＳＲＢ）もまた、細胞傷害性を測定するために使用することができる（Ｓｋｅｈａｎら、１９９０年、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．　８２巻：１１０７～１２頁）。

【０２８７】

その代わりに、ＭＴＴまたはＷＳＴなどのテトラゾリウム塩は、死細胞ではなく生きている細胞を検出することによる、哺乳動物の細胞生存および増殖についての定量比色アッセイに使用される（たとえばＭｏｓｍａｎｎ、１９８３年、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　６５巻：５５～６３頁を参照されたい）。

【０２８８】

アポトーシスは、たとえばＤＮＡ断片化を測定することによって定量することができる。ＤＮＡ断片化のｉｎ　ｖｉｔｒｏ定量測定のための市販の測光法が入手可能である。ＴＵＮＥＬ（断片化ＤＮＡにおける標識ヌクレオチドの組み込みを検出する）およびＥＬＩＳＡベースのアッセイを含むそのようなアッセイの例は、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ、１９９９年、第２、３４～３７頁（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）において記載されている。

【０２８９】

アポトーシスはまた、細胞における形態学的変化を測定することによって決定することができる。たとえば、ネクローシスでのように、形質膜完全性の喪失は、ある種の色素（たとえば、たとえばアクリジンオレンジまたは臭化エチジウムなどの蛍光色素）の取り込みを測定することによって決定することができる。アポトーシス細胞の数を測定するための方法は、ＤｕｋｅおよびＣｏｈｅｎ、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　（Ｃｏｌｉｇａｎら編、１９９２年、３．１７．１～３．１７．１６頁）によって記載されている。細胞はまた、ＤＮＡ色素（たとえばアクリジンオレンジ、臭化エチジウム、またはヨウ化プロピジウム）で標識することができ、そして上記細胞は、クロマチン凝縮および内部核膜に沿った縁への移動（ｍａｒｇｉｎａｔｉｏｎ）について観察される。アポトーシスを決定するために測定することができる他の形態学的変化は、たとえば細胞質凝縮、膜のブレビング増加、および細胞の収縮を含む。

【０２９０】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着画分および「浮遊」画分の両方において測定することができる。たとえば、両方の画分は、上清を除去し、付着細胞をトリプシン処理し、遠心分離洗浄ステップ（たとえば２０００ｒｐｍで１０分間）に続いて調製物を組み合わせ、アポトーシスを検出することによって（たとえばＤＮＡ断片化を測定することによって）収集することができる（たとえばＰｉａｚｚａら、１９９５年、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５５巻：３１１０～１６頁を参照されたい）。

【０２９１】

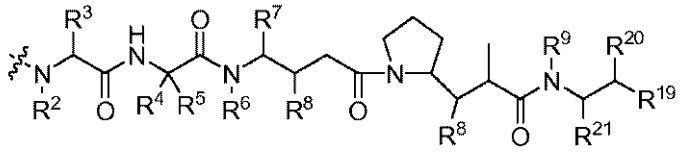
免疫結合体の効果は、動物モデルにおいて試験するまたは検証することができる。がんの多くの確立された動物モデルが、当業者に公知であり、これらのいずれも、免疫結合体の効力をアッセイするために使用することができる。そのようなモデルの非限定的な例は、下記に記載される。さらに、免疫結合体のｉｎ　ｖｉｖｏにおける効力を検査するための小動物モデルは、適切な免疫不全げっ歯動物系統、たとえば無胸腺ヌードマウスまたはＳＣＩＤマウスにヒト腫瘍細胞系を移植することによって作製することができる。

【０２９２】

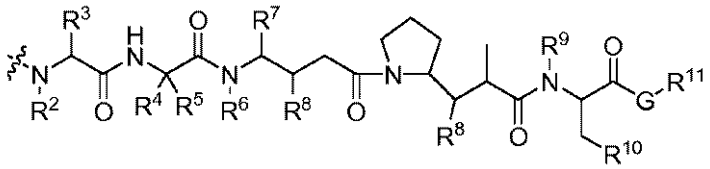
いくつかの実施形態では、式（Ｉ）における可変部－Ｚは、式（Ｘ－Ａ）または式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチン成分であり、

【０２９３】

【化４３】



(*X-A*)



(*X-B*)

それぞれの位置で独立して、
波線は、結合を示し、
R^2は、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、または－C_2～C_{20}アルキニルであり、
R^3は、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、炭素環、－C_1～C_{20}アルキレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルキニレン（炭素環）、－アリール、－C_1～C_{20}アルキレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルケニレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（アリール）、－ヘテロ環、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、または－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）であり、
R^4は、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、炭素環、－C_1～C_{20}アルキレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルキニレン（炭素環）、－アリール、－C_1～C_{20}アルキレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルケニレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（アリール）、－ヘテロ環、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、もしくは－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）であり、
R^5は、－Hもしくは－C_1～C_8アルキルであるか、
またはR^4およびR^5は、共同で環状炭素を形成し、式－（CR^aR^b）$_s$－を有し、R^aおよびR^bは、独立して、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、もしくは－炭素環であり、sは、２、３、４、５、もしくは６であり、
R^6は、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、または－C_2～C_{20}アルキニルであり、
R^7は、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、－炭素環、－C_1～C_{20}アルキレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（炭素環）、－C_2～C_{20}アルキニレン（炭素環）、－アリール、－C_1～C_{20}アルキレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルケニレン（アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（アリール）、ヘテロ環、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、または－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）であり、
R^8は、それぞれ、独立して、－H、－OH、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、－O－（C_1～C_{20}アルキル）、－O－（C_2～C_{20}アルケニル）、－O－（C_1～C_{20}アルキニル）、または－炭素環であり、
R^9は、－H、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、または－C_2～C_{20}アルキニルであり、

R^{19}は、－アリール、－ヘテロ環、または－炭素環であり、
R^{20}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、－炭素環、－Ｏ－（C_1～C_{20}アルキル）、－Ｏ－（C_2～C_{20}アルケニル）、－Ｏ－（C_2～C_{20}アルキニル）、またはOR^{18}であり、R^{18}は、－Ｈ、ヒドロキシル保護基、または直接的結合であり、OR^{18}は、＝Ｏを表し、
R^{21}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、もしくは－C_2～C_{20}アルキニル、－アリール、－ヘテロ環、または－炭素環であり、
R^{10}は、－アリールまたは－ヘテロ環であり、
Ｇは、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＨ－、または－NR^{12}－であり、R^{12}は、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニルであり、
R^{11}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、－アリール、－ヘテロ環、－$(R^{13}O)_s$－R^{14}、または－$(R^{13}O)_s$－$CH(R^{15})_2$であり、
ｓは、０～１０００の範囲の整数であり、
R^{13}は、－C_2～C_{20}アルキレン、－C_2～C_{20}アルケニレン、または－C_2～C_{20}アルキニレンであり、
R^{14}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、または－C_2～C_{20}アルキニルであり、
各R^{15}は独立して、－Ｈ、－ＣＯＯＨ、－$(CH_2)_t$－$N(R^{16})_2$、－$(CH_2)_t$－SO_3H、－$(CH_2)_t$－SO_3－C_1～C_{20}アルキル、－$(CH_2)_t$－SO_3－C_2～C_{20}アルケニル、または－$(CH_2)_t$－SO_3－C_2～C_{20}アルキニルであり、
各R^{16}は独立して、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、または－$(CH_2)_t$－ＣＯＯＨであり、
ｔは、０～６の範囲の整数であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン（ａｌｋｙｎｙｋｌｅｎｅ）、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換される。

【０２９４】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルが置換されていないものを含む。

【０２９５】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、本明細書に記載のとおり、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、およびR^9の基は置換されず、R^{19}、R^{20}、およびR^{21}の基は必要に応じて置換されるものを含む。

【０２９６】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、
R^2は、－C_1～C_8アルキルであり、
R^3、R^4、およびR^7は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、単環式C_3～C_6炭素環、－C_1～C_{20}アルキレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_{20}アルキニレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_6～C_{10}アリール、－C_1～C_{20}アルキレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_2～C_{20}アルケニレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（C_6～C_{10}アリール）、－ヘテロ環、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、もしくは－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、炭素環、アリールおよびヘテロ環ラジカルは、必要に応じて置換され、
R^5は、－水素であり、

R^6は、－C_1～C_8アルキルであり、
R^8はそれぞれ、－ＯＨ、－Ｏ－（C_1～C_{20}アルキル）、－Ｏ－（C_2～C_{20}アルケニル）、もしくは－Ｏ－（C_2～C_{20}アルキニル）から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、
R^9は、－水素もしくは－C_1～C_8アルキルであり、
R^{19}は、必要に応じて置換されるフェニルであり、
R^{20}は、OR^{18}であり、R^{18}は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR^{18}は、＝Ｏを表し、
R^{21}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、もしくは－炭素環から選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、および炭素環ラジカルは、必要に応じて置換されるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【０２９７】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、
R^2は、メチルであり、
R^3は、－Ｈ、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、もしくは－C_2～C_8アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、
R^4は、－Ｈ、C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、－C_2～C_8アルキニル、単環式C_3～C_6炭素環、－C_6～C_{10}アリール、－C_1～C_8アルキレン（C_6～C_{10}アリール）－C_2～C_8アルケニレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_2～C_8アルキニレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_1～C_8アルキレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_8アルケニレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_8アルキニレン（単環式C_3～C_6炭素環）であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、および炭素環ラジカルは、単独であるかもしくは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され、
R^5は、Ｈであり、
R^6は、メチルであり、
R^7は、－C_1～C_8アルキル、－C_2～C_8アルケニル、もしくは－C_2～C_8アルキニルであり、
R^8はそれぞれ、メトキシであり、
R^9は、－水素もしくは－C_1～C_8アルキルであり、
R^{19}は、フェニルであり、
R^{20}は、OR^{18}であり、R^{18}は、－Ｈ、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR^{18}は、＝Ｏを表し、
R^{21}は、メチルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【０２９８】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、
R^2は、メチルであり、R^3は、ＨもしくはC$_1$～C$_3$アルキルであり、R^4は、C$_1$～C$_5$アルキルであり、R^5は、Ｈであり、R^6は、メチルであり、R^7は、イソプロピルもしくはｓｅｃ－ブチルであり、R^8は、メトキシであり、R^9は、水素もしくはC$_1$～C$_8$アルキルであり、R^{19}は、フェニルであり、R^{20}は、OR^{18}であり、R^{18}は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR^{18}は、＝Ｏを表し、R^{21}は、メチルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【０２９９】

式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチンは、
R^2は、メチルもしくはC$_1$～C$_3$アルキルであり、R^3は、ＨもしくはC$_1$～C$_3$アルキルであり、R^4は、C$_1$～C$_5$アルキルであり、R^5は、Ｈであり、R^6は、C$_1$～C$_3$アルキルであり、R^7は、C$_1$～C$_5$アルキルであり、R^8は、C$_1$～C$_3$アルコキシであり、R^9は、水素もしくはC$_1$～C$_8$アルキルであり、R^{19}は、フェニルであり、

R^{20}は、OR^{18}であり、R^{18}は、H、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR^{18}は、＝Oを表し、R^{21}は、C_1～C_3アルキルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【０３００】

式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、

R^2は、メチルであり、

R^3、R^4、およびR^7は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、単環式C_3～C_6炭素環、－C_1～C_{20}アルキレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_2～C_{20}アルキニレン（単環式C_3～C_6炭素環）、－C_6～C_{10}アリール、－C_1～C_{20}アルキレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_2～C_{20}アルケニレン（C_6～C_{10}アリール）、－C_2～C_{20}アルキニレン（C_6～C_{10}アリール）、－ヘテロ環、－C_1～C_{20}アルキレン（ヘテロ環）、－C_2～C_{20}アルケニレン（ヘテロ環）、もしくは－C_2～C_{20}アルキニレン（ヘテロ環）から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、炭素環、アリール、およびヘテロ環式ラジカルは、単独であるかもしくは他の基の一部であるかどうかに関わらず必要に応じて置換され、

R^5は、－Ｈであり、

R^6は、メチルであり、

R^8はそれぞれ、メトキシであり、

R^9は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、もしくは－C_2～C_{20}アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

R^{10}は、必要に応じて置換されるアリールもしくは必要に応じて置換されるヘテロ環であり、

Ｇは、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＨ－、もしくは－NR^{12}－であり、R^{12}は、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、もしくは－C_2～C_{20}アルキニルであり、これらのそれぞれは、必要に応じて置換され、

R^{11}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、－アリール、－ヘテロ環、－$(R^{13}O)_s$－R^{14}、もしくは－$(R^{13}O)_s$－$CH(R^{15})_2$であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロ環ラジカルは、必要に応じて置換され、

ｓは、０～１０００の範囲の整数であり、

R^{13}は、－C_2～C_{20}アルキレン、－C_2～C_{20}アルケニレン、もしくは－C_2～C_{20}アルキニレンであり、これらのそれぞれは、必要に応じて置換され、

R^{14}は、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、もしくは－C_2～C_{20}アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

各R^{15}は独立して、－Ｈ、－ＣＯＯＨ、－$(CH_2)_t$－$N(R^{16})_2$、－$(CH_2)_t$－SO_3H、－$(CH_2)_t$－SO_3－C_1～C_{20}アルキル、－$(CH_2)_t$－SO_3－C_2～C_{20}アルケニル、もしくは－$(CH_2)_t$－SO_3－C_2～C_{20}アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

各R^{16}は独立して、－Ｈ、－C_1～C_{20}アルキル、－C_2～C_{20}アルケニル、－C_2～C_{20}アルキニル、もしくは－$(CH_2)_t$－ＣＯＯＨであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

ｔは、０～６の範囲の整数であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

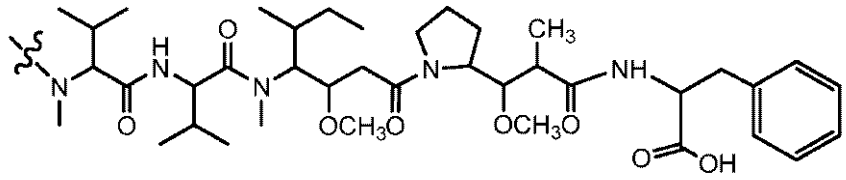
【０３０１】

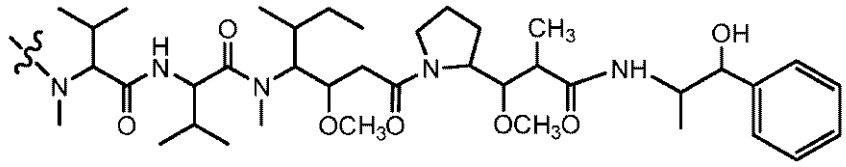
これらのうちの特定の実施形態では、R^{10}は、必要に応じて置換されるフェニルである。

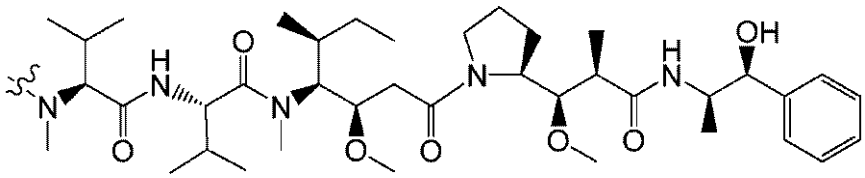
【０３０２】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、およびＲ^{9}の基は置換されず、かつＲ^{10}およびＲ^{11}の基は本明細書に記載のとおりであるものを含む。
【０３０３】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルが置換されていないものを含む。
【０３０４】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、
Ｒ^{2}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{3}は、ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{4}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{6}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{7}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{8}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルコキシであり、Ｒ^{9}は、水素もしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルであり、Ｒ^{10}は、必要に応じて置換されるフェニルであり、Ｇは、Ｏ、Ｓ、もしくはＮＨであり、Ｒ^{11}は、本明細書において定義されるとおりであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。
【０３０５】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、
Ｒ^{2}は、メチルであり、Ｒ^{3}は、ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{4}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{6}は、メチルであり、Ｒ^{7}は、イソプロピルもしくはｓｅｃ－ブチルであり、Ｒ^{8}は、メトキシであり、Ｒ^{9}は、水素もしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルであり、Ｒ^{10}は、必要に応じて置換されるフェニルであり、Ｇは、Ｏ、Ｓ、もしくはＮＨであり、Ｒ^{11}は、本明細書において定義されるとおりであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。
【０３０６】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、
Ｒ^{2}は、メチルであり、Ｒ^{3}は、ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{4}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{6}は、メチルであり、Ｒ^{7}は、イソプロピルもしくはｓｅｃ－ブチルであり、Ｒ^{8}は、メトキシであり、Ｒ^{9}は、水素もしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルであり、Ｒ^{10}は、フェニルであり、Ｇは、ＯもしくはＮＨであり、Ｒ^{11}は、本明細書において定義されるとおりであり、好ましくは水素であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。
【０３０７】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、
Ｒ^{2}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{3}は、ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{4}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{6}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルであり、Ｒ^{7}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{5}$アルキルであり、Ｒ^{8}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルコキシであり、Ｒ^{9}は、水素もしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルであり、Ｒ^{10}は、フェニルであり、Ｇは、ＯもしくはＮＨであり、Ｒ^{11}は、本明細書において定義されるとおりであり、好ましくは水素であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。
【０３０８】
式（Ｘ－Ａ）または（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{7}は、独立して、イソプロピルまたはｓｅｃ－ブチルであり、Ｒ^{5}は、－Ｈであるものを含む。例示的な実施形態では、Ｒ^{3}およびＲ^{4}はそれぞれ、イソプロピルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{7}は、ｓｅｃ－ブチルである。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３０９】
式（Ｘ－Ａ）または（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{2}およびＲ^{6}はそれぞれ、メチルであり、Ｒ^{9}は、Ｈであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

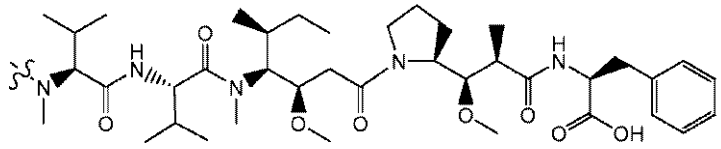
【０３１０】
式（Ｘ－Ａ）または（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、各Ｒ^{8}は－ＯＣＨ$_{3}$であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１１】
式（Ｘ－Ａ）または（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{3}およびＲ^{4}は、それぞれ、イソプロピルであり、Ｒ^{2}およびＲ^{6}は、それぞれ、メチルであり、Ｒ^{5}は、Ｈであり、Ｒ^{7}は、ｓｅｃ－ブチルであり、各Ｒ^{8}は－ＯＣＨ$_{3}$であり、Ｒ^{9}は、Ｈであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１２】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｇは、－Ｏ－または－ＮＨ－であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１３】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{10}は、アリールであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１４】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｒ^{10}は、－フェニルであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１５】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｇは、－Ｏ－であり、Ｒ^{11}は、Ｈ、メチル、またはｔ－ブチルであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１６】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｇが－ＮＨである場合、Ｒ^{11}は、－（Ｒ^{13}Ｏ）$_{s}$－ＣＨ（Ｒ^{15}）$_{2}$であり、Ｒ^{15}は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{t}$－Ｎ（Ｒ^{16}）$_{2}$であり、Ｒ^{16}は、－Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルまたは－（ＣＨ$_{2}$）$_{t}$－ＣＯＯＨであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１７】
式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチンは、Ｇが－ＮＨである場合、Ｒ^{11}は、－（Ｒ^{13}Ｏ）$_{s}$－ＣＨ（Ｒ^{15}）$_{2}$であり、Ｒ^{15}は、Ｈまたは－（ＣＨ$_{2}$）$_{t}$－ＳＯ$_{3}$Ｈであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。
【０３１８】
式（ＩＩ）の免疫結合体の好ましい実施形態では、Ｚが式（Ｘ－Ａ）のアウリスタチン分子である場合、ｗは１～１２、好ましくは２～１２の範囲の整数であり、ｙは、１または２であり、ａは、好ましくは１である。
【０３１９】
式（ＩＩ）の免疫結合体のいくつかの実施形態では、Ｚが式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチン分子である場合、ａは、１であり、ｗおよびｙは、０である。
【０３２０】
例示の治療剤（－Ｚ）は、以下の構造を有するものを含む。
【０３２１】

【化４４】



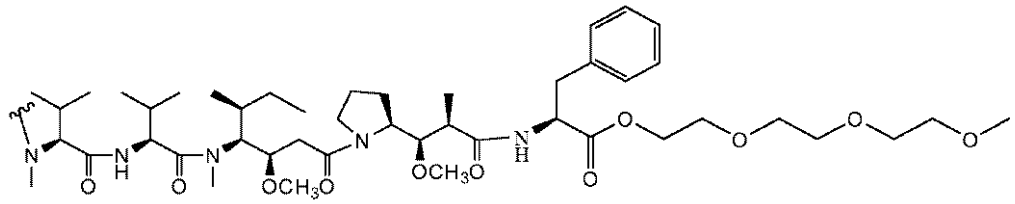




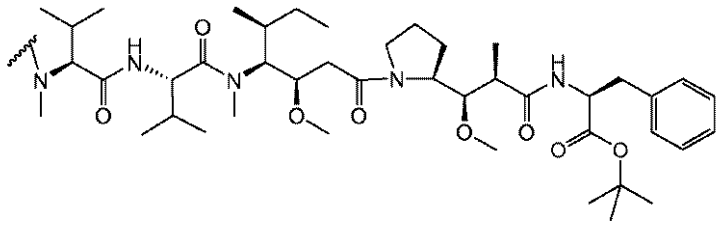


【０３２２】

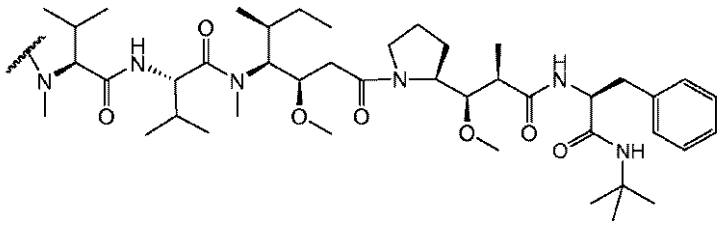
【化４５】



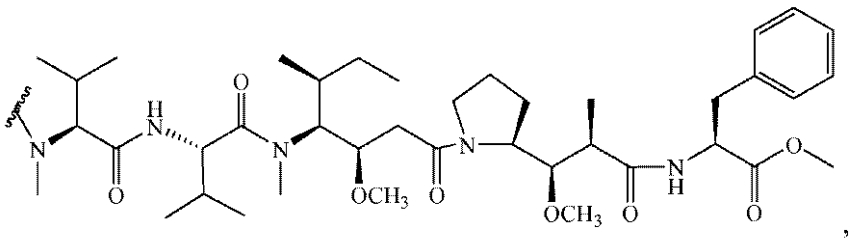
,



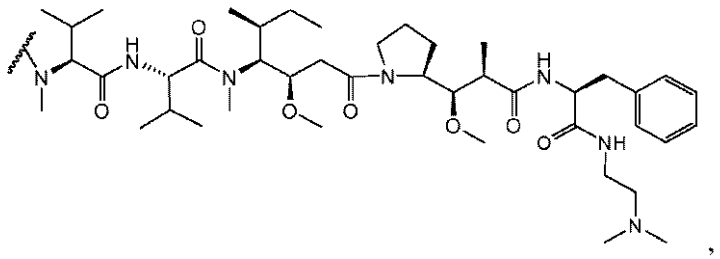
,



,



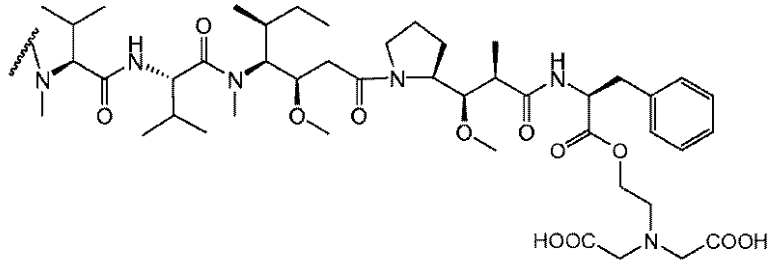
,



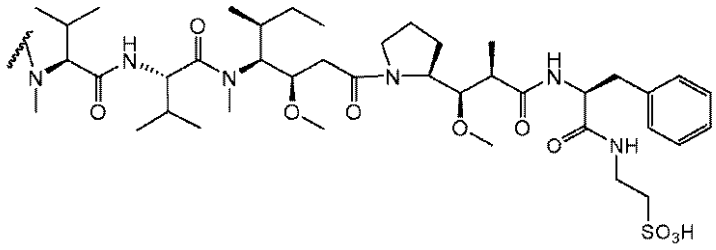
,

【０３２３】

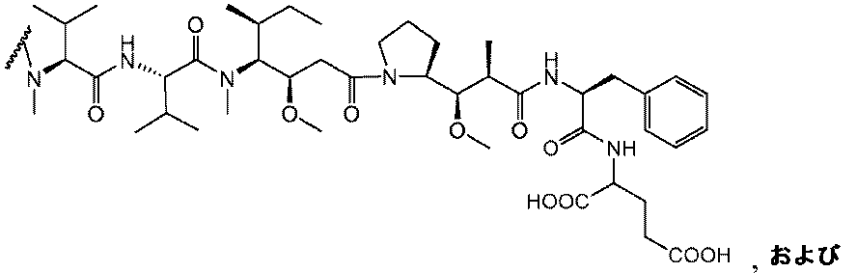
【化４６】



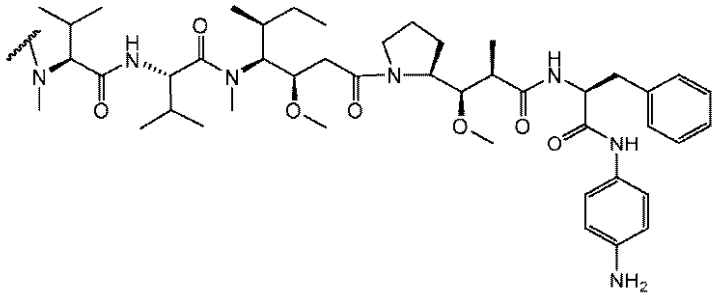
,



,



, **および**



一態様では、限定されるものではないが、トリエチレングリコールエステル（ＴＥＧ）などの親水基は、Ｒ^{11}で、式（Ｘ－Ｂ）のアウリスタチン分子に結合することができる。理論によって拘束されることなく、親水基は、治療剤の内部移行および非凝集を助ける。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、治療剤は、ＴＺＴ－１０２７ではない。いくつかの実施形態では、治療剤は、アウリスタチンＥでも、ドラスタチン１０でも、アウリスタチンＰＥでもない。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、アウリスタチン分子は、マレイミド成分、たとえばマレイミドカプロイル成分を含むリンカーを介して抗体分子上のシステイン成分に連結される。

【０３２６】

いくつかの実施形態では、アウリスタチン分子は、アウリスタチン分子上のヒドロキシル基につながれたヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体分子に結合される。いくつかのそのような実施形態では、リンカーは、ヒドラゾンを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、マレイミドカプロイルヒドラジドおよびケトカルボン酸、たとえば５－ベンゾイル吉草酸の反応によって形成されるヒドラゾン化合物である。特定の実施形態では、リンカーは、（Ｚ）－６－（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラゾノ）－６－フェニルヘキサン酸である。

【０３２７】

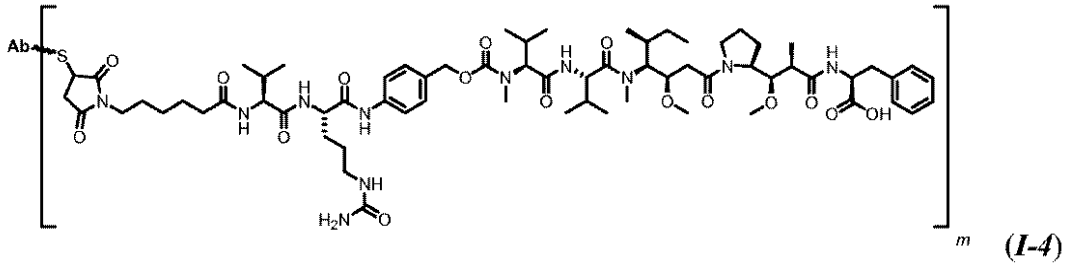
他のいくつかの実施形態では、アウリスタチン分子は、アウリスタチン分子上のモノメチルアミノ基につながれたヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能な成分、たとえばペプチド成分および自壊的ｐ－アミノベンジルカルバメートスペーサーを含む。例示的なリンカーは、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、マレイミドカプロイル－Ｌ－フェニルアラニン－Ｌ－リシン－ｐ－アミノベンジルカルバメート、およびマレイミドカプロイル－Ｌ－バリン－Ｌ－シトルリン－ｐ－アミノベンジルカルバメート（ｖｃ）を含む。

【０３２８】

ある実施形態では、式（Ｉ）の免疫結合体は、式Ａｂ－（ｖｃ－ＭＭＡＦ）$_m$（式（Ｉ－４））；Ａｂ－（ｖｃ－ＭＭＡＥ）$_m$（式（Ｉ－５））；Ａｂ－（ｍｃ－ＭＭＡＥ）$_m$（式（Ｉ－６））；またはＡｂ－（ｍｃ－ＭＭＡＦ）$_m$（式（Ｉ－７））によって特徴付けられ、Ａｂは、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子であり、Ｓは、抗体の硫黄原子であり、ｍは、式（Ｉ）について上に記載される値および好ましい値を有する。ある実施形態では、ｍは、１～約５の整数である。

【０３２９】

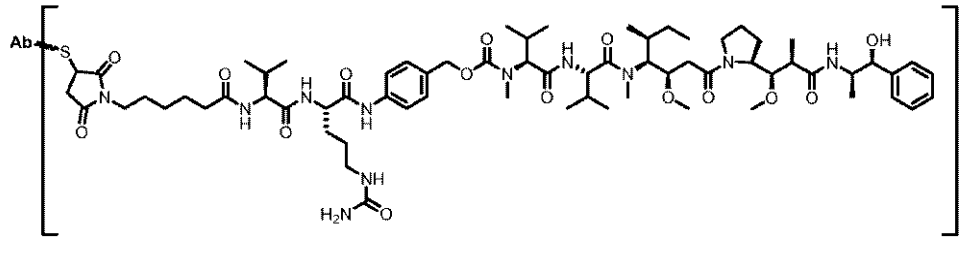
【化４７】



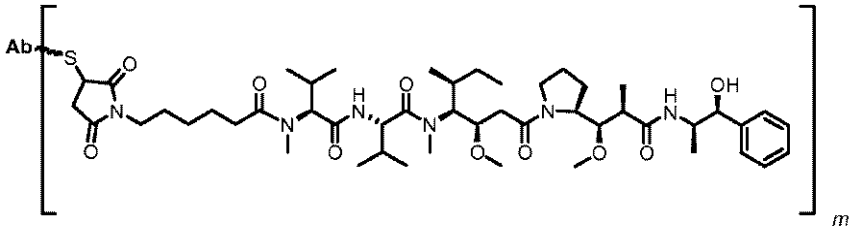
(I-4)

【０３３０】

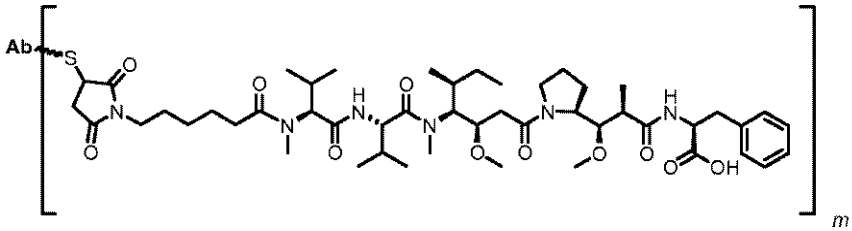
【化４８】



(I-5)



(I-6)



(I-7)

いくつかの実施形態では、式（Ｉ－４）、（Ｉ－５）、（Ｉ－６）、または（Ｉ－７）における可変部Ａｂは、表１～６において要約される特徴を有する抗体分子である。ある実施形態では、可変部Ａｂは、５Ｆ９抗体分子またはＡｂｘ－２２９抗体分子である。

【０３３１】

いくつかの実施形態では、式（Ｉ－４）、（Ｉ－５）、（Ｉ－６）、または（Ｉ－７）における変数ｍは、約２～約１０、約６～約８、または約４～約６の範囲にある。

【０３３２】

ある特定の実施形態では、本発明は、式（Ｉ－４）、（Ｉ－５）、（Ｉ－６）、または（Ｉ－７）の免疫結合体に関しており、Ａｂは、５Ｆ９抗体分子であり、ｍは、約４である。

【０３３３】

本明細書において開示される免疫結合体は、所与の生物学的応を改変するために使用することができる。治療剤は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されないものとする。たとえば、治療剤は、核酸、タンパク質、または所望の生物学的活性を有するポリペプチドであってもよい。たとえば、抗体分子は、遺伝子の発現に干渉し得るアンチセンス分子、ｓｉＲＮＡ分子、ｓｈＲＮＡ分子、またはｍｉＲＮＡ分子と結合体化させることができ、それによって、所望の生物学的効果をもたらすことができる。

【０３３４】

本発明の抗体分子と結合体化させることができるタンパク質およびポリペプチドは、たとえば、アブリン、アブリンＡ鎖、リシン、リシンＡ鎖、モデシン、モデシンＡ鎖、アルファサルシン、エキソトキシンＡ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、ＰＥ３８（切断型シュードモナスエキソトキシン）、ゲロニン、ジフテリア毒素、ジフテリア毒素Ａ断片、ある種のＡｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ある種のＤｉａｎｔｈｕｓ　ｃａｒｙｏｐｈｙｌｌｕｓタンパク質（たとえばジアンチン３０およびジアンチン３２）、ある種のＰｈｙｔｏｌａｃｃａ　Ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（たとえばＰＡＰ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ある種のＳａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎｌｉｓタンパク質（たとえばサポリン６）、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａ

ｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、マイトジリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシンなどの毒素およびその構成要素；腫瘍壊死因子、インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、および組織プラスミノーゲン活性化因子などの腫瘍での免疫系に従事するかまたは腫瘍でのエフェクター機能を誘発するタンパク質；ならびにたとえばサイトカインおよびリンホカイン（たとえばインターロイキン１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージ（ｍａｃｒｏｐｈａｓｅ）コロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、および顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」））ならびに他の増殖因子、成長因子などの生物学的応答調節剤を含む。

【０３３５】

本発明の抗体はまた、ウイルス粒子上に存在するウイルス表面タンパク質と結合体化させるかまたは融合することができる。たとえば、本発明の単鎖抗ＧＣＣ抗体は、ウイルス表面タンパク質に融合することができる（たとえば融合タンパク質を形成するために）。あるいは、本発明の全抗ＧＣＣ抗体またはその断片は、ウイルス表面タンパク質と化学的に結合体化させることができる（たとえば化学的なリンカーを介して）。好ましくは、ウイルスは、ウイルスが抗ＧＣＣ抗体と共に内部移行され、それによって、ＧＣＣ発現細胞に感染するように、エンドサイトーシス膜と融合するもの、たとえばインフルエンザウイルスである。ウイルスは、細胞毒素として遺伝子操作され得る。たとえば、ウイルスは、細胞に対して毒性の遺伝子、たとえば細胞死を促進する遺伝子を発現させるまたはその発現を誘発することができる。好ましくは、そのようなウイルスは、ウイルス複製ができない。

【０３３６】

本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子はまた、プロドラッグまたはプロドラッグ活性化因子と結合体化させることができる。腫瘍細胞を死滅させるまたは抑制するための方法において、本発明の第１の抗ＧＣＣ抗体分子は、プロドラッグ活性化因子と極めて接近している場合にのみ活性化されるプロドラッグと結合体化させる。プロドラッグ活性化因子は、第２の抗体分子、好ましくはＧＣＣ分子上の非競合部位に結合するものと結合体化させる。２つの抗体が競合または非競合結合部位に結合するかどうかは、従来の競合結合アッセイによって決定されてもよい。本発明の実施における使用に適した薬剤‐プロドラッグ対は、Ｂｌａｋｅｌｙら、「ＺＤ２７６７，ａｎ Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｅｎｚｙｍｅ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｔｈａｔ Ｒｅｓｕｌｔｓ ｉｎ Ｔｕｍｏｒ Ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎｓ ｉｎ Ｃｏｌｏｒｅｃｔａｌ Ｔｕｍｏｒ Ｘｅｎｏｇｒａｆｔｓ」（１９９６年）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５６巻：３２８７～３２９２頁に記載されている。

【０３３７】

治療上活性な放射性同位体もまた、抗ＧＣＣ抗体、その抗原結合断片、または誘導体に結合することができる。放射性同位体は、診断上のまたは治療上の適用において使用することができる。抗ＧＣＣ抗体に結合することができる放射性同位体は、α－、β－、もしくはγ－放射体またはβ－およびγ－放射体を含むが、これらに限定されない。たとえばＳ．Ｅ．Ｏｒｄｅｒ、「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒ．Ｗ．Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３～３１６頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５年を参照されたい。そのような放射性同位体は、銅（^{64}Ｃｕ）、ヨウ素（^{131}Ｉもしくは^{125}Ｉ）、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、プラセオジム、アスタチン（^{211}Ａｔ）、レニウム（^{186}Ｒｅ）、ビスマス（^{212}Ｂｉもしくは^{213}Ｂｉ）、インジウム（^{111}Ｉｎ）、テクネチウム（^{99m}Ｔｃ）、リン（^{32}Ｐ）、ロジウム（^{188}Ｒｈ）、硫黄（^{35}Ｓ）、炭素（^{14}Ｃ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、クロム（^{51}Ｃｒ）

、塩素（^{36}Ｃｌ）、コバルト（^{57}ＣｏもしくはＣｏ）、鉄（^{59}Ｆｅ）、セレン（^{75}Ｓｅ）、またはガリウム（^{67}Ｇａ）を含むが、これらに限定されない。治療剤として有用な放射性同位体は、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、プラセオジム、アスタチン（^{211}Ａｔ）、レニウム（^{186}Ｒｅ）、ビスマス（^{212}ＢｉまたはＢｉ）、およびロジウム（^{188}Ｒｈ）を含む。たとえば診断において使用するのに、標識として有用な放射性同位体は、ヨウ素（^{131}ＩもしくはＩ）、インジウム（^{111}Ｉｎ）、テクネチウム（^{99m}Ｔｃ）、リン（^{32}Ｐ）、炭素（^{14}Ｃ）、およびトリチウム（^{3}Ｈ）または上記に列挙される１つ以上の治療用アイソトープを含む。

【０３３８】

^{131}Ｉ、^{90}Ｙ、および^{177}Ｌｕで標識される抗体を使用する放射免疫療法（ＲＩＴ）は、懸命な臨床試験下にある。これらの３つの核種の物理的特性において有意差があり、その結果として、放射性核種の選択は、腫瘍に最大の放射線量を送達するのに重要であり得る。^{90}Ｙのより高いベータエネルギー粒子は、大きな腫瘍に好適であるかもしれないが、それは、小さな腫瘍、特に骨転移に必要ではない場合がある。^{131}Ｉの比較的低いエネルギーのベータ粒子は、理想的であるが、放射性ヨウ素標識分子のｉｎ ｖｉｖｏ脱ハロゲン化は、抗体を内部移行するのに主要な不利益となる。対照的に、^{177}Ｌｕは、わずか０．２～０．３ｍｍの範囲での低エネルギーのベータ粒子を有し、^{90}Ｙと比較して、骨髄に、はるかに低い放射線量を送達する。さらに、より長い物理的半減期（^{90}Ｙと比較して）により、腫瘍滞留時間はより長い。その結果として、より高い活性（より高いｍＣｉ量）の^{177}Ｌｕ標識作用物質を、比較的より少ない放射線量で骨髄に投与することができる。いくつかの臨床研究が、様々な癌の処置において^{177}Ｌｕ標識抗体の使用を調査している（Ｍｕｌｌｉｇａｎ Ｔら Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１巻：１４４７～１４５４頁（１９９５年）；Ｍｅｒｅｄｉｔｈ ＲＦら Ｊ Ｎｕｃｌ Ｍｅｄ ３７巻：１４９１～１４９６頁（１９９６年）；Ａｌｖａｒｅｚ ＲＤら Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ６５巻：９４～１０１頁（１９９７年））。

【０３３９】

有用な検出可能な作用物質（この作用物質を用いて、本発明の抗体または抗体部分が誘導されてもよい（または標識されてもよい））は、蛍光化合物、様々な酵素、補欠分子族、発光物質、生物発光物質、蛍光放射金属原子、たとえばユーロピウム（Ｅｕ）、および他のランタノイド（ａｎｔｈａｎｉｄｅ）ならびに放射性物質（上に記載される）を含む。例示的な蛍光検出可能な作用物質は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、およびその他同種のものを含む。抗体はまた、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、およびその他同種のものなどの検出可能な酵素を用いて誘導されてもよい。抗体が検出可能な酵素を用いて誘導される場合、それは、検出可能な生成物を産生するために酵素が使用するさらなる試薬の追加によって検出される。たとえば、検出可能な作用物質西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、有色反応生成物をもたらし、この有色反応生成物は、検出可能である。抗体はまた、補欠分子族（たとえばストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチン）を用いて誘導されてもよい。たとえば、抗体は、ビオチンを用いて誘導され、アビジン結合またはストレプトアビジン結合の間接的な測定を通して検出されてもよい。適した蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンを含み、発光物質の例は、ルミノールを含み、生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含む。

【０３４０】

薬学的組成物

別の態様では、本発明は、組成物、例えば、薬学的に許容される組成物を特徴とし、こ

の組成物は薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体を含む。実施形態において、抗ＧＣＣ抗体分子は、表１および表２に要約されている例示的な特徴を持つ抗体分子である。

【０３４１】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、任意のかつ全ての生理的に適合性の溶媒、分散媒、等張化剤（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ａｇｅｎｔ）および吸収遅延剤などを包含する。担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、直腸投与、脊髄投与または上皮投与（例えば、注射または注入による）に適していてよい。薬学的組成物は、１種以上の追加的な賦形剤、例えば、塩、緩衝剤、張性調節剤、分散保護剤（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）、非イオン性界面活性剤、表面活性剤、および保存料を含んでよい。

【０３４２】

組成物は、種々の形態であってよい。これらとしては、例えば、液体状溶液（例えば、注射用溶液および注入用溶液）、分散物または懸濁物、リポソームおよび坐剤などの液体剤形、半固体剤形および固体剤形が挙げられる。好ましい形態は、意図される投与形式および治療への適用次第である。いくつかの典型的な組成物は、非経口投与（例えば、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与）することが意図された注射用溶液または注入用溶液の形態である。一部の実施形態では、抗体は、静脈内注入または静脈内注射によって投与される。他の実施形態では、抗体は、筋肉内注射または皮下注射によって投与される。

【０３４３】

句「非経口投与」および「非経口的に投与する」は、本明細書で使用される場合、経腸および局所投与以外の投与形式、通常、注射による投与形式を意味し、それらとしては、これらに限定することなく、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が挙げられる。

【０３４４】

一部の実施形態では、薬学的組成物は、製造および貯蔵の条件下で滅菌状態であり、かつ安定である。組成物は、溶液、マイクロエマルション、分散物、リポソーム、ミクロスフェア、または高い抗体濃度に適した他の規則構造として製剤化することができる。滅菌注射用溶液は、必要量の活性化合物（すなわち、抗体または抗体部分）を、上に列挙した成分の１つ、または成分の組み合わせと共に適切な溶媒に組み込み、必要に応じて、その後、例えば濾過によって滅菌することによって調製することができる。一般に、分散物は、活性化合物を、基本的な分散媒および上に列挙した中からの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製する。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、提供される調製方法は、予め滅菌濾過した活性成分と任意の追加的な所望の成分の溶液から、活性成分の粉末と任意の追加的な所望の成分をもたらす真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の妥当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散物の場合では必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射用組成物の持続的吸収は、組成物に、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによってもたらすことができる。

【０３４５】

本発明の抗体および抗原結合性断片は、当技術分野で公知の種々の方法によって投与することができるが、多くの治療に適用するための投与の経路／形式は、静脈内への注射または注入である。当業者には理解されるように、投与の経路および／または形式は、所望の結果に応じて変わる。ある実施形態では、活性化合物は、化合物を、急速に放出することから保護する担体、例えば、移植片、経皮パッチ剤、およびマイクロカプセル化した送達系を含めた制御放出製剤などと一緒に調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳

酸などの生分解性かつ生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤を調製するための多くの方法は、特許が与えられているか、または当業者に一般に公知である。例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ編、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９７８年を参照されたい。

【０３４６】

ある実施形態では、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体は、例えば、不活性な希釈剤または吸収できる食用担体と一緒に経口投与することができる。化合物（および、望ましい場合には他の成分）は、ハードシェルゼラチンカプセルまたはソフトシェルゼラチンカプセルに封入し、圧縮して錠剤、バッカル錠、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁物、シロップ剤、ウェーハなどにすることもできる。本発明の抗体または抗体断片を非経口投与以外で投与するために、化合物が不活性化することを予防する材料で化合物をコーティングする、または化合物をそれと共投与することが必要であり得る。

【０３４７】

治療用組成物は、当技術分野で公知の医学的なデバイスを用いて投与することができる。例えば、薬学的調製物を、１以上の用量を含有するデバイス、例えば気密容器または液密容器内に入れることができる。送達デバイスの例としては、限定することなく、バイアル、カニューレ、針、点滴袋、およびラインが挙げられる。本発明は、本明細書に記載の抗体分子または免疫結合体を、そのようなデバイスに配置する方法も提供する。

【０３４８】

一部の実施形態では、本発明は、リポソーム組成物中に配合される本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を提供する。一部の実施形態では、リポソームを抗体分子でコーティングする。いくつかのそのような実施形態では、リポソームを治療剤で満たす。リポソームによる送達により、抗体に連結されていない作用物質、例えば治療剤の送達を可能にすることができる。この手法は、隔離されるべき、または非標的細胞と接触することを最小限にするべきである抗体分子または作用物質、例えば治療剤への架橋を受ける可能性がない作用物質、例えば治療剤を送達するために使用することができる。特定の実施形態では、リポソームを細胞増殖抑制剤または細胞傷害性薬で満たす。いくつかの特定の実施形態では、治療剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、クリプトフィシン、タキサン、ＤＮＡアルキル化剤であるカリチアマイシン、および前述のものの誘導体からなる群から選択される。他の実施形態では、リポソームを、ＧＣＣ発現細胞において、ＧＣＣの発現または別の遺伝子、例えばがん遺伝子の発現を減らすことができるＲＮＡ干渉分子、例えば、アンチセンス分子、ｓｉＲＮＡ分子、ｈｓＲＮＡ分子またはｍｉＲＮＡ分子を含む核酸配列で満たす。いくつかの他の実施形態では、リポソームを、抗ＧＣＣ抗体分子および治療剤または標識を含む免疫結合体でコーティングするか、またはそれで満たす。

【０３４９】

投薬レジメンを調整して、最適な所望の応答（例えば、治療反応）をもたらす。例えば、単回のボーラスを投与すること、ある期間にわたっていくつかの分割用量を投与すること、または、治療状況の緊急性によって指示される通りに用量を比例的に低下または増加させることができる。非経口用組成物は、投与を容易にし、かつ投与量を均一にするために、単位剤形に製剤化することが特に有利である。用語「単位剤形」は、本明細書で使用される場合、処置される被験体に対する単位投与量として適した物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように算出された所定の量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤形の仕様は、（ａ）活性化合物の独特の特性および実現されるべき特定の治療効果、および（ｂ）個体における感受性を処置するためにそのような活性化合物を配合する技術分野に固有の限界によって規定され、それに直接左右される。

【０３５０】

例示的な、治療的または予防的に有効な量の本発明の抗体または抗原結合性断片についての非限定的範囲は、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ、または１～１０ｍｇ／ｋｇである。投与量の値は、緩和されるべき状態の種類および重症度に伴って変わってよいことに留意すべきである。任意の特定の被験体に対して、特定の投薬レジメンを個々の必要性、および組成物の投与を管理または監督する人の専門的な判断に従って、ある期間にわたって調整するべきであること、および本明細書に記載の投与量の範囲は単なる例示であり、特許請求された組成物の範囲または実施を制限するものではないことがさらに理解されるべきである。

【０３５１】

本発明の薬学的組成物は、「治療的に有効な」量の本発明の抗体または抗原結合性断片を含んでよい。「治療的に有効な」量は、所望の治療結果を実現するために、必要な投薬量かつ期間に、有効な量を指す。改変された抗体または抗体断片の治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、および体重、および抗体または抗体部分の、個体における所望の応答を引き出す能力などの因子に応じて変わり得る。治療有効量は、改変された抗体または抗体断片の任意の毒性の影響または有害な影響より治療的に有益な影響がまさる量でもある。「治療的に有効な投与量」により、処置された被験体における測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍の成長速度）が、無処置の被験体と比較して少なくとも約２０％、少なくとも約４０％、少なくとも約６０％、および一部の実施形態では少なくとも約８０％阻害されることが好ましい。化合物の、測定可能なパラメータ、例えば、がんを阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性について予測する動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの性質は、化合物の、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける阻害などの阻害する能力を、当業者に公知のアッセイによって検査することによって評価することができる。

【０３５２】

本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を含むキットも本発明の範囲内である。抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を含むリポソーム組成物を含むキットもさらに包含される。キットは、使用説明書；他の試薬、例えば、標識、治療剤、またはキレート化、またはそうでなければカップリングに有用な作用物質、標識または治療剤に対する抗体、または放射線防護組成物；投与用抗体を調製するためのデバイスまたは他の材料；薬学的に許容される担体；および被験体に投与するためのデバイスまたは他の材料を含めた１つ以上の他の要素を含んでよい。使用説明書は、抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体をｉｎ　ｖｉｔｒｏで、例えば、試料中、例えば、がんを有する患者からの生検材料もしくは細胞におけるＧＣＣを検出するため、または、ｉｎ　ｖｉｖｏでＧＣＣを検出するための診断に適用するための説明書を含んでよい。説明書は、例えば、がん（例えば胃腸起源のがん、例えば、結腸がん、胃がん、食道がんなど）の患者における推奨される投与量および／または投与形式を含めた、治療に適用するための手引きを含んでよい。他の説明書は、抗体をキレート化剤、標識または治療剤にカップリングすることについて、または、結合体化させた抗体を、例えば、未反応の結合体形成の構成成分から精製するための説明を含んでよい。上記の通り、キットは、標識、例えば本明細書に記載の任意の標識を含んでよい。上記の通り、キットは、治療剤、例えば本明細書に記載の治療剤を含んでよい。いくつかの適用では、抗体は、他の構成成分、例えば、キレート化剤または標識または治療剤、例えば、放射性同位元素、例えば、イットリウムまたはルテチウムと反応する。そのような場合では、キットは、反応を行うための反応容器、または最終生成物を出発材料または反応中間体から分離するために使用する分離デバイス、例えば、クロマトグラフィーカラムの１つ以上を含んでよい。

【０３５３】

キットは、必要に応じて１つ以上の別々の薬学的調製物中に配合される、診断用薬または治療剤、例えば、本明細書に記載の診断用薬または治療剤などの少なくとも１種の追加的な試薬、および／または、１種以上の追加的な抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体をさらに含んでよい。

【０３５４】
キットは、放射線防護剤をさらに含有してよい。同位元素、例えば、^{90}イットリウム（^{90}Ｙ）の、放射線によって分解される性質は公知である。この放射線分解を克服するために、放射線防護剤を、そのような放射線防護剤が良性である、つまりそれらが、例えば、^{90}Ｙなどの同位元素を抗体に標識する反応を阻害しない、またはそうでなければ、その反応に悪影響を及ぼさない限りは、例えば、反応緩衝剤に含めることができる。本発明の製剤緩衝液は、イットリウムまたは他の強力な放射性核種が原因の放射線分解を最小限にする、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）またはアスコルビン酸などの放射線防護剤を含んでよい。他の放射線防護剤、すなわち、ラジカルスカベンジャー（フェノール、亜硫酸塩、グルタチオン、システイン、ゲンチジン酸、ニコチン酸、パルミチン酸アスコルビル、ＨＯＰ（：Ｏ）Ｈ$_2$Ｉグリセロール、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、Ｎａ$_2$Ｓ$_2$Ｏ．、Ｎａ$_2$Ｓ$_2$Ｏ$_3$、およびＳＯ$_2$など）が当技術分野で公知であり、同様に、本発明の製剤緩衝剤に使用することができる。

【０３５５】
提供されるキットは、キレート化剤と結合体化させたタンパク質またはペプチドを、患者に投与するための治療用放射性同位元素で放射標識するのに有用なキットである。キットは、（ｉ）キレート化剤と結合体化させた抗体を含むバイアル、（ｉｉ）放射標識した抗体を安定化し、患者に投与するための製剤緩衝剤を含むバイアル、および（ｉｉｉ）放射標識の手順を実施するための説明書を含む。キットは、キレート化剤と結合体化させた抗体を放射性同位元素またはその塩に、十分な時間、穏やかな条件下で、例えば、説明書において推奨されている通りに曝露することを提供する。十分な純度であり、特異的活性および結合特異性を有する放射標識した抗体を作製する。放射標識した抗体は、例えば、製剤緩衝剤で適切な濃度に希釈することができ、さらなる精製を伴って、または伴わずに患者に直接投与することができる。キレート化剤と結合体化させた抗体は、凍結乾燥した形態で供給することができる。

【０３５６】
使用
本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおける診断上の有用性、予後判定上の有用性、画像診断上の有用性、治療上の有用性および予防における有用性を有する。例えば、これらの抗体分子は、種々の障害を処置する、予防する、かつ／または診断するために、培養中の細胞に、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｅｘ　ｖｉｖｏで投与することができるか、または被験体に、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏで投与することができる。

【０３５７】
使用することができる本明細書に記載の抗体分子、免疫結合体、および融合タンパク質により、ＧＣＣタンパク質の活性または機能、例えば、リガンド結合性（例えば、ＳＴまたはグアニリンの結合性）、ＧＣＣに媒介されるシグナル伝達、腸液の維持、電解質の恒常性、細胞内のカルシウムの放出（カルシウム流）、細胞分化、細胞増殖、または細胞活性化などを調節することができる。

【０３５８】
一態様では、本発明は、ＧＣＣ発現細胞を死滅させる、その成長を阻害もしくは調節する、またはその代謝に干渉する方法を特徴とする。一実施形態では、本発明は、ＧＣＣに媒介される細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を死滅させる方法を提供する。方法は、がん性細胞（例えば、胃腸系のがん、例えば、結腸、胃、または食道、または膵臓細胞のがん由来の細胞）、または転移性の病変などのＧＣＣを発現する任意の細胞または組織と一緒に使用することができる。ＧＣＣ発現細胞の非限定的な例としては、Ｔ８４ヒト結腸腺癌細胞、新鮮な結腸腫瘍細胞または凍結された結腸腫瘍細胞、およびＧＣＣまたはその部分をコードする組換え型の核酸を含む細胞が挙げられる。

【０３５９】
本発明の方法は、有効量、すなわち、ＧＣＣに媒介される細胞シグナル伝達を阻害する

のに十分な量または細胞を死滅させるのに十分な量の本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体と細胞を接触させるステップを含む。この方法は、培養中の細胞に対して、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｓｉｔｕで使用することができる。例えば、ＧＣＣを発現する細胞（例えば、腫瘍または転移性の病変の生検によって採取された細胞；樹立がん細胞系由来の細胞；または組換え細胞）をｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて培地中で培養することができ、培地に抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を加えることによって接触させるステップに影響を及ぼすことができる。細胞を死滅させる方法において、方法は、裸の抗ＧＣＣ抗体分子、または、抗ＧＣＣ抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を使用するステップを含む。この方法により、特にＧＣＣ発現腫瘍細胞（例えば、結腸腫瘍細胞）を含めた、ＧＣＣ発現細胞を死滅させる。

【０３６０】

表７を参照することは、さまざまな方法に使用するために（１種以上の）抗体を選択するための手引きとして役に立ち得る。例えば、表７は、どの抗体がＧＣＣに結合した後に内部移行することが確認されたかを示す。そのような抗体は、細胞傷害性成分または細胞を画像処理するための成分と連結させたときに有用だと思われる。内部移行しない抗体は、抗体依存性細胞により媒介される細胞傷害性反応を引き出すように設計された裸の抗体を使用する診断的な目的または治療方法、または、おそらくリポソーム送達法に使用することができる。

【０３６１】

本発明の抗ＧＣＣ抗体分子は、抗原発現細胞において、ＧＣＣの細胞外ドメインまたはその部分に結合する。結果として、がん性細胞を死滅させるため、抑制するため、または検出するために本発明の方法を実施した場合、抗体または抗原結合性断片は、固定された細胞、または細胞内の抗原性ドメインがその他の方法で細胞外の環境に曝露される細胞だけではなく、そのような細胞の全てに結合する。したがって、抗体または抗原結合性断片の結合は、これらの細胞が固定されているか固定されていないか、生存可能であるか壊死性であるかに関係なく、ＧＣＣ発現細胞が存在する領域に集中する。それに加えて、またはその代わりに、抗ＧＣＣ抗体分子は、抗原発現細胞に結合すると、ＧＣＣに結合し、内部移行する。

【０３６２】

方法は、被験体内に存在する細胞に対して、ｉｎ　ｖｉｖｏプロトコールの一部として実施することもできる。一実施形態では、被験体はヒト被験体である。あるいは、被験体は、本明細書に開示されている抗ＧＣＣ抗体分子と交差反応するＧＣＣ抗原を発現している哺乳動物であってよい。抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体は、ヒト被験体に治療目的で投与することができる。抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体は、抗体と交差反応するＧＣＣ様抗原を発現している非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタまたはマウス）にも、獣医科用に、またはヒト疾患の動物モデルとして投与することができる。動物モデルは、本発明の抗体の治療効果を評価する（例えば、投与量および投与の時間経過を試験する）のに有用であり得る。ｉｎ　ｖｉｖｏの実施形態では、接触させるステップは、被験体において実施し、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体を、細胞で発現されたＧＣＣの細胞外ドメインに抗体分子が結合すること、および細胞を処理することの両方を可能にするために有効な条件下で、被験体に投与することを含む。

【０３６３】

一実施形態では、本発明は、抗ＧＣＣ抗体分子、または抗ＧＣＣ抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を、そのような処置を必要とする患者に投与することによってがんを治療する方法を提供する。この方法は、ＧＣＣ抗原を発現する少なくともいくつかの細胞を含む任意のがん性障害を処置するために使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、その組織病理学的な種類または侵襲性の段階に関係なく、全種類のがん性成長または発がん性プロセス、転移性組織または悪性に形質転換した細胞、組織または器官を含むことが意図される。用語「がん」および「腫瘍」は、互換的に使用

することができる（例えば、治療方法と関連して使用する場合、「がんを処置すること」および「腫瘍を処置すること」は、同じ意味を有する）。

【０３６４】

実施形態において、治療は、被験体の腫瘍の成長を低下させる、もしくは阻害する、転移性の病変の数もしくはサイズを低下させる、腫瘍の負荷を低下させる、原発腫瘍の負荷を低下させる、侵襲性を低下させる、生存時間を延長する、または生活の質を維持もしくは改善するのに十分である。

【０３６５】

がん性障害の例としては、これらに限定されないが、固形腫瘍、軟組織腫瘍、および転移性の病変が挙げられる。固形腫瘍の例としては、結腸および膵臓に影響を及ぼす腫瘍などの、種々の器官系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺癌、および癌腫が挙げられる。腺癌としては、肺の非小細胞癌などの悪性腫瘍が挙げられる。上述のがんの転移性の病変も、本発明の方法および組成物を使用して処置または予防することができる。一部の実施形態では、処置されるがんは、胃腸系のがん（例えば、結腸直腸がん、食道がん、または胃がん）である。一部の実施形態では、膵がんである。

【０３６６】

一実施形態では、がんは、結腸直腸がん、例えば、結腸直腸腺がん、結腸直腸平滑筋肉腫、結腸直腸リンパ腫、結腸直腸黒色腫、または結腸直腸神経内分泌腫瘍である。特定の実施形態では、がんは、転移性結腸がんである。別の実施形態では、がんは胃がん（例えば、胃腺がん、胃リンパ腫、または胃肉腫）、またはそれらの転移である。別の実施形態では、がんは食道がん（例えば、食道扁平上皮細胞癌または食道腺癌）である。

【０３６７】

方法は、任意の病期または細分類の関連性のある障害を処置することにおいて有用であり得る。例えば、方法は、早期または後期の結腸がん、または、第０期、第Ｉ期、第ＩＩＡ期、第ＩＩＢ期、第ＩＩＩＡ期、第ＩＩＩＢ期、第ＩＩＩＣ期、および第ＩＶ期のいずれかの結腸がんを処置するために使用することができる。

【０３６８】

一部の実施形態では、がん（例えば、結腸直腸がん、食道がんまたは胃がん）を処置するための方法は、そのような処置を必要とする患者に、本明細書に記載の裸の抗ＧＣＣ抗体分子を投与するステップを含む。他の実施形態では、方法は、本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を投与するステップを含む。いくつかのそのような実施形態では、免疫結合体は、本明細書に記載の式（Ｉ）を特徴とする。ある実施形態では、免疫結合体は、本明細書に記載の式（Ｉ－１）、（Ｉ－２）、（Ｉ－３）、（Ｉ－４）、（Ｉ－５）、（Ｉ－６）、または（Ｉ－７）を特徴とする。特定の実施形態では、免疫結合体は、式（Ｉ）、（Ｉ－１）、（Ｉ－２）、（Ｉ－３）、（Ｉ－４）、（Ｉ－５）、（Ｉ－６）、または（Ｉ－７）を特徴とし、ここで可変部Ａｂは、表１～６に要約されている特徴を持つ抗体分子である。ある実施形態では、可変部Ａｂは、５Ｆ９抗体分子またはＡｂｘ－２２９抗体分子である。いくつかの特定の実施形態では、免疫結合体は、式（Ｉ－５）または（Ｉ－７）を特徴とし、ここで可変部Ａｂは５Ｆ９抗体分子である。

【０３６９】

抗体分子および免疫結合体を投与する方法は、上記されている。使用する分子の適切な投与量は、被験体の年齢および体重ならびに使用する特定の化合物に依存する。

【０３７０】

一部の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体は、処置サイクルで投与する。「処置サイクル」は、上記の通り抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を投与する処置期間と、その後の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体を投与しない休止期間とからなる。処置サイクルは、所望の効果を実現するために必要に応じて繰り返すことができる。

【０３７１】

本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体（例えば、裸の抗ＧＣＣ抗体分子または抗ＧＣＣ抗体分

子および治療剤を含む免疫結合体）は、他の療法と組み合わせて使用することができる。例えば、併用療法は、１種以上の追加的な治療剤、例えば、１種以上の抗がん剤、例えば、細胞傷害性薬または細胞増殖抑制剤、ホルモン治療、ワクチン、および／または他の免疫療法と共に製剤化し、かつ／または共投与する、本発明の組成物を含んでよい。他の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体は、外科手術、放射線照射、冷凍外科療法、および／または温熱療法を含めた他の治療的な処置モダリティと組み合わせて投与する。そのような併用療法は、投与される治療剤を低投与量で有利に利用し、したがって、種々の単独療法に伴う、可能性のある毒性または合併症を回避することができる。

【０３７２】

「組み合わせて」投与することは、本明細書で使用される場合、障害がある被験体の苦痛の過程の間、２つの（またはそれ以上の）異なる処置を被験体に送達すること、例えば、２つ以上の処置を、被験体が障害と診断された後、および障害が治癒する、または排除される前に送達することを意味する。一部の実施形態では、１種の処置の送達が、第２の送達が始まる際にまだ起こっている、したがって、重複している。このことは、時には、本明細書で「同時に起こる」または「同時発生的な送達」と言及される。他の実施形態では、１種の処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれかの事例の一部の実施形態では、処置は、組み合わせて投与したゆえに、より有効である。例えば、第２の処置は、より有効である、例えば、第１の処置なしに第２の処置を投与した場合に見られると思われるよりも少ない第２の処置で、相当する効果が見られるか、または第２の治療により症状が大きく低下する、または同様の状況が第１の治療で見られる。一部の実施形態では、送達は、症状、または障害に関連する他のパラメータの低下が、他の処置なしに１種の処置を送達すると観察されると思われる低下を超えるものである。２種の処置の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、または相加的を超えるものであってよい。送達は、送達された第１の処置の効果が、第２の処置が送達されるときに検出可能なものであってよい。

【０３７３】

一部の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体は、化学療法剤と組み合わせて使用する。ＤＮＡ損傷性化学療法剤の非限定的な例としては、トポイソメラーゼＩ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシンおよびそれらの類似体または代謝産物、およびドキソルビシン）；トポイソメラーゼＩＩ阻害剤（例えば、エトポシド、テニポシド、およびダウノルビシン）；アルキル化剤（例えば、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、チオテパ、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、デカルバジン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、およびシクロホスファミド）；ＤＮＡインターカレーター（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン）；ブレオマイシンなどのＤＮＡインターカレーターおよびラジカル発生剤；ならびにヌクレオシド模倣物（例えば、５－フルオロウラシル、カペシタビン（ｃａｐｅｃｉｔｉｂｉｎｅ）、ゲムシタビン、フルダラビン、シタラビン、メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、およびヒドロキシウレア）が挙げられる。

【０３７４】

細胞の複製を攪乱する化学療法剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、および関連する類似体；ビンクリスチン、ビンブラスチン、および関連する類似体；サリドマイド、レナリドマイド、および関連する類似体（例えば、ＣＣ－５０１３およびＣＣ－４０４７）；タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、メシル酸イマチニブおよびゲフィチニブ）；プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）；ＩκＢキナーゼの阻害剤を含めたＮＦ－κＢ阻害剤；がんにおいて過剰発現されているタンパク質に結合し、それによって細胞の複製を下方制御する抗体（例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、およびベバシズマブ）；ならびに、がんにおいて上方制御、過剰発現、または活性化され、それを阻害することによって細胞の複製が下方制御されることが公知である他のタンパク質または酵素の阻害剤が挙げられる。

【０３７５】
本発明の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体と組み合わせる（１つ以上の）治療剤または処置モダリティの選択は、処置される障害に依存する。（１つ以上の）追加的な作用物質または処置モダリティは、例えば、処置されている適応症に対する標準の認可された療法を含んでよい。例えば、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体を、結腸がんを処置するために使用する場合、それは、例えば、外科手術；放射線療法；５－フルオロウラシル（ｆｌｕｏｒｏｕｒｉｃｉｌ）（５－ＦＵ）、カペシタビン、ロイコボリン、イリノテカン、オキサリプラチン、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはそれらの組み合わせ（例えば、オキサリプラチン／カペシタビン（ＸＥＬＯＸ）、５－フルオロウラシル／ロイコボリン／オキサリプラチン（ＦＯＬＦＯＸ）、５－フルオロウラシル／ロイコボリン／イリノテカン（ＦＯＬＦＩＲＩ）、ＦＯＬＦＯＸ＋ベバシズマブ、またはＦＯＬＦＩＲＩ＋ベバシズマブ）と組み合わせて使用することができる。

【０３７６】
別の態様では、本発明は、医薬品の製造における本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子または免疫結合体の使用を特徴とする。一実施形態では、医薬品は、がん、例えば、胃腸がんを処置するためのものである。一部の実施形態では、医薬品は、表１～６に要約されている特徴を有する抗ＧＣＣ抗体分子を含む。一部の実施形態では、医薬品は、５Ｆ９抗体分子またはＡｂｘ－２２９抗体分子を含む。

【０３７７】
本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体および免疫結合体は、ＧＣＣの存在を検出するため、例えば、生物学的試料におけるＧＣＣの存在を検出するため、または被験体におけるＧＣＣの存在または分布を検出するために使用することができる。用語「検出すること」は、本明細書で使用される場合、定量的検出または定性的検出を包含する。ＧＣＣまたはＧＣＣタンパク質を検出することは、本明細書で使用される場合、インタクトなＧＣＣタンパク質を検出すること、または、抗ＧＣＣ抗体分子が結合するエピトープを含むＧＣＣタンパク質の一部分を検出することを意味する。

【０３７８】
したがって、別の態様では、本発明は、ＧＣＣタンパク質を検出する、例えば、ＧＣＣ発現細胞または組織、例えば、腫瘍細胞、またはＧＣＣ発現細胞を有する腫瘍を検出する方法を特徴とする。方法は、材料、例えば細胞または組織、例えばＧＣＣを発現する腫瘍の試料を、抗ＧＣＣ抗体分子、例えば本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子と、抗ＧＣＣ抗体分子とＧＣＣタンパク質との間の複合体の形成が可能になる条件下で接触させるステップと；抗体分子とＧＣＣタンパク質との間の複合体の形成を検出し、それによってＧＣＣタンパク質の存在を検出する、例えば、ＧＣＣ発現細胞または腫瘍を検出するステップとを含む。

【０３７９】
一実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、検出可能な標識を含む免疫結合体である。

【０３８０】
ある実施形態では、組織は、他の組織、例えばＢ細胞および／またはＢ細胞関連組織などの他の組織と比較して高いレベルでＧＣＣを発現する正常組織および／またはがん性の組織を含む。

【０３８１】
本明細書に記載の検出方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏのいずれにせよ、被験体を評価するために使用することができる。一実施形態では、方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏで実施し、例えば、患者を画像診断、病期分類、評価または診断するために使用することができる。ある実施形態では、障害は、がんまたは腫瘍、例えば、結腸がんなどの細胞増殖性障害である。

【０３８２】
したがって、別の態様では、本発明は、ＧＣＣタンパク質の存在を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ（例えば、被験体からの生物学的試料、例えば、腫瘍組織からの組織生検材料など）また

はｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば、被験体におけるｉｎ　ｖｉｖｏ画像診断によって）検出するための方法を提供する。方法は、（ｉ）試料を、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体と接触させるか、または被験体に、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体を投与するステップと；（ｉｉ）抗ＧＣＣ抗体分子とＧＣＣタンパク質との間の複合体の形成を検出するステップとを含む。複合体の形成により、ＧＣＣの存在またはレベルが示される。

【０３８３】

実施形態において、試料または被験体において検出された複合体のレベルを、参照値、例えば、ＧＣＣの複合体の形成またはレベルについての値と比較する。一実施形態では、参照値を超えるＧＣＣのレベルにより、ＧＣＣ媒介性障害が示される。

【０３８４】

一実施形態では、方法は、参照試料、例えば、対照試料（例えば、対照の生物学的試料、例えば血漿、組織、生検材料など）または対照の被験体を、抗ＧＣＣ抗体分子またはその免疫結合体と接触させるステップ、および試料または被験体において検出されたレベルとそこで検出された複合体のレベルを比較するステップを含む。

【０３８５】

ある実施形態では、試験細胞または試験組織は、ＧＣＣの発現の増加に関連する障害を有する疑いがある個体から得る。

【０３８６】

一実施形態では、被験体からの試料中、または被験体におけるＧＣＣのレベルを、参照レベル、例えば対照材料、例えば被験体の細胞と同じ組織起源の正常細胞または正常細胞に匹敵するレベルのＧＣＣを有する細胞のＧＣＣのレベルと比較する。方法は、例えば、検出されたＧＣＣのレベルに応じて、診断、予後判定、処置の効力の評価、または障害の病期分類をもたらすことを含んでよい。試料中、または被験体におけるＧＣＣのレベルが対照材料と比較して高いことにより、ＧＣＣの発現の増加に関連する障害の存在が示される。試料中、または被験体におけるＧＣＣのレベルが対照材料と比較して高いことにより、処置の効力の相対的な不足、予後比較的不良、または疾患が後期であることも示され得る。ＧＣＣのレベルは、将来の処置、例えば、多少攻撃的な処置の必要性、またはある処置レジメンから別の治療レジメンに切り換える必要性を評価または選択するためにも使用することができる。

【０３８７】

ＧＣＣのレベルは、患者を選択または評価するためにも使用することができる。例えば、実施形態において、表面に多量のＧＣＣを発現している腫瘍細胞を有する患者は、毒素と結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子を用いて処置するための良い候補だと考えられる。実施形態において、表面に少量のＧＣＣを発現している腫瘍細胞を有する患者は、これの良い候補にはならないと思われ、抗ＧＣＣ抗体分子を追加的な治療方法と組み合わせることの候補、または裸の抗体療法の候補であり得る。別の例では、毒素と結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子の投与量は、腫瘍細胞の表面で発現されているＧＣＣ分子の数を反映するように調整することができる。腫瘍細胞の表面に多数のＧＣＣ分子を有する患者は、少数のＧＣＣ分子を有する患者よりも低い投与量で治療することができる。ＧＣＣを発現している腫瘍細胞の存在をｉｎ　ｖｉｖｏで検出することにより、組織（この組織へ、主要なＧＣＣを発現している腫瘍が転移した）の同定を可能にすることができる。どの組織が転移を有するかの知見により、腫瘍の療法の標的化適用をもたらすことができる。

【０３８８】

上記の通り、本明細書に記載の抗体分子により、正常組織を対照とした新生物組織のＧＣＣタンパク質の存在を評価することができ、それにより、疾患の存在または重症度、疾患の進行および／または療法の効力を評価することができる。例えば、療法をモニターし、効力を評価することができる。一実施例では、炎症性疾患を有する被験体から得た第１の試料におけるＧＣＣタンパク質を検出および／または測定することができ、療法を開始することができる。後で、第２の試料を、被験体から得ることができ、試料中のＧＣＣタンパク質を検出および／または測定することができる。第２の試料において検出または測

定されたＧＣＣタンパク質の数量の減少により、治療効果が示され得る。

【０３８９】

本明細書に開示されている抗体を使用して評価、例えば診断することができる例示的な細胞増殖性障害としては、これらに限定されないが、結腸がん、胃がん、食道がんを含めた増殖性障害が挙げられる。

【０３９０】

ある実施形態では、例えば上記のものなどの方法は、抗ＧＣＣ抗体の、細胞の表面で、またはその表面にＧＣＣを発現する細胞から得た膜調製物において発現されているＧＣＣへの結合を検出するステップを含む。ある実施形態では、方法は、抗ＧＣＣ抗体がＧＣＣに結合することが許容される条件下で、細胞を抗ＧＣＣ抗体と接触させるステップと、細胞表面で抗ＧＣＣ抗体とＧＣＣとの間で複合体が形成されたかどうかを検出するステップとを含む。抗ＧＣＣ抗体の、細胞の表面で発現されたＧＣＣへの結合を検出するための例示的なアッセイは、「ＦＡＣＳ」アッセイである。

【０３９１】

本明細書に記載の方法のための例示的な試料は、炎症性滲出液、血液、血清、腸液、便試料、または生検材料などの組織または体液を含む。一実施例では、個体から試料（例えば、組織および／または体液）を得ることができ、適切な免疫学的方法を使用してＧＣＣタンパク質の発現を検出および／または測定することができる。ＧＣＣタンパク質の発現を検出または測定するための適切な免疫学的方法としては、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法、免疫組織学、フローサイトメトリーなどが挙げられる。

【０３９２】

本明細書に記載の方法、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ検出およびｉｎ　ｖｉｔｒｏ検出、例えば、診断方法、病期分類方法、または画像診断方法において使用する抗ＧＣＣ抗体分子は、結合した、または結合していない結合剤の検出を容易にするために、検出可能な物質を使用して直接的に、または間接的に標識することができる。適切な検出可能な物質としては、種々の生物学的に活性な酵素、リガンド、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、化学発光材料、生物発光材料、発色団材料、高電子密度材料、常磁性の（例えば、核磁気共鳴活性な）材料、および放射性材料が挙げられる。一部の実施形態では、抗ＧＣＣ抗体分子は、放射性イオン、例えば、インジウム（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素（^{131}Ｉまたは^{125}Ｉ）、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、ビスマス（^{212}Ｂｉまたは^{213}Ｂｉ）、硫黄（^{35}Ｓ）、炭素（^{14}Ｃ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、ロジウム（^{188}Ｒｈ）、テクネチウム（^{99m}Ｔｃ）、プラセオジム、またはリン（^{32}Ｐ）；または陽電子放出放射性核種、例えば、炭素１１（^{11}Ｃ）、カリウム４０（^{40}Ｋ）、窒素１３（^{13}Ｎ）、酸素１５（^{15}Ｏ）、フッ素１８（^{18}Ｆ）、およびヨウ素１２１（^{121}Ｉ）につながっている。

【０３９３】

例示的な標識としては、希土類キレートまたはフルオレセインなどのフルオロフォアおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、および２，３－ジヒドロフタラジンジオンが挙げられる。他の例示的な標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ（例えば、過酸化水素を使用して色素前駆体を酸化する酵素（例えば、ＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼなど）と共役した、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど）、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定な遊離基などが挙げられる。

【０３９４】

フルオロフォアおよび発色団で標識した抗体分子は、当技術分野で公知の標準成分から調製することができる。抗体および他のタンパク質は約３１０ｎｍまでの波長を有する光

を吸収するので、蛍光成分は、３１０ｎｍを上回る波長、好ましくは４００ｎｍを上回る波長において相当な吸収を有するように選択するべきである。種々の適切な蛍光化合物および発色団は、Ｓｔｒｙｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、１６２巻：５２６頁（１９６８年）およびＢｒａｎｄ、Ｌ．ら、Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、４１巻：８４３～８６８頁（１９７２年）に記載されている。抗体は、蛍光発色団のグループを用いて、米国特許第３，９４０，４７５号、同第４，２８９，７４７号、および同第４，３７６，１１０号に開示されているものなどの従来の手順によって標識することができる。

【０３９５】

いくつもの上記の望ましい特性を有する蛍光剤の１つのグループはキサンテン色素であり、それらとしては、３，６－ジヒドロキシ－９－フェニルキサントヒドロール（ｈｅｎｙｌｘａｎｔｈｈｙｄｒｏｌ）から誘導されるフルオレセイン、および３，６－ジアミノ－９－フェニルキサントヒドロールから誘導されるローダミンおよびレサミン、およびリッサミンローダミンＢが挙げられる。９－ｏ－カルボキシフェニルキサントヒドロールのローダミン誘導体およびフルオレセイン誘導体は、９－ｏ－カルボキシフェニル基を有する。アミノ基およびイソチオシアネート基などの反応性カップリング基を有するフルオレセイン化合物、例えばフルオレセインイソチオシアネートおよびフルオレスカミンなどが容易に入手可能である。蛍光化合物の別のグループは、α位またはβ位にアミノ基を有するナフチルアミンである。

【０３９６】

標識した抗体分子は、例えば、（ｉ）アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準の技法によって所定の抗原を単離すること；（ｉｉ）所定の抗原（例えば、細胞溶解物中または細胞の上清中の）を、タンパク質の存在量および発現パターンを評価するために検出すること；（ｉｉｉ）臨床的試験手順の一部として、例えば、所与の処置レジメンの効力を決定するために、組織におけるタンパク質レベルをモニターすることを含めた、いくつもの状況において、診断上および／または実験的に使用することができる。

【０３９７】

ある他の方法を使用して、抗ＧＣＣ抗体のＧＣＣへの結合を検出することができる。そのような方法としては、これらに限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素連結免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫測定法、プロテインＡ免疫測定法、および免疫組織化学検査（ＩＨＣ）などの、当技術分野で公知の抗原‐結合アッセイが挙げられる。

【０３９８】

抗ＧＣＣ抗体分子とＧＣＣとの間の複合体の形成は、ＧＣＣ抗原に結合した抗体（または抗体断片）または結合していない抗体分子のいずれかを測定または視覚化することによって検出することができる。従来の検出アッセイ、例えば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素連結免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫測定法、プロテインＡ免疫測定法、および免疫組織化学検査（ＩＨＣ）または放射免疫測定法（ＲＩＡ）を使用することができる。

【０３９９】

抗ＧＣＣ抗体分子を標識する代わりに、検出可能な物質で標識した標準物質および標識していない抗ＧＣＣ抗体分子を利用する競合免疫測定法によって試料中のＧＣＣの存在をアッセイすることができる。このアッセイでは、生物学的試料、標識した標準物質およびＧＣＣ結合剤を組み合わせ、標識していない抗体に結合した標識した標準物質の量を決定する。試料中のＧＣＣの量は、ＧＣＣ結合剤に結合した標識した標準物質の量に反比例する。

【０４００】

構成成分（ＧＣＣまたは抗体分子）のいずれをもさらに操作または標識化することなく、例えば、蛍光エネルギー転移（ＦＥＴ、例えば、Ｌａｋｏｗｉｃｚら、米国特許第５，

６３１，１６９号；Ｓｔａｖｒｉａｎｏｐｏｕｌｏｓら、米国特許第４，８６８，１０３号を参照されたい）の技法を利用することによって、抗ＧＣＣ抗体分子複合体の形成に対してＧＣＣを直接検出することも可能である。第１の「供与体」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光で励起されると、その放出蛍光エネルギーが第２の「受容体」分子上の蛍光標識に吸収され、それが今度は吸収されたエネルギーによって蛍光を発することができるように選択する。あるいは、「供与体」タンパク質分子は、単にトリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用することができる。標識は、異なる波長の光を放出するように選択し、したがって、「受容体」分子の標識は、「供与体」の標識と区別することができる。標識間のエネルギー転移の効率は分子を隔てている距離に関連するので、分子間の空間的な関連性を評価することができる。分子間で結合が起こる状況では、アッセイにおける「受容体」分子の標識の蛍光放出が最大になるはずである。ＦＥＴ結合事象は、当技術分野で周知の標準物質の蛍光定量的な検出手段（例えば、蛍光光度計を使用すること）によって好都合に測定することができる。

【０４０１】

別の例では、抗体分子の、ＧＣＣを認識する能力の決定は、アッセイの構成成分（ＧＣＣまたは抗体分子）のいずれをも標識化せずに、リアルタイム生体分子相互作用分析（ＢＩＡ）などの技術を利用することによって実現することができる（例えば、Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ、Ｓ．ａｎｄ Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ、Ｃ．、１９９１年、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３巻：２３３８～２３４５頁およびＳｚａｂｏら、１９９５年、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５巻：６９９～７０５頁を参照されたい）。本明細書で使用される場合、「ＢＩＡ」または「表面プラズモン共鳴」は、生体特異的な相互作用を、リアルタイムで、相互作用体のいずれをも標識化せずに試験するための技術である（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標））。結合表面における質量の変化（結合事象を示す）により、表面近くの光の屈折率が変化し（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学現象）、その結果、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用することができる検出可能なシグナルがもたらされる。

【０４０２】

さらに別の実施形態では、本発明は、ＧＣＣを発現している腫瘍組織の存在をｉｎ ｖｉｖｏで検出するための方法を提供する。方法は、（ｉ）被験体（例えば、がんを有する患者）に、検出可能な標識またはマーカーと結合体化させた抗ＧＣＣ抗体またはその抗原結合性断片、好ましくは、抗体またはその抗原結合性断片を投与するステップと；（ｉｉ）被験体を、ＧＣＣを発現している組織または細胞に対する前記検出可能な標識またはマーカーを検出するための手段に曝露させるステップとを含む。

【０４０３】

本発明による診断的な画像診断に有用な標識の例は、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{68}Ｇａ、^{123}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{32}Ｐ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、および^{188}Ｒｈなどの放射性標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性な標識、単一光子放出型コンピュータ断層撮影法（「ＳＰＥＣＴ」）検出器または陽電子放出断層撮影法（「ＰＥＴ」）スキャナーによって検出可能な陽電子放出同位元素、ルシフェリンなどの化学発光体、ならびにペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーである。短距離の放射線放射体、例えば、経直腸プローブなどの、短距離の検出プローブによって検出可能な同位元素なども使用することができる。抗体は、そのような試薬を用いて、 当技術分野で公知の技法を使用して標識することができる。抗体を放射標識することに関する技法については、例えば、ＷｅｎｓｅｌおよびＭｅａｒｅｓ（１９８３年）Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照されたい。Ｄ．Ｃｏｌｃｈｅｒら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１２１巻：８０２～８１６頁（１９８６年）も参照されたい。

【０４０４】

放射標識した抗体の場合では、患者に投与された抗体は、抗体が反応する腫瘍担持抗原に局在化し、それを、例えば、ガンマカメラを使用する放射性核種スキャンまたは放出断

層撮影法またはコンピュータ断層撮影法などの公知の技法を使用してｉｎ　ｖｉｖｏで検出または「画像化」する。例えば、Ａ．Ｒ．Ｂｒａｄｗｅｌｌら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ　ｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｉｍａｇｉｎｇ」、Ｍｏｎｏｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒ．Ｗ．Ｂａｌｄｗｉｎら、（編）、６５～８５頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　１９８５年）を参照されたい。あるいは、放射性標識が陽電子を放出する場合（例えば、^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{15}Ｏ、および^{13}Ｎ）、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙに設置されているＰｅｔ　ＶＩと称される陽電子放出横断断層撮影スキャナーを使用することができる。

【０４０５】

他の実施形態では、本発明は、被験体、例えば、ヒト被験体に、放射性同位元素と結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子を投与する場合に、種々の組織に曝露する用量、例えば、放射線量を決定するための方法を提供する。方法は、（ｉ）本明細書に記載の抗ＧＣＣ抗体分子、例えば、放射性同位元素で標識した抗ＧＣＣ抗体分子を被験体に投与するステップと；（ｉｉ）種々の組織、例えば、腫瘍、または血液に位置する放射性同位元素の量を、放射性同位元素の一部または全部が被験体の体から排除されるまで、さまざまな時点で測定するステップと；（ｉｉｉ）分析された各組織が受けた放射線の総線量を算出するステップとを含む。測定値は、指定した時点、例えば、放射標識した抗ＧＣＣ抗体分子を被験体に投与した（０日目）後、１日目、２日目、３日目、５日目、７日目、および１２日目に取得してよい。ある期間にわたって積分し、放射性同位元素特異的活性を掛けた所与の組織内に存在する放射性同位元素の濃度を使用して、所与の組織が受ける線量を算出することができる。１種の放射性同位元素、例えば、ガンマ放射体、例えば^{111}Ｉｎで標識した抗ＧＣＣ抗体分子を使用して生成した薬理学的な情報を使用して、同じ組織が、容易に測定することができない異なる放射性同位元素、例えば、ベータ放射体、例えば^{90}Ｙから受けると思われる予測線量を算出することができる。

【０４０６】

抗ＧＣＣ抗体の配列

抗ＧＣＣ抗体を、いくつかの方法によって、実施例に詳細に記載されている通り生成した。簡単に述べると、マウスモノクローナル抗体である３Ｇ１　８Ｆ１および１０Ｂ８を、通常マウスにおいて、従来の免疫技術によって生成した。ヒトモノクローナル抗体である１Ｄ２、５Ｆ９、５Ｈ３、６Ｈ８、８Ｃ２、および１０Ｃ１０を、完全ヒトＩｇＧ２抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用し、Ａｂｇｅｎｉｘ　ＸＥＮＯＭＯＵＳＥトランスジェニック技術を利用して生成し、ハイブリドーマ技術を使用して単離した。ヒトｍＡｂ　Ａｂｘ－０１２、ｍＡｂ　Ａｂｘ－０２０、ｍＡｂ　Ａｂｘ－１０６、ｍＡｂ　Ａｂｘ－１９８、ｍＡｂ　Ａｂｘ－２２１、ｍＡｂ　Ａｂｘ－２２９、ｍＡｂ　Ａｂｘ－３３８およびｍＡｂ　Ａｂｘ－３９３を、完全ヒトＩｇＧ２抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用して生成した。単一の抗体を、Ａｂｇｅｎｉｘ　ＳＬＡＭ技術を使用して単離した。これらを使用して、完全ヒトＩｇＧ１抗体を作製した。ＧＣＣに対する抗体の特異性を、ＥＬＩＳＡおよびフローサイトメトリー（ＦＣＭ）によって試験した。生成した抗体のサブセットを、さらなる特徴付けのために選択した。

【０４０７】

以下の表１に、いくつかの抗ＧＣＣ抗体について、抗体の名称、抗体を生成するために使用した免疫原、使用した動物、供給源、種およびアイソタイプ単離体が要約されている。

【０４０８】

【表１】

抗体	免疫原	動物	供給源	種	アイソタイプ
3G1	TOK107-hIg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
8F1	TOK107-hIg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
10B8	TOK107-hIg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
1D3	TOK107-hIg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
8E12	TOK107-hIg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
5F9	TOK107-hIg	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
1D2	TOK107-hIg	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
5H3	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
6H8	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
8C2	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
10C10	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
10D3	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
1C9	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse		ヒト	IgG2,k
229	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
012	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
221	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
020	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
338	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
106	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
198	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
393	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k

軽鎖可変領域および重鎖可変領域の配列を決定した。以下の表２は、いくつかの抗体の可変領域についての配列番号の概要である。マウス抗ＧＣＣ抗体およびヒト抗ＧＣＣ抗体についての重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域のアミノ酸配列および核酸配列が、それぞれ表３および表４に示されている。

【０４０９】

抗ＧＣＣ抗体についての重鎖および軽鎖のＣＤＲのそれぞれのアミノ酸配列および核酸配列が、それぞれ表５および表６に示されている。

【０４１０】

例えば、表３の９行目は、ｍＡｂ　５Ｆ９の成熟重鎖可変領域の、コードされているアミノ酸配列（配列番号１８）の例示であり；ｍＡｂ　５Ｆ９の成熟重鎖可変領域をコード

する核酸配列（配列番号１７）が、表４の９行目に示されている。ｍＡｂ　５Ｆ９重鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ）１（配列番号１０６）、ＣＤＲ２（配列番号１０８）およびＣＤＲ３（配列番号１１０）の、コードされているアミノ酸配列が、それぞれ表５の２５～２７行目に示されており；ｍＡｂ　５Ｆ９重鎖ＣＤＲ１（配列番号１０５）、ＣＤＲ２（配列番号１０７）およびＣＤＲ３（配列番号１０９）の核酸配列が、それぞれ表６の２５～２７行に示されている。

【０４１１】

表３の１０行目は、ｍＡｂ　５Ｆ９の成熟軽鎖可変領域のコードされているアミノ酸配列（配列番号２０）の例示であり；ｍＡｂ　５Ｆ９の成熟カッパ軽鎖可変領域をコードする核酸配列（配列番号１９）が、表４の１０行目に示されている。ｍＡｂ　５Ｆ９軽鎖ＣＤＲ（ＣＤＲ）１（配列番号１１２）、ＣＤＲ２（配列番号１１４）およびＣＤＲ３（配列番号１１６）の、コードされているアミノ酸配列が、それぞれ表５の２８～３０行目に示されており；ｍＡｂ　５Ｆ９軽鎖ＣＤＲ１（配列番号１１１）、ＣＤＲ２（配列番号１１３）およびＣＤＲ３（配列番号１１５）の核酸配列が、それぞれ表６の２８～３０行目に示されている。

【０４１２】

ＣＤＲを配列決定することにより、毒素結合体形成部位としての役割を果たし得る残基の存在量を決定することが可能になった。抗原結合領域の不対の遊離のシステインは、アウリスタチンとの結合体化のための部位であり得、リジンはメイタンシンが結合体形成するための部位であり得る。ＣＤＲのアミノ酸に毒素を結合体化させることにより、抗体のＧＣＣに対する結合親和性を変化させる懸念が生じる。したがって、実施形態において、ＣＤＲは治療剤と結合体化させ得るアミノ酸を欠く。

【０４１３】

表２．モノクローナル抗体の可変領域の配列番号の概要

【０４１４】

【表２－１】

モノクローナル抗体	IgG 鎖	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
3G1	重鎖	1	2
	軽鎖	3	4
8E12	重鎖	5	6
	軽鎖	7	8
8F1	重鎖	9	10
	軽鎖	11	12
1D3	重鎖	13	14
	軽鎖	15	16
5F9	重鎖	17	18
	軽鎖	19	20
5H3	重鎖	21	22
	軽鎖	23	24
6H8	重鎖	25	26
	軽鎖	27	28
8C2	重鎖	29	30
	軽鎖	31	32
10C10	重鎖	33	34
	軽鎖	35	36
10D3	重鎖	286	287
	軽鎖	288	289
Abx-012	重鎖	238	239

【０４１５】

【表２－２】

	軽鎖	240	241
Abx-020	重鎖	37	38
	軽鎖	39	40
Abx-106	重鎖	242	243
	軽鎖	244	245
Abx-198	重鎖	41	42
	軽鎖	43	44
Abx-221	重鎖	246	247
	軽鎖	248	249
Abx-229	重鎖	45	46
	軽鎖	47	48
Abx-338	重鎖	49	50
	軽鎖	51	52
Abx-393	重鎖	53	54
	軽鎖	55	56

表３．モノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列

【０４１６】

【表３－１】

	モノクローナル抗体	IgG鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	3G1	重鎖	2	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSRNAISWVRQP PGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKENSKSQVF LKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGFDYWGQGTLVTVSA
2	3G1	軽鎖	4	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQK SGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTITSME AEDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKLEIK
3	8E12	重鎖	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPGQGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGTLVTVS
4	8E12	軽鎖	8	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGTKLEIK
5	8F1	重鎖	10	QVQLQQPGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYWMYWV KQRPGQGLEWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWGQGTLVTVS
6	8F1	軽鎖	12	DVVLTQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWL LQRPGQSPKRLIYLVSQLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYCVQGTHLFTFGSGTKLEIK
7	1D3	重鎖	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWV KQRPGQGLEWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGTLVTVSA

【０４１７】

【表３－２】

8	**1D3**	**軽鎖**	16	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGTKLEIK
9	**5F9**	**重鎖**	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLV TVSS
10	**5F9**	**軽鎖**	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIK
11	**5H3**	**重鎖**	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIR QSPGKGLEWVSYITTSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFYGMDVWGQGT TVTVSS
12	**5H3**	**軽鎖**	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHNDGKTYLY WYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSSSGSXTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK
13	**6H8**	**重鎖**	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAAIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTL VTVSS
14	**6H8**	**軽鎖**	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
15	**8C2**	**重鎖**	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVGAIWYDGSNKYYAASVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGTLV TVSS

【０４１８】

【表３－３】

16	**8C2**	**軽鎖**	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
17	**10C10**	**重鎖**	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAAIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTL VTVSS
18	**10C10**	**軽鎖**	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTYLS WLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
35	**10D3**	**重鎖**	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSR VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYG NFDHWGQGTLVTVSS
36	**10D3**	**軽鎖**	289	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYERSFTFGPGTKVD
19	**Abx-012**	**重鎖**	239	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGTLVTVSS
20	**Abx-012**	**軽鎖**	241	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
21	**Abx-020**	**重鎖**	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWISYITSSGSTIYYSASVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFSGWFGVHFDYWGQGT LVTVSS

【０４１９】

【表３－４】

22	**Abx-020**	**軽鎖**	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPNRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGQGTKVEIK
23	**Abx-106**	**重鎖**	243	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGTLVTVSS
24	**Abx-106**	**軽鎖**	245	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPMCSFGQGTKLEIK
25	**Abx-198**	**重鎖**	42	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLV TVSS
26	**Abx-198**	**軽鎖**	44	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRARQRVDSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
27	**Abx-221**	**重鎖**	247	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGT LVTVSS
28	**Abx-221**	**軽鎖**	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDVAVYYCQQYNNWMCSFGQGTKLEIK
29	**Abx-229**	**重鎖**	46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGT LVTVSS
30	**Abx-229**	**軽鎖**	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYCHQYSNWMCSFGQGTKLEIK

【０４２０】

【表３－５】

31	**Abx-338**	**重鎖**	50	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRTTFNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCARDRYYGYLDYWGQGTLVTVSS
32	**Abx-338**	**軽鎖**	52	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPSTFGQGTRLEIK
33	**Abx-393**	**重鎖**	54	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRHYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNLSLKSRVTISRDTSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGTLVTVSS
34	**Abx-393**	**軽鎖**	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DSATYYCLQHNSFPPTFGQGTKVEIK

表４．モノクローナル抗体可変領域の核酸配列

【０４２１】

【表４－１】

	モノクローナル抗体	IgG鎖	配列番号	核酸配列
1	3G1	重鎖	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTC TCTGGGTTCTCATTAAGCAGAAATGCTATAAGCTGG GTTCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTT GGAGTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAG AACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT CTACAAACTGAAGACACAGCCAGGTACTTCTGTGCC AGAAGTGGTTACGACGGGTTTGATTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
2	3G1	軽鎖	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAAATTACATGCACTGGTACCAGC AGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATG ACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC AATCACCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA TTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

【０４２２】

【表４－２】

3	**8E12**	**重鎖**	5	CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG GAAAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTACA ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCA GACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTG CAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG TCACTGTCTCT
4	**8E12**	**軽鎖**	7	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAG
5	**8F1**	**重鎖**	9	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGGCT TCTGGCTATATTTTCACCGGCTACTGGATGTACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTG GAAGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACTACA ATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAG ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTAC CCATGCCCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCT

【０４２３】

【表４－３】

6	**8F1**	**軽鎖**	11	GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGA TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTA TTTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCC AAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTCAACTGGACTCT GGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGA ACAGATTTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATTTGGGAGTGTATTACTGCGTGCAAGGTACA CATTTATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAA ATAAAA
7	**1D3**	**重鎖**	13	CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGAAAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTAC AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGT GCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTG GTCACTGTCTCTGCA
8	**1D3**	**軽鎖**	15	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAA

【０４２４】

【表４－４】

9	**5F9**	**重鎖**	17	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT TTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG GGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAAC CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCG AGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
10	**5F9**	**軽鎖**	19	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTAT CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACT CTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGG ACGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAA
11	**5H3**	**重鎖**	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACCTTCAGTGACTGCTACATGAGCTGG ATCCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTT TCATACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACTACG CAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGG ACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGAGAGACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTCT GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

【０４２５】

【表４－５】

12	**5H3**	**軽鎖**	23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGT CTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAGACCT ATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTC CACAACTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTC TGGAGTGCCAGATAGGTTCAGTAGCAGCGGGTCNNG GACAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAGCTTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
13	**6H8**	**重鎖**	25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
14	**6H8**	**軽鎖**	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAA

【０４２６】

【表４－６】

15	**8C2**	**重鎖**	29	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggTCCCT GAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAGT AGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGAT GGAAGTAATAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTATTTTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGC TCGTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
16	**8C2**	**軽鎖**	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAA
17	**10C10**	**重鎖**	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

【０４２７】

【表４－７】

18	**10C10**	**軽鎖**	35	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC ACAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAA
35	**10D3**	**重鎖**	286	CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTA CTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAG TCGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGC TGAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAA CGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA

【０４２８】

【表４－８】

36	**10D3**	**軽鎖**	288	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTTCTGTCAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGAT
19	**Abx-012**	**重鎖**	238	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTATCTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

【０４２９】

【表４－９】

20	**Abx-012**	**軽鎖**	240	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA AC
21	**Abx-020**	**重鎖**	37	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACTCAGCCTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG

【０４３０】

【表４－１０】

22	**Abx-020**	**軽鎖**	39	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAAGTC TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTA TTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCC ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCT GGAGTGCCAAATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGG GACAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAACTTACGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
23	**Abx-106**	**重鎖**	242	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTAT CTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTT GACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC

【０４３１】

【表４－１１】

24	**Abx-106**	**軽鎖**	244	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTACATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAACG
25	**Abx-198**	**重鎖**	41	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTCTCAGATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCACAGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAAACGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

【０４３２】

【表４－１２】

26	**Abx-198**	**軽鎖**	43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
27	**Abx-221**	**重鎖**	246	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC

【０４３３】

【表４－１３】

28	**Abx-221**	**軽鎖**	248	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGTGCATCCACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT GAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA ACG
29	**Abx-229**	**重鎖**	45	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

【０４３４】

【表４－１４】

30	**Abx-229**	**軽鎖**	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAACTTAGCCTGGTAC CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCACCAGTATAGTAACTGGATGTGCA GTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
31	**Abx-338**	**重鎖**	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACC CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACA CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGA GAGATAGATATTATGGCTACCTTGACTACTGGGGCC AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
32	**Abx-338**	**軽鎖**	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACTTAGCCTGGT ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGTTCACCGA GCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

【０４３５】

【表４－１５】

33	**Abx-393**	**重鎖**	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACC TCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACA CGTCCAAGAATCAGGTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG TATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
34	**Abx-393**	**軽鎖**	55	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTG CATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATC AGCTGAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCT ATTCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTC TCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAA CTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

表５：ＣＤＲのアミノ酸配列

【０４３６】

【表５－１】

	モノクローナル 抗体	IgG 鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFDY
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH
5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLAS
6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN

【０４３７】

【表５－２】

11	**8E12**	**VL CDR2**	78	QVSKLDP
12	**8E12**	**VL CDR3**	80	LQGTYYPYT
13	**8F1**	**VH CDR1**	82	GYWMY
14	**8F1**	**VH CDR2**	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	**8F1**	**VH CDR3**	86	ALAY
16	**8F1**	**VL CDR1**	88	KSSQSLLYSNGKTYLS
17	**8F1**	**VL CDR2**	90	LVSQLDS
18	**8F1**	**VL CDR3**	92	VQGTHLFT
19	**1D3**	**VH CDR1**	94	DYYIN
20	**1D3**	**VH CDR2**	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	**1D3**	**VH CDR3**	98	WDAY
22	**1D3**	**VL CDR1**	100	KSSQSLLYSNGKTYL

【０４３８】

【表５－３】

23	**1D3**	**VL CDR2**	102	QVSKLDP
24	**1D3**	**VL CDR3**	104	LQGTYYPYT
25	**5F9**	**VH CDR1**	106	GYYWS
26	**5F9**	**VH CDR2**	108	EINHRGNTNDNPSLKS
27	**5F9**	**VH CDR3**	110	ERGYTYGNFDH
28	**5F9**	**VL CDR1**	112	RASQSVSRNLA
29	**5F9**	**VL CDR2**	114	GASTRAT
30	**5F9**	**VL CDR3**	116	QQYKTWPRT
31	**5H3**	**VH CDR1**	118	DCYMS
32	**5H3**	**VH CDR2**	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	**5H3**	**VH CDR3**	122	DWGWFYGMDV
34	**5H3**	**VL CDR1**	124	KSSQSLLHNDGKTYLY

【０４３９】

【表５－４】

35	**5H3**	**VL CDR2**	126	EVSNRFS
36	**5H3**	**VL CDR3**	128	MQSIQLPRT
37	**6H8**	**VH CDR1**	130	SYGMH
38	**6H8**	**VH CDR2**	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	**6H8**	**VH CDR3**	134	GRSSSYFDY
40	**6H8**	**VL CDR1**	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	**6H8**	**VL CDR2**	138	KTSNRFS
42	**6H8**	**VL CDR3**	140	MQATQFPT
43	**8C2**	**VH CDR1**	142	SYGMH
44	**8C2**	**VH CDR2**	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	**8C2**	**VH CDR3**	146	GRSSSYFDY
46	**8C2**	**VL CDR1**	148	RSSQSLVHSDGNTYLS

【０４４０】

【表５－５】

47	**8C2**	**VL CDR2**	150	KTSNRFS
48	**8C2**	**VL CDR3**	152	MQATQFPT
49	**10C10**	**VH CDR1**	154	SYGMH
50	**10C10**	**VH CDR2**	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	**10C10**	**VH CDR3**	158	GRSSSYFDY
52	**10C10**	**VL CDR1**	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	**10C10**	**VL CDR2**	162	KISNRFS
54	**10C10**	**VL CDR3**	164	MQATQFPT
103	**10D3**	**VH CDR1**	291	GYYWS
104	**10D3**	**VH CDR2**	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	**10D3**	**VH CDR3**	295	ERGYTYGNFDH
106	**10D3**	**VL CDR1**	297	RASQSVSSRYLA

【０４４１】

【表５－６】

107	**10D3**	**VL CDR2**	299	GASSRAT
108	**10D3**	**VL CDR3**	301	QQYERSFT
55	**Abx-012**	**VH CDR1**	251	HYYWS
56	**Abx-012**	**VH CDR2**	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	**Abx-012**	**VH CDR3**	255	DRLTGYFDY
58	**Abx-012**	**VL CDR1**	257	RASQSVSSSYLA
59	**Abx-012**	**VL CDR2**	259	GASSRAA
60	**Abx-012**	**VL CDR3**	261	QQYGSSLT
61	**Abx-020**	**VH CDR1**	166	DYYMS
62	**Abx-020**	**VH CDR2**	168	YITSSGSTIYYSASVKG
63	**Abx-020**	**VH CDR3**	170	DFSGWFGVHFDY
64	**Abx-020**	**VL CDR1**	172	KSSQSLLHSDGKTYLY

【０４４２】

【表５－７】

65	**Abx-020**	**VL CDR2**	174	EVSNRFS
66	**Abx-020**	**VL CDR3**	176	MQSIQLTWT
67	**Abx-0106**	**VH CDR1**	263	HYYWS
68	**Abx-106**	**VH CDR2**	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	**Abx-106**	**VH CDR3**	267	DRLTGYFDY
70	**Abx-106**	**VL CDR1**	269	RASQSVSSSYLA
71	**Abx-106**	**VL CDR2**	271	GTSSRAT
72	**Abx-106**	**VL CDR3**	273	QQYGSSPMCS
73	**Abx-198**	**VH CDR1**	178	SYAMS
74	**Abx-198**	**VH CDR2**	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	**Abx-198**	**VH CDR3**	182	RRWQGYFDL
76	**Abx-198**	**VL CDR1**	184	RARQRVDSRYLA

【０４４３】

【表５－８】

77	**Abx-198**	**VL CDR2**	186	GASSRAT
78	**Abx-198**	**VL CDR3**	188	QQYGSSPLT
79	**Abx-221**	**VH CDR1**	275	RYAMN
80	**Abx-221**	**VH CDR2**	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	**Abx-221**	**VH CDR3**	279	DRDFWSGPFDY
82	**Abx-221**	**VL CDR1**	281	RASQSVSRSLA
83	**Abx-221**	**VL CDR2**	283	GASTRAT
84	**Abx-221**	**VL CDR3**	285	QQYNNWMCS
85	**Abx-229**	**VH CDR1**	190	RYAMN
86	**Abx-229**	**VH CDR2**	192	GISGSGGRTYYADSVKG
87	**Abx-229**	**VH CDR3**	194	DRDFWSGPFDY
88	**Abx-229**	**VL CDR1**	196	RASQSVSRNLA

【０４４４】

【表５－９】

89	**Abx-229**	**VL CDR2**	198	GASTRAT
90	**Abx-229**	**VL CDR3**	200	HQYSNWMCS
91	**Abx-338**	**VH CDR1**	202	SYYWS
92	**Abx-338**	**VH CDR2**	204	RIYISGRTTFNPSLKS
93	**Abx-338**	**VH CDR3**	206	DRYYGYLDY
94	**Abx-338**	**VL CDR1**	208	RASQSVSRSYLA
95	**Abx-338**	**VL CDR2**	210	DASSRAT
96	**Abx-338**	**VL CDR3**	212	QQYGSSPST
97	**Abx-393**	**VH CDR1**	214	HYYWS
98	**Abx-393**	**VH CDR2**	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	**Abx-393**	**VH CDR3**	218	GMGFDY
100	**Abx-393**	**VL CDR1**	220	RASQAIRNDLG

【０４４５】

【表５－１０】

101	**Abx-393**	**VL CDR2**	222	SASSLQS
102	**Abx-393**	**VL CDR3**	224	LQHNSFPPT
109	**コンセンサス**	**VH CDR1**	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	**コンセンサス**	**VH CDR2**	303	x-I-x-x-SG-[xまたはなし]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	**コンセンサス**	**VH CDR3**	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	**コンセンサス**	**VL CDR1**	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	**コンセンサス**	**VL CDR2**	306	x-x-S-x-R-x-x
114	**コンセンサス**	**VL CDR3**	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

表６．ＣＤＲの核酸配列

【０４４６】

【表６－１】

	モノクローナル抗体	**IgG鎖**	**配列番号**	**核酸配列**
1	**3G1**	**VH CDR1**	57	AGAAATGCTATAAGC

【０４４７】

【表６－２】

2	**3G1**	**VH CDR2**	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCAAATCC
3	**3G1**	**VH CDR3**	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC
4	**3G1**	**VL CDR1**	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAATTACATGCAC
5	**3G1**	**VL CDR2**	65	GACACATCCAAACTGGCTTCT
6	**3G1**	**VL CDR3**	67	CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG
7	**8E12**	**VH CDR1**	69	GACTACTATATAAAC
8	**8E12**	**VH CDR2**	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
9	**8E12**	**VH CDR3**	73	TGGGATGCTTAC
10	**8E12**	**VL CDR1**	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
11	**8E12**	**VL CDR2**	77	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
12	**8E12**	**VL CDR3**	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
13	**8F1**	**VH CDR1**	81	GGCTACTGGATGTAC

【０４４８】

【表６－３】

14	**8F1**	**VH CDR2**	83	AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACT ACAATCAAAAGTTCAAGGGC
15	**8F1**	**VH CDR3**	85	GCCCTTGCTTAC
16	**8F1**	**VL CDR1**	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAAACCTATTTGAGT
17	**8F1**	**VL CDR2**	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	**8F1**	**VL CDR3**	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG
19	**1D3**	**VH CDR1**	93	GACTACTATATAAAC
20	**1D3**	**VH CDR2**	95	AAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
21	**1D3**	**VH CDR3**	97	TGGGATGCTTAC
22	**1D3**	**VL CDR1**	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
23	**1D3**	**VL CDR2**	101	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
24	**1D3**	**VL CDR3**	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
25	**5F9**	**VH CDR1**	105	GGTTACTACTGGAGC

【０４４９】

【表６－４】

26	**5F9**	**VH CDR2**	107	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
27	**5F9**	**VH CDR3**	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
28	**5F9**	**VL CDR1**	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTA GCC
29	**5F9**	**VL CDR2**	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	**5F9**	**VL CDR3**	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG
31	**5H3**	**VH CDR1**	117	GACTGCTACATGAGC
32	**5H3**	**VH CDR2**	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACT ACGCAGACTCTGTGAAGGGC
33	**5H3**	**VH CDR3**	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC
34	**5H3**	**VL CDR1**	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTTG
35	**5H3**	**VL CDR2**	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	**5H3**	**VL CDR3**	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37	**6H8**	**VH CDR1**	129	AGCTATGGCATGCAC

【０４５０】

【表６－５】

38	**6H8**	**VH CDR2**	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
39	**6H8**	**VH CDR3**	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
40	**6H8**	**VL CDR1**	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
41	**6H8**	**VL CDR2**	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	**6H8**	**VL CDR3**	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC
43	**8C2**	**VH CDR1**	141	AGCTATGGCATGCAC
44	**8C2**	**VH CDR2**	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGCCTCCGTGAAGGGC
45	**8C2**	**VH CDR3**	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC
46	**8C2**	**VL CDR1**	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
47	**8C2**	**VL CDR2**	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	**8C2**	**VL CDR3**	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA
49	**10C10**	**VH CDR1**	153	AGCTATGGCATGCAC

【０４５１】

【表６－６】

50	**10C10**	**VH CDR2**	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
51	**10C10**	**VH CDR3**	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
52	**10C10**	**VL CDR1**	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGTACTTGAGT
53	**10C10**	**VL CDR2**	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT
54	**10C10**	**VL CDR3**	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC
103	**10D3**	**VH CDR1**	290	GGTTACTACTGGAGC
104	**10D3**	**VH CDR2**	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
105	**10D3**	**VH CDR3**	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
106	**10D3**	**VL CDR1**	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT
107	**10D3**	**VL CDR2**	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
108	**10D3**	**VL CDR3**	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT
55	**Abx-012**	**VH CDR1**	250	CATTACTACTGGAGC
56	**Abx-012**	**VH CDR2**	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT

【０４５２】

【表６－７】

57	**Abx-012**	**VH CDR3**	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
58	**Abx-012**	**VL CDR1**	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCC
59	**Abx-012**	**VL CDR2**	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	**Abx-012**	**VL CDR3**	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	**Abx-020**	**VH CDR1**	165	GACTACTACATGAGC
62	**Abx-020**	**VH CDR2**	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACTCAGCCTCTGTGAAGGGC
63	**Abx-020**	**VH CDR3**	169	GATTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTGACTAC
64	**Abx-020**	**VL CDR1**	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTATTTGTAT
65	**Abx-020**	**VL CDR2**	173	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
66	**Abx-020**	**VL CDR3**	175	ATGCAAAGTATACAACTTACGTGGACG
67	**Abx-106**	**VH CDR1**	262	CATTACTACTGGAGC
68	**Abx-106**	**VH CDR2**	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGT

【０４５３】

【表６－８】

69	**Abx-106**	**VH CDR3**	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
70	**Abx-106**	**VL CDR1**	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
71	**Abx-106**	**VL CDR2**	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	**Abx-106**	**VL CDR3**	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGT
73	**Abx-198**	**VH CDR1**	177	AGCTATGCCATGAGC
74	**Abx-198**	**VH CDR2**	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
75	**Abx-198**	**VH CDR3**	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC
76	**Abx-198**	**VL CDR1**	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTAC TTAGCC
77	**Abx-198**	**VL CDR2**	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	**Abx-198**	**VL CDR3**	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
79	**Abx-221**	**VH CDR1**	274	CGCTATGCCATGAAC
80	**Abx-221**	**VH CDR2**	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC

【０４５４】

【表６－９】

81	**Abx-221**	**VH CDR3**	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
82	**Abx-221**	**VL CDR1**	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTA GCC
83	**Abx-221**	**VL CDR2**	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
84	**Abx-221**	**VL CDR3**	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT
85	**Abx-229**	**VH CDR1**	189	CGCTATGCCATGAAC
86	**Abx-229**	**VH CDR2**	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
87	**Abx-229**	**VH CDR3**	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
88	**Abx-229**	**VL CDR1**	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAACTTA GCC
89	**Abx-229**	**VL CDR2**	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	**Abx-229**	**VL CDR3**	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT
91	**Abx-338**	**VH CDR1**	201	AGTTACTACTGGAGC
92	**Abx-338**	**VH CDR2**	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCA ACCCCTCCCTCAAGAGT

【０４５５】

【表６－１０】

93	**Abx-338**	**VH CDR3**	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	**Abx-338**	**VL CDR1**	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACTTAGCC
95	**Abx-338**	**VL CDR2**	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	**Abx-338**	**VL CDR3**	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	**Abx-393**	**VH CDR1**	213	CATTACTACTGGAGC
98	**Abx-393**	**VH CDR2**	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCTCTCCCTCAAGAGT
99	**Abx-393**	**VH CDR3**	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	**Abx-393**	**VL CDR1**	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGC
101	**Abx-393**	**VL CDR2**	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	**Abx-393**	**VL CDR3**	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

ｍＡｂ　５Ｆ９およびＡｂｘ－２２９のそれぞれの重鎖および軽鎖の両方のコード配列を含有する発現ベクターを上記の通り創製した。

【０４５６】

本発明を以下の実施例によって例示するが、これはさらなる限定と解釈されるべきではない。

【実施例】

【０４５７】

（実施例１）

抗ＧＣＣ抗体の生成および特徴づけ

免疫およびスクリーニングするためのＧＣＣタンパク質の生成を以下の通り実施した。ＧＣＣ抗原を、以下のＧＣＣ配列（シグナル配列および細胞外ドメイン）を含む配列をコードするＧＣＣ遺伝子の部分を発現ベクターにサブクローニングすることによって調製し

た。

【０４５８】

【化４９】

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVR
GRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMY
LDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTE
TEDCFWYLNALEASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAV
AEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLF
GHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTY
DTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKL (**配列番号** :229)

発現ベクター（ｐＬＫＴＯＫ１０７）により、ＧＣＣ配列と融合するためのＣ末端ＩｇＧ１Ｆｃ領域がもたらされた。このベクターは、ＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを有するエクソンを含み、変異させてエクソン内のＣＨ１断片から不対のシステインを除去した。さらに、このＩｇＧ１Ｆｃ領域のリジン２３５およびグリシン２３７をアラニンに変異させた。その構築物を、ＳＶ４０　Ｔ－抗原の遺伝子でトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）２９３細胞において、組換えによって、Ｃ末端ヒトＩｇＧ１　Ｆｃと融合した分泌型ＧＣＣ配列（配列番号２２８のアミノ酸残基２４～４３０）として発現させた。ＴＯＫ１０７－ｈＩｇと称されるタンパク質（別の名称、ｈＧＣＣ－ＥＣＤ／ｈＩｇＧ１　Ｆｃ、配列番号３１７）を、プロテインＡクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【０４５９】

上記の融合タンパク質を、Ｃ末端上のマウスＩｇＧ２ａ膜貫通領域の融合を可能にするｐＬＫＴＯＫ１１１などの発現ベクターにサブクローニングすることによってＧＣＣ抗原も調製した。この構築物を、組換えによってＣＨＯ細胞において発現させると、ＧＣＣの細胞外ドメインが細胞表面で検出される。ＧＣＣ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号３１８）の細胞表面での高発現は、ｐＬＫＴＯＫ１１１ベクターを、マウスのＣＤ７９ａ（ＭＢ－１）およびＣＤ７９ｂ（Ｂ２９）を含むｐＬＫＴＯＫ１２３と同時トランスフェクトする場合に実現される。このトランスフェクション（ＣＨＯ－ＧＣＣ＃２７）からのクローン＃２７を免疫原として使用した。ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２細胞も免疫原として使用した。

【０４６０】

ハイブリドーマの上清および精製されたｍＡｂをＥＬＩＳＡによってスクリーニングするために、ＧＣＣ融合構築物をコードする核酸をｐＣＭＶ１発現ベクター（Ｓｉｇｍａ）にクローニングした。精製タグ：ＦＬＡＧタグ（Ｎ末端における）およびＨｉｓタグ（Ｃ末端における）を、同様にその構築物にクローニングした。上記融合タンパク質構築物を２９３細胞にトランスフェクトし、発現させ、抗ＦＬＡＧ（登録商標）Ｍ２－アガロースアフィニティーカラム（Ｓｉｇｍａ）を通して組換えタンパク質を精製した。

【０４６１】

試薬および細胞系。ＨＥＫ２９３細胞、ＣＨＯ細胞、およびＴ８４ヒト結腸がん細胞をＡＴＣＣから得、ＡＴＣＣのプロトコールに従って維持した。

【０４６２】

マウス：マウスハイブリドーマを生成するために、雌のＣ５７ＢＬ／６マウス、４～６週齢をＴａｃｏｎｉｃ　Ｆａｒｍｓ、Ｉｎｃ．（Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ、ＮＹ）から購入した。ヒトハイブリドーマを生成するために、４～６週齢まで社内（ｉｎ－ｈｏｕｓｅ）で飼育された、ヒトＩｇＧ２抗体を産生するＸｅｎｏｍｏｕｃｅ（複数）をＡｂｇｅｎｉｘ、Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ）から得た。全ての動物を、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ｏｆ　Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｎｃのガイドラインに従って取得し、維持した。

【０４６３】
細胞系：機能アッセイのために使用した細胞系は、ＧＣＣをトランスフェクトした細胞およびベクター対照のＨＥＫ２９３細胞またはＨＴ２９細胞の細胞対であった。ＨＴ２９細胞を、ＥＦ－１αプロモーターまたは空ベクター（ｐＬＫＴＯＫ４）の制御下で、全長ＧＣＣでトランスフェクトし、Ｇ４１８中で選択した。これらの細胞におけるＧＣＣは、ＳＴペプチド（１～１８または５～１８）と接触させた場合にｃＧＭＰ応答を有することが確認された。ＨＥＫ２９３細胞を、ＣＭＶプロモーターまたは空ベクター（ｐＮ８ｍｙｃＳＶ４０）の制御下で、全長ＧＣＣでトランスフェクトし、ブラスチシジン中で選択した。これらの細胞におけるＧＣＣはｍｙｃタグを有する。最も高いＧＣＣの発現について選択されたクローンは、２９３－ＧＣＣ＃２、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２およびＨＴ２９－ＧＣＣ＃５であった。ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２も、抗ＧＣＣ抗体分子を生成するための免疫原として使用した。追加的なＧＣＣ発現細胞はＣＴ２６細胞である。ＧＣＣを発現しているＣＴ２６細胞系を開発するために、ｐＴＯＫ５８Ｄベクターを使用した。全長ＧＣＣを、重鎖をクローニングするために通常使用される部位にクローニングし、ルシフェラーゼを、軽鎖をクローニングするために通常使用される部位にクローニングした。ＣＴ２６細胞にトランスフェクションした後、ＧＣＣおよびルシフェラーゼの両方の独立した発現を確認した。ＧＣＣの表面発現を、５Ｆ９抗体を使用したフローサイトメトリーによって確認した。クローン＃３２を、さらに試験するために選択した。

【０４６４】
Ｔ８４結腸がん細胞系は、ＧＣＣを内因的に発現する。広範な細胞系パネルにおけるＧＣＣのＴａｑｍａｎ分析により、Ｔ８４が、ＧＣＣのｍＲＮＡを発現する唯一の細胞系であることが明らかになった。Ｔ８４細胞の細胞ペレットのＧＣＣをＧＣＣ選択的なｍＡｂで染色することにより、顕著なＧＣＣタンパク質の発現が示された。

【０４６５】
ＧＣＣ受容体レベルを放射標識したリガンド（ＳＴ毒素）で定量することにより、２９３－ＧＣＣ＃２細胞が、Ｔ８４細胞よりも多くのＧＣＣを発現し、一方ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２またはＨＴ２９－ＧＣＣ＃５が細胞当たり最も少ないＧＣＣ分子を発現することが示唆された。

細胞系　細胞全体の結合アッセイ（受容体／細胞）
ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２／＃５　１００，０００
Ｔ８４の内因性ＧＣＣ　３００，０００
２９３－ＧＣＣ　６００，０００

タンパク質を免疫することによるマウスｍＡｂの生成：ヒトＧＣＣの細胞外ドメイン／ヒトＩｇ融合タンパク質（ＴＯＫ１０７－ｈＩｇ、５０μｇ）を、ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ；ＧＩＢＣＯ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に懸濁させ、等体積のフロイント完全アジュバント（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を用いて乳化した。Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、エマルションを皮下部位３か所および腹腔内（ｉ．ｐ．）部位１か所に注射することによって免疫した。最初の免疫の２週間後、上記マウスに、フロイント不完全アジュバント中２５μｇのＴＯＫ１０７－ＨＩｇを用いてｉ．ｐ．追加免疫を与えた。１週間後、少量の血液を尾静脈から採取し、ＴＯＫ１０７－Ｉｇに対する血清の結合活性をＥＬＩＳＡによって滴定した。マウスを、それらの力価が、ＥＬＩＳＡで１：２４，３００を超えた場合、またはＦＡＣＳで１：５００を超えた場合に、融合のために選択した。選択されたマウスを、ＰＢＳ中２５μｇのＴＯＫ１０７－ｈＩｇを注射することによって追加免疫した。４日後、Ｐ３細胞と融合させるために、１匹のマウスを安楽死させ、そして脾臓細胞懸濁物を調製し、ＰＢＳで洗浄した。１か月後、Ｐ３細胞と融合させるために、別のマウスからの脾臓細胞を調製した。ＧＣＣに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、ＴＯＫ１０７－ｈＩｇへの結合について、非ＧＣＣ抗原への結合またはＩｇＧのＦｃ領域への結合と比較して、ＥＬＩＳＡによって試験する、ならびに、Ｔ８４細胞への結合またはＣａｃｏ－２細胞への結合またはＨＴ－２９クローン＃２細胞への結合について、ベクター対

照への結合と比較して、およびＧＣＣを発現していないＭＣＦ－７細胞への結合と比較して、ＦＡＣＳによって試験するというものであった。アイソタイプを、ＩＳＯＳＴＲＩＰ（登録商標）マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して決定した。これらの免疫スキームおよびハイブリドーマ融合により、マウス抗ＧＣＣ抗体分子である１Ｄ３、８Ｅ１２、３Ｇ１および１０Ｂ８が産生された。

【０４６６】

ヒトｍＡｂの生成。ヒトモノクローナル抗体を作製するために、遺伝子操作されたマウスであるＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（Ａｂｇｅｎｉｘ、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ）（８～１０週齢）を免疫した。Ｍｅｎｄｅｚら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１５巻：１４６～１５６頁（１９９７年）、ＧｒｅｅｎおよびＪａｋｏｂｏｖｉｔｓ　Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８巻：４８３～４９５頁（１９９８年）を参照されたい。いくつかの免疫スキームを使用した。１つのスキームでは、ヒトＧＣ－Ｃ細胞外ドメイン／ヒトＩｇ融合タンパク質（ＴＯＫ１０７－ｈＩｇ）１００マイクログラムを、ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水（ＰＢＳ；ＧＩＢＣＯ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に懸濁させ、等体積のフロイント完全アジュバント（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を用いて乳化した。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）を、尾の基部の皮下部位３か所、および腹腔内（ｉ．ｐ．）部位１か所にエマルションを注射することによって免疫した。最初の免疫の１４日後、マウスに、フロイント不完全アジュバント中５０μｇのＴＯＫ１０７－ｈＩｇを用いて追加免疫を与えた。血清試験により不十分な力価が示されたので、数週間休止した後、５０μｇのヒトＴＯＫ１０７－ｈＩｇの第２の追加免疫を与えた。２週間後、少量の血液を尾静脈から採取し、ＴＯＫ１０７－Ｉｇに対する血清の活性をＥＬＩＳＡによって、およびＨＴ２９－ＧＣＣ＃２細胞に対する血清の活性をＦＡＣＳによって滴定した。マウスを、それらの力価が、ＥＬＩＳＡで１：２４，３００を超えた場合、またはＦＡＣＳで１：５００を超えた場合に、融合のために選択した。その追加免疫のほぼ３か月後に、マウスを、フロイント不完全アジュバント中10^7個のＨＴ－２９＃２細胞を用いて追加免疫し、次の日にフロイント不完全アジュバント中５０μｇのＴＯＫ１０７－ｈＩｇを用いて追加免疫した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗ＧＣＣ抗体分子である５Ｆ９および１Ｄ２を産生した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗ＧＣＣ抗体分子である５Ｆ９および１Ｄ２を産生した。４日後、融合のために、上記マウスを安楽死させ、そして脾臓細胞懸濁物を調製し、ＰＢＳで洗浄した。ＧＣＣに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、ＴＯＫ１０７－ｈＩｇへの結合について、非ＧＣＣ抗原への結合またはＩｇＧのＦｃ領域への結合と比較して、ＥＬＩＳＡによって試験する、ならびに、Ｔ８４細胞への結合またはＨＴ－２９クローン＃２細胞への結合について、ベクター対照への結合と比較して、およびＧＣＣを発現していないＭＣＦ－７細胞への結合と比較して、ＦＡＣＳによって試験するというものであった。アイソタイプを、ＥＬＩＳＡを使用して、またはＦＡＣＳによってＩｇＧ特異的二次抗体またはＩｇＭ特異的二次抗体を使用して決定した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗ＧＣＣ抗体分子である５Ｆ９および１Ｄ２を産生した。

【０４６７】

別のスキームでは、ｐｋＴＯＫ１１１ベクターを含み、その表面にＧＣＣの細胞外ドメインを発現しているＣＨＯ－ＧＣＣ＃２７細胞（5×10^6）を、ＢＩＰ（尾の基部＋腹腔内）免疫の間に、２週間で２回免疫原として使用した。血液をサンプリングした後、ＴＯＫ１０７－ｈＩｇに対する抗ＧＣＣ反応性をＥＬＩＳＡによって同定するために、マウスを、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃２細胞を用いて追加免疫した（前の追加免疫以後３週間、または２か月超のいずれか）。最後の追加免疫の４日後に、細胞融合のために、それぞれの脾臓を回収した。ＧＣＣに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、ＴＯＫ１０７－ｈＩｇへの結合について、非ＧＣＣ抗原への結合またはＩｇＧのＦｃ領域への結合と比較して、ＥＬＩＳＡによって試験する、ならびに、ＨＴ－２９クローン＃２細胞への結合について、ベクター対照への結合、Ｔ８４細胞への結合、または

ＧＣＣを発現していないＭＣＦ－７細胞への結合と比較して、ＦＡＣＳによって試験するというものであった。アイソタイプを、ＥＬＩＳＡを使用して決定した。これらの免疫スキームおよびハイブリドーマ融合により、ヒト抗ＧＣＣ抗体分子である５Ｈ３、６Ｈ８、８Ｃ２、１０Ｃ１０、１０Ｄ３および１Ｃ９が産生した。

【０４６８】

ヒトｍＡｂを産生するハイブリドーマ：脾臓細胞を計数し、重鎖免疫グロブリン鎖または軽鎖免疫グロブリン鎖のいずれかを分泌することができないＳＰ２／０骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ８－００６、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）と、脾臓：骨髄腫の比率２：１で混合した。細胞を、１２個の９６ウェル組織培養プレート中のＨＡＴ選択培地中で、標準の手順に従ってポリエチレングリコール１４５０（ＡＴＣＣ）と融合した。融合の１０～２１日後、ハイブリドーマのコロニーが確認できるようになったので、培養物の上清を回収し、次いでＥＬＩＳＡおよびＦＡＣＳによってスクリーニングした。

【０４６９】

ＳＬＡＭ技術に基づく抗体生成：モノクローナル抗体もＡｂｇｅｎｉｘのＳＬＡＭ技術（Ｂａｂｃｏｏｋら、ＰＮＡＳ　９３巻：７８４３～７８４８頁（１９９６年））によって単離した。この方法の最初のステップは、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥマウスを免疫することであり、それは上記マウスを以下に記載されるスキームの中からのスキームによってＧＣＣ抗原で免疫するというものであった。次に、ＳＬＡＭ（選択リンパ球抗体法）ステップは、まず、リンパ細胞の大集団のうちで、所望の特異性または機能を有する抗体を産生している単一のリンパ球を同定するステップと、次いで、そのリンパ球から、その抗体の特異性をコードする遺伝情報を救出するステップとを含む。そのようなリンパ球（最初にＩｇＧ２抗体またはＩｇＧ４抗体を産生する）の可変領域を増幅し、ＩｇＧ１アイソタイプを担持するベクターに移入する。

【０４７０】

ＳＬＡＭ抗体（例えば、Ａｂｘ－２２９、Ａｂｘ－０１２、Ａｂｘ－２２１、Ａｂｘ－０２０、Ａｂｘ－３３８、Ａｂｘ－１０６、Ａｂｘ－１９８またはＡｂｘ－３９３）に対する免疫スキームは、キーホールリンペットヘモシアニンと結合体化させたＴＯＫ－ｈＩｇまたはＴＯＫ－ｈＩｇを使用することを含んだ。免疫は、足蹠または尾の基部と腹腔内の組み合わせのいずれかを介した。免疫原１０μｇの最初の免疫は、ＴＩＴＥＲＭＡＸ（登録商標）ｇｏｌｄアジュバントまたはフロイント完全アジュバントのいずれかを含んだ。免疫原５μｇの追加免疫を、Ａｌｕｍ、ＴＩＴＥＲＭＡＸ（登録商標）ｇｏｌｄアジュバントまたはフロイント不完全アジュバントのいずれかを使用して６～８回実施した。ＴＩＴＥＲＭＡＸ　ｇｏｌｄが最初のアジュバントであった場合、ミョウバン（ａｌｕｍ）が追加免疫アジュバントであり、追加免疫は３～４日間隔で実施した。最初の免疫および追加免疫に、フロイント完全アジュバント、次いでフロイント不完全アジュバントを使用した場合、追加免疫は約２週間おきの間隔で実施した。４回目～６回目の追加免疫の際の力価の血清検査の後に、時にはさらに追加免疫した。４日後に回収する前の最終の追加免疫には、ＰＢＳ中免疫原を使用した。

【０４７１】

ＥＬＩＳＡによるｍＡｂの分析。高タンパク質結合性９６ウェルＥＩＡプレート（Ｃｏｓｔａｒ／Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｉｎｇ、ＮＹ）を、１ウェル当たり５０μｌのＴＯＫ１０７－ｈＩｇの２μｇ／ｍｌ溶液（１ウェル当たり０．１μｇ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。過剰な溶液を吸引し、そのプレートをＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し（３回）、次いで、非特異的な結合を阻害するために、１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、フラクションＶ、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、ＭＯ）を用いて室温（ＲＴ）で１時間ブロッキングした。ＢＳＡ溶液を除去し、各融合物プレートのウェルからのハイブリドーマの上清１ウェル当たり５０μｌを加えた。次いで、プレートを３７℃で４５分間インキュベートし、ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で３回洗浄した。１％ＢＳＡ／ＰＢＳ中１：４０００に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆ（ａｂ）２（Ｈ＆Ｌ）または

１％ＢＳＡ／ＰＢＳ中１：４０００に希釈した抗ヒトＩｇＧ Ｆ（ａｂ）２（Ｈ＆Ｌ）（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）を各ウェルに加え、次いでプレートを３７℃で４５分間インキュベートした。洗浄した後、１ウェル当たり５０μｌのＡＢＴＳ溶液（Ｚｙｍｅｄ、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）を加えた。陽性ウェルの４０５ｎｍにおける緑色の強度を、Ｖｍａｘマイクロタイタープレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｃｏｒｐ．、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）において評価した。次いで、陽性反応を示した全てのハイブリドーマウェルを２４ウェルの培養に拡大し、限界希釈法によってサブクローニングし、ＥＬＩＳＡおよびＦＡＣＳによって分析した。最も良好に産生するサブクローン３つをさらに拡大した。

【０４７２】

フローサイトメトリーによるｍＡｂの分析。ＥＬＩＳＡスクリーニングと並行して、融合物プレートの上清全てに対してフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）スクリーニングを行った。ＨＴ－２９クローン＃２またはトランスフェクトしていないＨＴ－２９細胞を、Ｔ２２５フラスコ（Ｃｏｓｔａｒ／Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｉｎｃ．、Ｃｏｒｎｉｎｇ、ＮＹ）中の、１０％ウシ胎仔血清（ＧＩＢＣＯ）を補充したＤＭＥＭ（ＧＩＢＣＯ）中で成長させた。細胞を、Ｖｅｒｓｅｎｅ（ＧＩＢＣＯ）を使用してフラスコ表面から引き離し、採取し、ＤＭＥＭで２回、次いで１％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液で１回洗浄した。上記細胞を１％ＢＳＡ／ＰＢＳに再懸濁させ、2×10^{6}個の細胞をＶ底９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ）の各ウェルに加え、２５００ＲＰＭで５分間、遠心分離した（洗浄）。洗浄溶液を廃棄し、各融合物プレートウェルの洗浄物からの上清１ウェル当たり５０μｌを加えた。プレートシーラー（Ｌｉｎｂｒｏ／ＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ、ＬＬＣ、Ｓｏｌｏｎ、ＯＨ）を適用し、次いでプレートを穏やかにボルテックスして再懸濁させ、細胞と上清を混合し、４℃（氷上）で３０分間インキュベートした。次いでプレートを冷１％ＢＳＡ／ＰＢＳで洗浄し（３回）、１：５０希釈した、ＦＩＴＣ結合体化ロバ抗マウスＩｇＧ Ｆ（Ａｂ）２（Ｈ＆Ｌ）またはＦＩＴＣ結合体化ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆ（Ａｂ）２（Ｈ＆Ｌ）（Ｊａｃｋｓｏｎ）を１ウェル当たり５０μｌを、４℃で（暗所中、氷上で）３０分間各ウェルに加えた。プレートを再度、冷１％ＢＳＡ／ＰＢＳ中で３回洗浄し、冷１％パラホルムアルデヒド（Ｓｉｇｍａ）／ＰＢＳに固定した。細胞をクラスターチューブ（Ｃｏｓｔａｒ）に移し、ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）で分析した。次いで、正のシフトを示したいずれのハイブリドーマウェルも２４ウェルの培養に拡大し、限界希釈法によってサブクローニングした。

【０４７３】

内部移行アッセイ。抗ＧＣＣ抗体分子の内部移行を、ＧＣＣ発現細胞およびベクター対照細胞の両方において、免疫蛍光顕微鏡検査を使用して試験した。細胞をカバーガラス上で成長させ、１０分間氷上に置いた後、冷培地中１０μｇ／ｍｌの抗体と共に、氷上で２０分間インキュベートした。内部移行については、抗体含有培地を新鮮な培地と交換し、上記細胞を２～３時間にわたって３７℃にシフトさせるか、または氷上で維持した。ＰＢＳ中ですすぎ、室温で４％パラホルムアルデヒドに短時間固定した後、細胞を０／５％のＴＲＩＴＯＮ Ｘ－１００中で１５分間透過処理した。試験抗体の局在性を、蛍光標識抗ＩｇＧ抗体を使用して、レーザー走査型共焦点顕微鏡検査によって決定した。細胞を氷上においた場合、抗体分子はＧＣＣ発現細胞の細胞表面に局在した。３７℃でインキュベーションすると、５Ｆ９は、内部移行を示す、細胞膜内の強調染色を示した。ベクター細胞では内部移行は検出されなかった。

【０４７４】

抗ＧＣＣ抗体分子の性質の概要。本明細書で生成する抗体の大部分を、一群の上記のアッセイにおいて試験した。表７に、それぞれのｉｎ ｖｉｔｒｏにおける性質が要約されている。（Ｔ８４＝ヒト結腸腫瘍細胞、ＭＣＦ７＝ヒト乳房腫瘍細胞、ＷＢ＝ウェスタンブロット、ＩＰ＝免疫沈降、ＩＨＣ＝免疫組織化学検査；内部移行では、ＭＣＦ－７細胞

と比較してＴ８４細胞が使用される）
表７．抗ＧＣＣ抗体分子の性質
【０４７５】
【表７－１】

	ELISA		FACS							
抗体	TOK1 07-hIg	TOK8 2-hIg	HT-29#2	HT-29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	**内部移行**
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+

【０４７６】

【表７－２】

Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

さらに、一部の抗体を、ＧＣＣ発現細胞においてＳＴペプチド誘導性のカルシウムイオンフラックスを阻害するそれらの能力について試験した。ＨＴ２９－ＧＣＣ＃１８細胞において、５０ｎＭのＳＴの存在下、抗ＧＣＣ抗体分子の存在下または非存在下でｃＧＭＰアッセイを実施した。５Ｆ９によるカルシウムイオンフラックスが用量依存的に阻害された。他の抗体、５Ｈ３およびＡｂｘ－３３８も、ＳＴによって誘導されるカルシウムイオンフラックスを阻害した。

【０４７７】

抗ＧＣＣ抗体分子の相対的な親和性の推定値。一部の抗ＧＣＣ抗体分子の相対的親和性（ＥＣ５０；最大半量の結合のための抗体濃度）を、ＴＯＫ１０７－ｈＩｇに対するＥＬＩＳＡ測定値から、および、ＧＣＣ発現細胞を用いたＦＡＣＳ測定値によって推定した。以下の表に一部の結果が示されている。

【０４７８】

表８．抗ＧＣＣ抗体分子のＥＣ５０

【０４７９】

【表８】

抗体	EC50, TOK107-hIg, M	EC50, **細胞**, M
5F9	3.65×10^{-8}	1.24×10^{-9}
5H3	4.16×10^{-9}	4.7×10^{-7}
Abx-338	4.9×10^{-12}	9.0×10^{-8}
3G1	2.28×10^{-8}	5.8×10^{-10}
Abx-229	2.95×10^{-8}	
Abx-221	6.55×10^{-9}	
Abx-020	4.58×10^{-9}	
Abx-012	5.55×10^{-10}	
Abx-198	4.77×10^{-8}	

抗ＧＣＣ抗体分子の親和性の測定。ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）Ｔ１００システム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して、２２℃における抗ＧＣＣ　５Ｆ９抗体の親和性を測定した。

【０４８０】

ステップ１：ＭＡｂ　５Ｆ９（Ｐｒｅｐ　Ａ）を、ｐＨ４．０の１０ｍＭ　酢酸ナトリウム中で２０μｇ／ｍＬに希釈し、参照５Ｆ９　ＭＡｂ（Ｐｒｅｐ　Ｂ）をｐＨ４．０の１０ｍＭ　酢酸ナトリウム中で１０μｇ／ｍｌに希釈した。各ｍＡｂを、数個のＣＭ４

ＢＩＡＣＯＲＥチップに、標準アミンカップリングを使用して共有結合的に固定化した。調製した各ＣＭ４チップについて、Ｐｒｅｐ　Ａ　５Ｆ９を２つのフローセルにわたって約７５～１００ＲＵで固定し、一方、Ｐｒｅｐ　Ｂ　５Ｆ９は１つのフローセルに約７０～８０ＲＵで固定化した。各ＣＭ４チップの残りの第４のフローセルを参照フローセルとして使用した。

【０４８１】

ステップ２：ＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃ（ＴＯＫ１０７－ｈＩｇ）のストック濃度を、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、４巻：２４１１頁（１９９５年）中でＰａｃｅら、およびＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、３．１．１～３．１．９（２００３年）中でＰａｃｅおよびＧｒｉｍｓｌｅｙによって詳説されている方法を使用して決定した。

【０４８２】

ステップ３：ステップ１に記載の調製したＣＭ４チップのそれぞれについて、ＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃを２分間にわたって２０２ｎＭ～１．６ｎＭの濃度範囲（２×段階希釈）で注入し、その後、７分間解離させた。試料を、ダブルリファレンスのために、いくつかの緩衝液注入サイクルを分散させて用いて３連で無作為に注入した。より顕著な解離速度（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）の減衰データを得るために、３回の追加的な１０１ｎＭのＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃの注入および３回の追加的な緩衝液の注入を、２分間の注入および４時間の解離時間を用いて実施した。全ての実験に対して１００μＬ／分の流速を使用し、全ての表面を、１０ｍＭのグリシン－ＨＣｌ（ｐＨ２．０）の２０秒のパルスで再生させた。全ての試料を、１００μｇ／ｍＬのＢＳＡを添加したＨｅｐｅｓ緩衝食塩水、０．００５％のポリソルベート２０、ｐＨ７．４（ＨＢＳ－Ｐ）であるランニングバッファー中で調製した。

【０４８３】

ステップ４：全てのセンサーグラム（時間に対する表面プラズモン共鳴のプロット）データを、Ｓｃｒｕｂｂｅｒ２．０ソフトウェア（ＢｉｏＬｏｇｉｃ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｃａｍｐｂｅｌｌ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を用いて加工し、マストランスポート係数k_mについての項を含めた１：１相互作用モデルに、ＣＬＡＭＰ（商標）ソフトウェア（ＭｙｓｚｋａおよびＭｏｒｔｏｎ　Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｈｅｍ．Ｓｃｉ．２３巻：１４９～１５０頁（１９９８年））を使用してグローバルフィットを行なった。

【０４８４】

ｍＡｂ固定化のレベルが低く保たれ、したがって各表面についてセンサーグラムデータの全体的な解析に起因するR_{max}が少なくとも１２ＲＵを下回る限りは、１：１モデルによってデータに対する非常に良好なフィッティングがもたらされた。ほとんどの場合、２つのＰｒｅｐ　Ａ　５Ｆ９表面のうちの１つが、信頼できるカイネティクス測定のためには低すぎるR_{max}（２ＲＵ未満）を有した。しかし、できる限り、同じＣＭ４チップ由来のＰｒｅｐ　Ａ　５Ｆ９に結合しているＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃの２つのフローセルからのデータを同時にフィッティングした。高いR_{max}（＞１２ＲＵ）をもたらすｍＡｂ表面が調製された場合、センサーグラムは複合体カイネティクス（ｃｏｍｐｌｅｘｃ　ｋｉｎｅｔｉｃｓ）を明確に示し、したがって１：１モデルはデータに十分にフィットしない。ＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃが二価の構築物であり、固定化したｍＡｂの表面密度が高いとＧＣＣ－ＥＣＤ－Ｆｃが表面に非常に強く結合する確率が最も増加する可能性があるという事実から、これは驚くべきことではない。この試験について報告された反復試験は、１：１相互作用モデルに良好にフィッティングするデータのみを含む。Ｐｒｅｐ　Ａ　５Ｆ９およびＰｒｅｐ　Ｂ参照ｍＡｂについての全ての反復試験から得られたK_Dおよび速度定数が、それぞれ表９および表１０に列挙されている。

【０４８５】

表９：固定化したＰｒｅｐ　Ａ　５Ｆ９モノクローナル抗体へのＧＣＣ－Ｆｃの結合

【０４８６】

【表９】

反復試験	R_{max} (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
A	11	1.06×10^5	1.19×10^{-5}	112
B	8	1.20×10^5	1.10×10^{-5}	91.7
C	5	1.07×10^5	2.15×10^{-5}	201
D	9	1.22×10^5	1.11×10^{-5}	91.0
E	6,4	9.64×10^4	1.77×10^{-5}	184
平均 (95%**信頼区間**)		$1.10 (0.13) \times 10^5$	$1.46 (0.59) \times 10^{-5}$	136 (65)

表１０：固定化したＰｒｅｐ　Ｂ　５Ｆ９モノクローナル抗体へのＧＣＣ－Ｆｃの結合

【０４８７】

【表１０】

反復試験	R_{max} (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
F	9	9.68×10^4	7.64×10^{-6}	78.9
G	8	1.20×10^5	1.24×10^{-5}	103
H	7	9.09×10^4	9.57×10^{-6}	105
I	12	1.21×10^5	1.54×10^{-5}	127
平均 (95% **信頼区間**)		$1.07 (0.25) \times 10^5$	$1.13 (0.54) \times 10^{-5}$	103 (31)

抗体への毒素の結合体形成

メイタンシン。マウス抗ヒト（ＭＡＨ）－ＩｇＧ－ＤＭ１および抗ＧＣＣ－ＤＭ１を、米国特許第６，４４１，１６３号に記載のメイタンシノイドの細胞傷害性結合体を産生するための１ステッププロセスに従って生成した。

【０４８８】

簡単に述べると、公開された手順を使用してメイタンシノイドを抗体と結合体化させた。ＤＭ１を、ＳＭＣＣヘテロ二官能性架橋剤（スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラートを使用して抗体と結合体化させた；Ｃｈａｒｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２巻：１２７～１３１頁（１９９２年）。ＤＭ４を、ＳＰＤＢヘテロ二官能性架橋剤を使用して抗体と結合体化させた（Ｗｉｄｄｉｓｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４９巻：４３９２～４４０８頁（２００６年））。結合体化させた抗体を、未反応の反応副生成物から、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ－２５カラムを使用したゲル濾過クロマトグラフィーによって分離する。

【０４８９】

アウリスタチン。アウリスタチンでの結合体形成は、公開された手順を使用して実施することができる（例えば、Ｄｏｒｏｎｉｎａら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、２１

巻：７７８～７８４頁（２００３年））。一般に、アウリスタチンは、抗体鎖のシステインに連結する。システインへの連結は、まず抗体分子内のジスルフィド結合を還元することによって実現される。還元プロセスを調節することにより、全部である必要はないが、一部の鎖間のジスルフィド結合に還元を限定しようとする。したがって、アウリスタチンは、遊離のシステインに結合することができる。結合体形成反応をクエンチした後に、反応副生成物を除去し、緩衝液を交換して所望の処方物にする。

【０４９０】

簡単に述べると、７．６ｍｇ／ｍＬの抗ＧＣＣ抗体分子を３７℃で予め平衡化し、次いで１５％体積の５００ｍＭ　ホウ酸ナトリウム、ｐＨ８．０を加えてｐＨを７．５～８．０に上昇させる。溶液は、１ｍＭのＤＴＰＡも含有する。抗体を、抗ＧＣＣ抗体分子１モル当たり２．６当量のトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を加えることによって部分的に還元し、３７℃で攪拌する。２８分後、還元された抗ＧＣＣ抗体分子の溶液を氷上に置き、次いで直ちに４．８～４．９モル当量（抗ＧＣＣ抗体分子に対して）の、ＤＭＳＯ中２０．５ｍＭ溶液としての薬物リンカー（例えば、ｍｃ－ｖｃ－ＭＭＡＦまたはｍｃ－ｖｃ－ＭＭＡＥまたはｍｃ－ＭＭＡＦ）で処理する。追加的なＤＭＳＯを導入して、混合物を体積で１０％ＤＭＳＯにする。反応混合物を約９０分間氷上で撹拌した後、５倍モル過剰のＮ－アセチルシステイン（ｍｃ－ｖｃ－ＭＭＡＦに対して）で処理する。その結合体をタンジェンシャルフロー濾過によって単離し、まず約１０ｍｇ／ｍＬに濃縮し、次いで約１０ダイアフィルトレーション容積（ｄｉａｖｏｌｕｍｅ）のＰＢＳを用いてダイアフィルトレーションした。得られた抗体薬物結合体は、抗体当たり約４つの薬物－リンカー単位の平均薬物の負荷量を有した。便宜上、以下の実施例および添付の図面では、アウリスタチン免疫結合体は、薬物の負荷量に関係なく以下の省略形式で言及される：「Ａｂ－ｖｃ－ＭＭＡＦ」は、ｍｃ－ｖｃ－ＭＭＡＦと結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子を指し；「Ａｂ－ｖｃ－ＭＭＡＥ」は、ｍｃ－ｖｃ－ＭＭＡＥと結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子を指し；「Ａｂ－ｍｃ－ＭＭＡＦ」は、ｍｃ－ＭＭＡＦと結合体化させた抗ＧＣＣ抗体分子を指す。特異的な抗ＧＣＣ抗体分子を含む免疫結合体は同じ形式で言及される：例えば、５Ｆ９－ｖｃ－ＭＭＡＦ、５Ｆ９－ｖｃ－ＭＭＡＥ、および５Ｆ９－ｍｃ－ＭＭＡＦ。

【０４９１】

抗体当たり約２つの薬物－リンカー単位の平均薬物負荷を有する抗体薬物結合体を調製するために、プロトコール（上記）を、ＴＣＥＰの量を５０％減らすことによって改変する。薬物リンカーの量も５０％減らす。対応する抗体薬物結合体をＡｂ－ｖｃ－ＭＭＡＦ（２）と略す。

【０４９２】

５Ｆ９　ｖｃＭＭＡＥの調製

上記の一般的な方法と同様の方法を使用して、５Ｆ９　ｍＡｂをＭＭＡＥ（式（ＸＩＩ））と称されるアウリスタチン誘導体と、本明細書に記載のｖｃ（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）リンカーを使用して結合体化させ、５Ｆ９　ｖｃＭＭＡＥと称される免疫結合体を創製した。ｖｃリンカーのＭＭＡＥ（Ｓｅａｔｔｌｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｉｎｃ．、Ｂｏｔｈｅｌｌ、ＷＡ）への結合体形成を以前に記載されている通り完了した（例えば、ＵＳ２００６／００７４００８を参照されたい）。

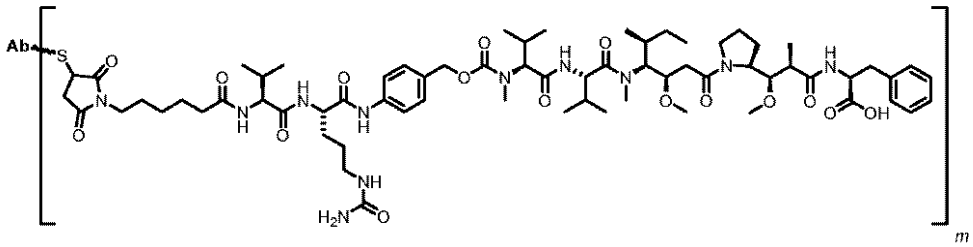
【０４９３】

簡単に述べると、ｐＨ５．８の１００ｍＭの酢酸塩中の１７．８ｍｇ／ｍＬの５Ｆ９　ｍＡｂ溶液を、０．３Ｍのリン酸二ナトリウムを用いてｐＨ８に調整し、最終のｍＡｂ濃度１１．３ｍｇ／ｍｌを得た。次いで、最終濃度を１ｍＭにするために反応混合物にＤＴＰＡを加えた。次いでｍＡｂを、２．２８モル当量のＴＣＥＰ（ｍＡｂのモルに対して）を加えることによって部分的に還元し、次いで３７℃で１．５時間撹拌した。次いで、部分的に還元されたｍＡｂ溶液を４℃まで冷却し、４．４モル当量のｖｃＭＭＡＥ（抗体のモルに対して）をＤＭＳＯ中２０．３ｍＭ溶液として加えた。混合物を２２℃で３０分間撹拌し、次いで５モル当量のＮ－アセチルシステイン（ｖｃＭＭＡＥのモルに対して）を

加えた後さらに１５分間撹拌した。過剰なクエンチされたｖｃＭＭＡＥおよびその他の反応構成成分を、１０ダイアフィルトレーション容積のＰＢＳ、ｐＨ７．４を用いる免疫結合体の限外濾過／ダイアフィルタレーションによって除去した。生じた免疫結合体を５Ｆ９　ｖｃＭＭＡＥと名付け、それは次式を有する：

【０４９４】

【化５０】



式中、Ａｂは５Ｆ９　ｍＡｂであり、ｍは１～８である。平均薬物の負荷量（ｍ）は約３．６であった。

【０４９５】

細胞傷害性アッセイ。各抗体の、標的発現細胞に結合し、内部移行し、それを死滅させる能力を測定するために、細胞傷害性アッセイを実施した。このアッセイでは、細胞を、さまざまな濃度の結合体化させていない一次抗ＧＣＣ抗体および固定された無毒性濃度のＤＭ１と結合体化させた抗ヒトＦｃ二次抗体と一緒に（間接的細胞傷害性）、またはさまざまな濃度の毒素と結合体化させた抗ＧＣＣ　ｍＡｂと一緒に（直接的細胞傷害性）インキュベートした。インキュベーションの４日後に細胞の生存率をＷＳＴアッセイによって測定した。ヒト抗ＧＣＣ抗体の、２９３－ＧＣＣ＃２細胞に対する相対的な効力が表８に示されており、これは、ＤＭ１と結合体化させたマウス抗ヒトＩｇＧ　ｍＡｂを使用して決定した（ＭＡＨ－ＩｇＧをクローンＨＰ６０７（ＣＲＬ１７５３、ＡＴＣＣから精製した）。５Ｆ９および２２９が最も強力な抗ＧＣＣ　ｍＡｂであり、そのＬＤ５０は２６ｐＭおよび７８ｐＭである。本明細書では示されていないが、誤差は、反復数の範囲で測定したところ一般にこれらの平均の２０％以内である、または標準偏差は２反復数超である。

【０４９６】

表１１．２９３－ＧＣＣ＃２細胞に対する抗ＧＣＣ抗体の細胞傷害性アッセイの結果

【０４９７】

【表１１】

抗 GCC 抗体	LD50 (pM)
5F9	26
229	78
106	166
221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

細胞表面の結合。結合体化させていない５Ｆ９またはアウリスタチンと結合体化させた５Ｆ９の結合を、フローサイトメトリーを使用した間接免疫蛍光法アッセイによって評価した。１ウェル当たり細胞１×１０^{6}個を、Ｖ底９６ウェルプレートに播種し、１～０．００１μｇ／ｍｌの抗体の段階希釈物を用いて氷上で１時間インキュベートした。細胞を氷冷のＰＢＳ中３％ＦＢＳで２回洗浄し、１：２００マウス抗ヒトＰＥ　ＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ２０４３－０９）と一緒に氷上で１時間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメーターにおいてフローサイトメトリーによって分析した。データを、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩシステムソフトウェアを使用して解析し、平均蛍光強度を決定した。

【０４９８】

エピトープマッピング。エピトープを同定するために複数の戦略を開始した。ペプチドアレイ。１５アミノ酸のオーバーラップを有する２０－マー（ｍｅｒ）のペプチドを生成し、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）をＧＣＣの膜貫通ドメイン（アミノ酸１～４４０）中に包含した。ペプチドを合成し、アレイとして提供し、ガラススライド上に固定化した。直鎖状ペプチドが結合するために十分であるかを決定するために、アレイを抗ＧＣＣ抗体のそれぞれとハイブリダイズさせた。Ａｂｘ－１９８はペプチド５５および５６に結合したが、３Ｇ１抗体、８Ｆ１抗体および１０Ｂ８抗体は、ペプチド５５、５６および５７に結合した。これらのペプチドは配列

【０４９９】

【化５１】

ILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (配列番号:225)

にまたがっている。ペプチド間のオーバーラップ領域は

【０５００】

【化５２】

LEDNVTAPDY (配列番号:314).

である。Ａｂｘ－０１２、Ａｂｘ－３３８およびＡｂｘ－１０６は、ペプチド７１および７２に結合した。配列

【０５０１】

【化５３】

FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (配列番号:226),

、および配列

【０５０２】

【化５４】

RNLTFEGYDGPVTLD (配列番号:315)

は２つのペプチドにオーバーラップしている。

【０５０３】

ＧＣＣ切断変異体への細胞表面の結合。ＧＣＣ　ＥＣＤの切断変異体を、およそ５０アミノ酸の欠失増大を表すＦＬＡＧタグをつけた構築物（ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ－３）として生成した（ＦＬ成熟ペプチドおよび８つの切断物（Δ１～３２、Δ１～４９、Δ１～９４、Δ１～１２８、Δ１～１７７、Δ１～２２６、Δ１～２７９、Δ１～２２９およびΔ１～３７９）。構築物を２９３細胞において発現させ、その後、抗ＧＣＣ抗体分子によって免疫沈降させ、ＧＣＣ　ＥＣＤ変異体でトランスフェクトした２９３細胞の溶解物中のＦＬＡＧエピトープについてウェスタンブロットを行った。抗体５Ｆ９はΔ１～３２変異を有する細胞に結合するが、Δ１～４９変異を有する細胞には結合しない。５Ｆ９のＧＣＣへの結合は、そのタンパク質がアミノ酸３３～５０の間で切断されている場合に失われ、これは、この領域が５Ｆ９による、ＧＣＣ上のその結合性エピトープの認識に関与することを示唆している。しかし、ラットおよびマウスのＧＣＣ配列は、この領域においてヒトＧＣＣと同一であり、５Ｆ９はマウスまたはラットのＧＣＣに結合しないので、５Ｆ９抗体は、ヒトＧＣＣのアミノ酸３３～５０が存在することによって形成される高次構造エピトープに結合する可能性がある。

【０５０４】

（実施例２）

毒素リンカーの選択／ＡＤＣの特徴づけ

抗体薬物結合体（ＡＤＣ）戦略では、非常に強力な毒素を抗体と結合体化させること、毒素の細胞傷害性は、標的特異的に腫瘍を対象とすることができ、正常組織の抗原陰性細胞に影響を及ぼすことなく、抗原を発現している腫瘍細胞に毒素が送達され、したがって全身性の毒性を低下させることができる。アウリスタチン（ドラスタチン１０の類似体）およびメイタンシンクラスの毒素を、抗ＧＣＣ　ｍＡｂとのＡＤＣとして評価した。これらの毒素は全て微小管重合の阻害剤であり、抗有糸分裂薬として作用する。遊離の毒素と接触させた細胞における試験により、遊離の毒素の細胞傷害性は、ＧＣＣ発現細胞とＧＣＣを有さない対照細胞を区別しないことが示された。これらの遊離の毒素は、表９に示されているように、ＨＴ２９－ベクター対ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５細胞において、２９３－ベクター、２９３－ＧＣＣ＃２細胞に対して強力であった。

【０５０５】

表１２．遊離毒素の細胞傷害性

【０５０６】
【表１２】

	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
細胞系	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293 **ベクター**	0.07	6	3.37	2.34	2.83	2.00	0.79	0.79
293 GCC#2	4	3	2.07	1.48	2.96	2.23	0.83	1.03
HT29	4	1	5.21	1.91	2.69	1.09	0.57	0.27
HT29 GCC#5	7	4	7.65	3.32	1.00	0.14	0.40	0.17

種々の毒素を抗体に結合体化させる化学反応は異なっており、それはリンカーの安定性に影響を及ぼす。リンカーの安定性は、血液中または標的でない組織中での薬物放出に対する腫瘍での薬物放出に影響することによって治療域に影響を及ぼす。理想的なＡＤＣリンカーは、血液中では高い安定性を有するが、標的媒介性細胞侵入に際して効率的に遊離する。

【０５０７】
アウリスタチン
３つのアウリスタチン－リンカー対を評価した。まず、これらの結合体をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価し、次に大規模ｉｎ　ｖｉｖｏ試験のための毒素－リンカーを決定するために、５Ｆ９をｖｃＭＭＡＥ、ｖｃＭＭＡＦおよびｍｃＭＭＡＦと結合体化させた（結合体当たり２０ｍｇ）。

【０５０８】
アウリスタチンは、天然産物であるドラスタチン１０に関連する合成毒素である。ＭＭＡＥとＭＭＡＦはわずかに異なり、ＭＭＡＦ型はＲ２位にカルボン酸基を有し、それにより遊離の毒素としての細胞浸透性および効力が低下している。ＭＭＡＥはＰｇｐ薬物ポンプの基剤であるが、ＭＭＡＦはそうではない。

【０５０９】
アウリスタチンを、部分的に抗体を還元するプロセス、マレイミド薬物誘導体との反応、過剰なシステインでのクエンチング、濃縮および緩衝液のＰＢＳへの交換によって鎖間システインと結合体化させる。アウリスタチンは、細胞内に取り込まれると切断されるカテプシンＢ感受性ジペプチドリンカー、または切断不可能なリンカーに結合させることができる。

【０５１０】
ｖｃモノメチルアルリスタチン（ｖｃＭｏｎｏＭｅｔｈｙｌＡｕｒｉｓｔａｔｉｎ）リンカーでは、バリンシトルリンジペプチド結合が、ｐ－アミノベンジルカルバメート（ＰＡＢ）基によって薬物に結合し、マレイジミド（ｍａｌｅｉｄｉｍｉｄｏ）カプロイル結合体形成基によって抗体に結合している。内部移行すると、ジペプチドリンカーはリソソームのプロテアーゼであるカテプシンＢによって切断され、ＰＡＢ基は自己破壊し、遊離の毒素が放出される。このリンカーは、血清の安定性を維持しながらカテプシンＢによる細胞内の薬物放出を最大にするように設計された。

【０５１１】
アウリスタチンは、ペプチダーゼ感受性リンカーを用いずに、マレイミド結合体形成基に直接結合したＭＭＡＦなどの切断不可能なリンカーによって抗体に連結することもできる。ＭＣ結合体化ＡＤＣも標的媒介性細胞死（ｔａｒｇｅｔ　ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｃｅｌｌ　ｋｉｌｌ）において有効である。

【０５１２】

切断不可能なアウリスタチン結合体についての薬物放出の機構は、リソソームにおける一般的な抗体分解によるものと考えられる。ＬＣ／ＭＳ試験により、Ａｂ－ｍｃＭＭＡＦ結合体が単一のシステイン付加物の形態で毒素を放出することが報告されている。

【０５１３】

抗体薬物結合体の結合

５Ｆ９抗体薬物結合体の全てが、２９３－ＧＣＣ＃２細胞に同等に良好に結合した。表１０に、２９３－ＧＣＣ＃２細胞の濃度を増加させたときの５Ｆ９結合体の平均蛍光強度が示されている。他の試験により、５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４結合体は２９３－ＧＣＣ＃２細胞に濃度依存的に結合したが、２０９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４抗体は結合しなかったことが決定された。

【０５１４】

表１３．２９３ＧＣＣ＃２細胞における５Ｆ９および５Ｆ９結合体の結合アッセイからのＭＦＩのチャート：

【０５１５】

【表１３】

	5F9 **または** 5F9 **結合体の** μg/ml					
	0.001	0.004	0.016	0.063	0.25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

５Ｆ９－アウリスタチン毒素結合体を、ＧＣＣ核酸でトランスフェクトし、ＧＣＣの発現について選択した種々の細胞の直接的な細胞傷害性アッセイにおいて試験した。ＧＣＣの表面発現のレベルを調査することにより、２９３ＧＣＣ＃２細胞は高量のＧＣＣを発現し；ＨＴ２９＃２およびＣＴ２６＃２．５細胞はＧＣＣを中～低レベルで発現し；ＣＴ２６＃３２細胞はＧＣＣを高レベルで発現し；ＨＴ２９ＧＣＣ＃５およびＨＴ２９ＧＣＣ＃１８は低量のＧＣＣを発現することが見いだされた。表１１に、標的発現細胞における、または野生型細胞またはベクター対照細胞における、３種のアウリスタチン結合体の細胞傷害性データをもたらす複数の試験を編集したものが示されている。標的増強性死滅（ｔａｒｇｅｔ　ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｋｉｌｌｉｎｇ）が、２９３ＧＣＣ＃２細胞に対する５Ｆ９と結合体化させた毒素の全ての事例において観察され、そこではＭＭＡＦ対ＭＭＡＥを使用した場合に治療域がはるかに増加する。ＭＭＡＦの切断可能な形態および切断不可能な形態の両方も同様に強力であった。陰性対照として、無関係の標的に対して得られるヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体であり、ＧＣＣに対する反応性がないｓｃ２０９抗体を用いた抗体薬物結合体も作製した。２０９　ＡＤＣ対５Ｆ９　ｖｃＭＭＡＦ　ＡＤＣを用いた直接的な細胞傷害性アッセイにより、２９３細胞モデルおよびＨＴ２９細胞モデルにおいて、標的増強性細胞死滅（ｔａｒｇｅｔ　ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｃｅｌｌ　ｋｉｌｌ）が示された。細胞系の中で５Ｆ９と結合体化させた毒素の活性を比較することにより、細胞傷害性のレベルが、その細胞が発現しているＧＣＣの量といくらかの相関を有することが示される。これらのデータは、最大量のＧＣＣを発現する細胞系の少なくとも一部が、少量のＧＣＣを発現する細胞よりも上記結合体の細胞傷害性活性を受けやすかったことを示唆している。細胞当たりの相対的なＧＣＣ数については実施例１を参照されたい。細胞傷害性レベルの差における別の因子は、野生型の細胞系の中で変動し得る上記結合体の内部移行または細胞内プロセシングにおける差であり得る。

【０５１６】
表１４．抗ＧＣＣアウリスタチンＡＤＣの細胞傷害性。
【０５１７】
【表１４－１】

	5F9 結合体の LD 50 (nM)			209結合体の LD50 (nM)
細胞系	**vcMMAE**	**vcMMAF**	**mcMMAF**	
293ベクター	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0.37	0.001	0.002	
293ベクター	1.8	>10	>10	
293 GCC # 2	0.13	0.005	0.007	

【０５１８】
【表１４－２】

293ベクター		>10		>10
293 GCC # 2		0.0004		>10
HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24.1	0.127	3.1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2.5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0.004	0.064	
HT 29ベクター	520.6	> 10,000	> 10,000	
HT 29 GCC #5	653.5	563.2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554.6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0.93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0.59	0.32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC#5		0.035		>10

これらの効力がｉｎ　ｖｉｖｏに移された場合、ｍｃとｖｃＭＭＡＦの間の同等の効力

で、ｍｃＭＭＡＦについて予測されるＭＴＤが高くなり、この結合体についてより大きな治療域が示唆される。

【０５１９】

メイタンシン

５Ｆ９－メイタンシンＡＤＣは、２９３－ＧＣＣ＃２細胞において強力な標的増強性死滅を示した（表１２）。興味深いことに、５Ｆ９－メイタンシン結合体がどちらも、２９３モデルにおいて標的増強性死滅を示したが、ＨＴ２９モデルでは標的増強性死滅は観察されず、メイタンシン結合体をｉｎ　ｖｉｖｏで評価するためのこのモデルの有用性に対する懸念が生じた。さらに、この差の根拠は、容易に説明することはできないが、細胞内の結合体の内部移行またはプロセシングにおける種々の受容体の密度および／または差に起因する可能性がある。陰性対照として、無関係の標的に対するヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体であり、ＧＣＣに対して反応性を有さないｓｃ２０９抗体を用いた抗体薬物結合体も作製した。２０９　ＡＤＣ対５Ｆ９　ＡＤＣを用いた直接的な細胞傷害性アッセイにより、全ての５Ｆ９結合体に関して２９３細胞モデルにおける標的増強性細胞死滅が示される。ＨＴ２９細胞モデルでは、５Ｆ９－ＤＭｘ結合体および２０９－ＤＭｘ結合体はこれらの細胞を同等に良好に死滅させ、これは、これらの細胞における非標的特異的な死滅機構を示している。

【０５２０】

表１５　抗ＧＣＣメイタンシンＡＤＣの細胞傷害性

【０５２１】

【表１５】

	LD50 (nM)			
細胞系	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 **ベクター**	25.3		10.4	
293 GCC#2	<0.004		<0.004	
293 **ベクター**	32	11	13	7.4
293 GCC#2	<0.000004	6.7	<0.000004	4.8
HT29	22.4		7.7	
HT29 GCC#5	20.8		9.1	
HT29	22	12	4.8	2.1
HT29 GCC#5	30	22	5.8	4.2

（実施例３）

ｉｎ　ｖｉｖｏ評価

腫瘍モデル：

５Ｆ９　ＡＤＣのｉｎ　ｖｉｖｏ細胞傷害性を、マウス異種移植片モデルにおいて評価した。最初のｉｎ　ｖｉｖｏでの研究は、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５細胞系およびＨＴ２９－ＧＣＣ＃１８細胞系を用いて行った。２９３－ＧＣＣ＃２細胞系も、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける成長について試験し、段階的に移植可能なトロカールモデルとして開発した。

【０５２２】

異種移植片モデルにおけるＧＣＣの発現レベルが、転移性結腸がんの患者におけるＧＣＣの発現レベルと関連性があるかどうかという疑問に取り組むために、ＧＣＣの発現レベルを異種移植片組織、ヒトの原発性結腸腫瘍および転移をＩＨＣ分析することによって比較した。新鮮な凍結させた細胞系および組織のパネルを、ＧＣＣ　３Ｇ１に対するマウスｍＡｂを用いたｒＩＨＣによるＧＣＣの定量に利用した。ＩＨＣ定量のために、スコア化を、半定量的０～３スコア化システムを使用して行った。腫瘍モデルのＧＣＣレベル≦臨床のＧＣＣレベルである場合、モデリングは、正確である、または臨床で必要とされる曝露が過大評価される可能性がある。腫瘍モデルのＧＣＣレベル＞臨床のＧＣＣレベルである場合、モデリングは、臨床で必要とされる曝露を過小評価し得る。

【０５２３】

転移性の試料におけるＧＣＣの発現にいくらかの変動性があったが、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５細胞およびＨＴ２９－ＧＣＣ＃１８細胞による発現は、転移性の試料の多くの範囲内であった。ＩＨＣから、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５細胞およびＨＴ２９－ＧＣＣ＃１８細胞のＧＣＣの染色は転移性細胞のＧＣＣの染色と等量またはそれより低かった。このデータは、本発明者らの腫瘍モデルが、ｍｅｔＣＲＣの臨床試料に見られるレベルに匹敵するレベルでＧＣＣを発現することを示唆している。

【０５２４】

表１６に、１９２時間の時点で回収したさまざまな組織についてのシンチレーション計数が、示した３匹の動物の平均で示されている。５Ｆ９は、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍対ＨＴ２９－ベクター腫瘍に優先的に集積したが、２０９はあまり特質的な集積を示さなかった。この結果により、５Ｆ９抗体薬物結合体が、ＧＣＣを発現している腫瘍に集積することを予測し得ることが支持された。評価した全ての他の組織では、５Ｆ９対ｍＡｂ　２０９抗体の集積のレベルにはほとんど差がなかった。

【０５２５】

ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍担持マウスおよびＨＴ２９－ベクター腫瘍担持マウスにおける放射標識した５Ｆ９のｉｎ　ｖｉｖｏ分布

腫瘍担持マウスにおいて、抗ＧＣＣ抗体５Ｆ９と陰性対照抗体ｓｃ２０９（無関係の細胞表面標的をターゲティングするヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体）の腫瘍ターゲティングおよびｉｎ　ｖｉｖｏ生体分布を評価するために放射性イメージング試験を実施した。抗体を、ＤＴＰＡを二官能性キレート化剤として使用して^{111}Ｉｎで放射標識した。腫瘍ターゲティングおよび正常組織における経時的な生体分布を含めたｉｎ　ｖｉｖｏにおける挙動を、ＧＣＣ（－）およびＧＣＣ（＋）腫瘍の両方を有するマウス二重腫瘍モデルを用いて調査した。ｉｎ　ｖｉｖｏ画像（ＳＰＥＣＴ／ＣＴ）を獲得し、空間分解を補うために、組織放射能計数法を使用した。

【０５２６】

ヌードマウスにおいて、右側にＨＴ２９－ベクター腫瘍、左側にＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍を用いて皮下腫瘍を成長させた。動物当たり０．３ｍＣｉ＝１５μｇの抗体を投薬した。１群当たり動物は３匹であり、群から１ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、１２０ｈおよび１９２ｈにおいて収集した。

【０５２７】

１９２ｈにおける群の動物からの組織の調査により、５Ｆ９および２０９がどちらも同程度に大部分の正常組織（例えば、血液、心臓、胃、小腸、大腸、筋肉および皮膚）およびＨＴ２９－ベクター対照腫瘍に集積することが示された。Ａｂ２０９は肝臓に５Ｆ９よりもわずかに高いレベルで集積し、５Ｆ９は肺、脾臓および腎臓に２０９よりもわずかに高いレベルで集積した。ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍では、５Ｆ９が２０９のレベルよりも２倍超高いレベルで優先的に集積した。この結果により、５Ｆ９抗体薬物結合体がＧＣＣ発現腫瘍に集積することを予測できることが支持された。

【０５２８】

腫瘍への抗体集積のカイネティクスを理解するために、試験全体を通して全ての時点について各抗体についての腫瘍データを得た。５Ｆ９抗体の集積を示した唯一の組織はＧＣ

Ｃ発現腫瘍である。他の全ての組織における放射能レベルは比較的平らなままであり、５Ｆ９のレベルと２０９のレベルとの間に殆ど差はなかった。５Ｆ９はＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍に優先的に集積したが、２０９は少しも集積を示さなかった。この結果により、５Ｆ９抗体薬物結合体がＧＣＣを発現している腫瘍に集積することを予測し得ることが支持された。

【０５２９】

表１６．ＧＣＣを発現している腫瘍に^{111}Ｉｎ標識したＧＣＣ特異的モノクローナル抗体は集積するが対照モノクローナル抗体は集積しない。

【０５３０】

【表１６】

	平均 % ID 5F9	平均 % ID 対照 IgG
1時間	2.816+/-0.133	2.494+/-0.167
24時間	3.057+/-0.107	3.010+/-0.630
72時間	4.485+/-1.029	3.564+/-0.152
120時間	5.162+/-1.012	3.412+/-0.048
192時間	6.550+/-1.015	2.782+/-0.085

ＧＣＣを発現している腫瘍における７日間にわたる放射標識した５Ｆ９の集積により、週１回の投薬スケジュールが支持された。

【０５３１】

ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５ｓ．ｃ．腫瘍における試験的な効力試験

有効な結合体および投薬レジメンを決定するために、ＨＴ２９－ＧＣＣ＃５腫瘍担持マウスにおいて試験を実施した。マウスに、単回用量または複数回の用量を投薬した。これらの試験により、高レベルの毒素結合体（例えば、ｑ３ｄ×５スケジュールにおいて１５０μｇ／ｋｇの５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦ）であまりに高頻度に投薬すると毒性があることが判明した。別の試験により、ｑ１４ｄ×５スケジュールは、このモデルにおいては余りにも頻度が少ないため、いくつかの毒素結合体が対照と比較して有意な効力を示すことができないことが判明した。さらに、このモデルにおけるメイタンシノイド－抗体結合体を用いたＰＤ試験により、用量依存的なホスホヒストン（ｐｈｏｓｐｈｏｈｉｓｔｏｎｅ）集積がＤＭ４毒素のみに伴い、ＤＭ１毒素には伴わないことが実証された。このモデルにおける別の試験により、いくつかの腫瘍の成長が非特異的な２０９－毒素結合体によって阻害されることが示された。これらの結果により、他のｉｎ　ｖｉｖｏモデルを評価することが必要であることが示唆された。

【０５３２】

２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍担持マウスにおける５Ｆ９　ＡＤＣを用いたＰＫ／ＰＤ試験。

【０５３３】

代替の腫瘍モデルでは２９３－ＧＣＣ＃２細胞を使用した。２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍担持マウスにおける５Ｆ９　ＡＤＣについてのＰＤ試験を実施した。マウスに、単回用量の５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦを７５μｇ／ｋｇまたは１５０μｇ／ｋｇで投薬し、毒素の、腫瘍細胞に対する抗有糸分裂効果を試験するために、ホスホヒストンＨ３をＰＤ解析するための血清を１時間～４日間の時点で取得した。ホスホヒストンＨ３を腫瘍のパラフィン包埋切片の抗体（Ｕｐｓｔａｔｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ｎｏｗ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）染色によって検出した。表１７のデータにより、ＡＤＣのそれぞれが、腫瘍におけるｐＨ３陽性細胞集団において有意な増加を引き起こしたことが示され、このことは、ＡＤＣのそれぞれが７５μｇ／ｋｇ毒素投与量相当量および１５０μｇ／ｋｇ毒素投与量相当量のどちらでも腫瘍に到達することができ、そしてそれらが腫

瘍細胞に対して所望の抗有糸分裂効果を有していることを示している。

【０５３４】

表１７．５Ｆ９　ＡＤＣの単回ｉｖ投与後の有糸分裂における細胞の停止によって評価したＰＤ反応（ｐＨ３陽性腫瘍細胞の％）。

【０５３５】

【表１７－１】

	pH3陽性腫瘍細胞の平均%	SD
ビヒクル対照	2.556801	2.37707
5F9-vcMMAE 75 μg/kg 1時間	4.525187	0.178882
4時間	2.551616	1.688255
8時間	4.243988	0.352938
24時間	9.8199	4.82057
48時間	8.692061	4.756786
96時間	8.628345	1.065456
5F9-vcMMAE 150 μg/kg1時間	3.334943	1.351667
4時間	2.78543	1.690216
8時間	4.575611	1.130484
24時間	13.78776	3.343155

【０５３６】

【表１７－２】

48時間	14.26067	5.448921
96時間	14.67942	1.827724
5F9-vcMMAF 75 μg/kg 1時間	4.235245	0.617585
4時間	4.18364	0.846752
8時間	4.930098	0.54746
24時間	20.22484	2.453935
48時間	9.920771	3.788795
96時間	10.38187	1.896461
5F9-vcMMAF 150 μg/kg 1時間	3.465674	1.341187
4時間	4.416646	0.807636
8時間	8.594385	4.005021
24時間	21.53718	7.25212
48時間	15.15814	4.28407
96時間	11.12288	2.150476
5F9-mcMMAF 75 μg/kg 1時間	5.365582	1.14198
4時間	4.044478	0.992449
8時間	8.228597	3.098222
24時間	14.10734	1.611093

【０５３７】

【表１７－３】

48時間	19.37223	8.146504
96時間	7.749388	1.180759
5F9-mcMMAF 150 μg/kg 1時間	3.212482	0.509604
4時間	4.722554	1.577531
8時間	9.105349	5.963128
24時間	27.51416	10.96057
48時間	13.34043	3.414961
96時間	15.60917	3.386154

同様の試験により、５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦ、５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４および５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１で処置した、２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍担持マウスにおけるホスホヒストンレベルを測定した。マウスに、１５０μｇ／ｋｇの単回用量を投薬し、全抗体および毒素と結合体化させた抗体の両方をＰＫ解析するために、血清を１時間～２１日間の時点で取得した。２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍におけるホスホヒストンＨ３陽性細胞の百分率は３種のＡＤＣ：５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦ、５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１および５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４の全てに応答して増加した。最大のホスホヒストンＨ３レベルは、ベースラインよりも３～５倍増加し、ピークは注射の２４時間後であった。

【０５３８】

５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦおよび５Ｆ９－ＤＭｘを用いた２９３－ＧＣＣ＃２ｓ．ｃ．腫瘍における効力試験

５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１および５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦを、２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍モデルにおける効力について、ｑ１４ｄ×５スケジュールにおいて２つの投与量（７５μｇ／ｋｇおよび１５０μｇ／ｋｇの毒素）で試験した。具体的には、この試験には、ビヒクルで処置した対照、Ｓｃ２０９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、Ｓｃ２０９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、Ｓｃ２０９－ｖｃＭＭＡＦ（１５０μｇ／ｋｇのＭＭＡＦ相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（７５μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、５Ｆ９－ＤＭ４（７５μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＦ（１５０μｇ／ｋｇのＭＭＡＦ相当量）、および５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＦ（７５μｇ／ｋｇのＭＭＡＦ相当量）を含めた。２９３－ＧＣＣ＃２細胞を担持する雌のタコニック（Ｔａｃｏｎｉｃ）マウス（１群当たり１０匹のマウス）を使用した。

【０５３９】

図１は、５Ｆ９ｖｃ－ＭＭＡＦ、５Ｆ９ｖｃ－ＤＭ１、および５Ｆ９ｖｃ－ＤＭ４を用いてｑ１４ｄスケジュールで処置した、２９３－ＧＣＣ＃２を担持するＳＣＩＤマウスに

おける腫瘍の成長を示す。２９３－ＧＣＣ＃２モデルにおいて５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４で用量依存的な効力が観察されたのに対して、２０９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４対照には影響がなかった。５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１も効果的であったが、１５０μｇ／ｋｇの５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４ほどではなかった。５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦ（７５μｇ／ｋｇおよび１５０μｇ／ｋｇ）が最も効果的であったが、２０９ｖｃＭＭＡＦもいくらかの活性を有した。したがって、これらの投与量およびスケジュールにおいて、５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４がその対照結合体から最大の効果の差を有した。

【０５４０】

５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦおよび５Ｆ９－ＤＭｘを用いた２９３－ＧＣＣ＃２ｓ．ｃ．腫瘍における効力試験

５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４および５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１を、２９３－ＧＣＣ＃２腫瘍モデルにおける効力について、ｑ７ｄ×５スケジュールにおいて２つの投与量（７５μｇ／ｋｇおよび１５０μｇ／ｋｇの毒素）で試験した。具体的には、この試験には、ビヒクルで処置した対照、５Ｆ９単独（１５ｍｇ／ｋｇ）、ＤＭ１（３００μｇ／ｋｇ）、ＤＭ４（３００μｇ／ｋｇ）、Ｓｃ２０９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、Ｓｃ２０９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、Ｓｃ２０９－ｖｃＭＭＡＦ（１５０μｇ／ｋｇのＭＭＡＦ相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（７５μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、および５Ｆ９－ＤＭ４（７５μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）を含めた。２９３－ＧＣＣ＃２細胞を担持する雌のタコニックマウス（１群当たり１０匹のマウス）を使用した。

【０５４１】

アウリスタチン結合体を用いた２９３ＧＣＣ＃２腫瘍における効力試験

５Ｆ９のｖｃＭＭＡＥとの、ｖｃＭＭＡＦとの、またはｍｃＭＭＡＦとの結合体を用い、これらの毒素の２０９との結合体との比較において、または遊離の毒素またはビヒクル対照との比較において、３種の投与量で２９３ＧＣＣ＃２腫瘍担持ＳＣＩＤマウスを処置した。投与量をｑ７ｄ×４スケジュールにおいてｉｖで投与した。３日目、７日目、１０日目、１３日目および１７日目に腫瘍を収集した。対照試薬で処置したマウスにおける腫瘍により、連続的な体積の増加が実証された。５Ｆ９アウリスタチン結合体で処置した腫瘍は、この腫瘍の成長の用量および時間依存性の阻害を示した。表１８に結果の概要を提供する（ＴＧＩ＝腫瘍の成長阻害、Ｔ／Ｃ＝処置／対照、ＴＧＤ＝腫瘍の成長の遅延、ＣＲ／ＰＲ＝完全奏効／部分奏効；ｐ値＝統計的有意を判定するための尺度、ＮＳ＝有意でない）。

表１８．２９３ＧＣＣ＃２腫瘍担持マウスにおけるアウリスタチンＡＤＣの分析。

【０５４２】

【表１８】

群	TGI	T/C	TGD	CR/PR	P値
209-vcMMAE 300 μg/kg	24.5	0.76	0.9	0	0.38>0.05 NS
209-vcMMAF 150 μg/kg	29.4	0.71	1.4	0	0.27>0.05 NS
209-mcMMAE 150 μg/kg	36.5	0.63	1.4	0	0.15>0.05 NS
遊離 MMAE 300 μg/kg	35.6	0.64	2	0	0.18>0.05 NS
遊離 ncMMAF 150 μg/kg	-3.4	1.03	-1.3	0	0.73>0.05 NS
5F9-vcMMAE 300 μg/kg	96.9	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 150 μg/kg	83.5	0.17		2/10 PR	<0.01
5F9-vcMMAF 150 μg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 150 μg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 75 μg/kg	54.5	0.45	4.4		0.01<p<0.05
5F9-vcMMAF 75 μg/kg	88.5	0.12		6/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 75 μg/kg	87.5	0.13		7/10 PR	=0.001
5F9-vcMMAF 37.5 μg/kg	65.2	0.35	7.1		=0.01
5F9-mcMMAF 37.5 μg/kg	63.6	0.36	5.8		=0.01

これらのＡＤＣ３種全てが２９３ＧＣＣ＃２モデルにおいてｑ７ｄスケジュールで有効であった。５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＦおよび５Ｆ９－ｍｃＭＭＡＦは５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥよりも強力であり、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ＰＤ（ｐＨｉｓＨ３）およびｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞傷害性データと相関する。

【０５４３】

５Ｆ９ｖｃＭＭＡＦおよび５Ｆ９－ＤＭｘを用いたＴ８４　ｓ．ｃ．腫瘍における効力試験

５Ｆ９－ＳＰＤＢ－ＤＭ４および５Ｆ９－ＳＭＣＣ－ＤＭ１を、Ｔ８４腫瘍モデルにおける効力について、ｑ７ｄ×５スケジュールにおいて２つの投与量（７５μｇ／ｋｇおよび１５０μｇ／ｋｇの毒素）で試験した。具体的には、この試験には、ビヒクルで処置した対照、５Ｆ９単独（１５ｍｇ／ｋｇ）、ＤＭ１（３００μｇ／ｋｇ）、ＤＭ４（３００μｇ／ｋｇ）、Ｓｃ２０９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、Ｓｃ２０９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、Ｓｃ２０９－ｖｃＭＭＡＦ（１５０μｇ／ｋｇのＭＭＡＦ相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ１（７５μｇ／ｋｇのＤＭ１相当量）、５Ｆ９－ＤＭ４（１５０μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）、および５Ｆ９－ＤＭ４（７５μｇ／ｋｇのＤＭ４相当量）を含めた。Ｔ８４細胞を担持する雌のタコニックマウス（１群当たり１０匹のマウス）を使用した。

【０５４４】

免疫組織化学検査

生検材料および異種移植片などの組織におけるＧＣＣの相対的な量の検出および測定を免疫組織化学検査によって実施することができる。凍結させた組織切片をアセトンとメタノールの１：１溶液に室温で２０分間に固定する。スライドを１×ＰＢＳ中で５分間洗浄する。スライドを、Ｖｅｎｔａｎａ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＸＴ自動染色器（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｔｕｃｓｏｎ、ＡＺ）などの自動染色デバイスで、製造者が推奨している反応緩衝液を使用して処理する。抗ＧＣＣ抗体を５％ヤギ血清中で５μｇ／ｍｌに希釈する。ヒト抗ＧＣＣ抗体、例えば、５Ｆ９について、検出二次抗体は、ヤギ抗ヒトビオチン化抗体のＤａｋｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　ｂｌｏｋ（Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）中１：５００溶液である。自動染色器処理による抗体反応の後、スライドを自動染色器から取り出し、反応緩衝液中ですすぎ、キシレンまでの標準系列によって脱水し、カバーガラスにキシレンベースの封入剤処理をほどこす。

【０５４５】

一次性腫瘍モデルにおけるＡＤＣの効力試験

原発性の結腸直腸癌および胃がんのモデルをマウスにおける皮下腫瘍として成長させる。５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥ　ＡＤＣおよび５Ｆ９－ｍｃＭＭＡＦ　ＡＤＣをＰＨＴＸ－１１ｃ一次性腫瘍担持マウスにおいて試験する。投与量をｑ７ｄ×４スケジュールにおいてｉｖで投与する。毒素と２０９の結合体を対照マウスに投与する。

【０５４６】

一次性腫瘍モデルにおけるＡＤＣの抗腫瘍活性

ＰＨＴＸ－９ｃ原発性ヒト結腸腫瘍異種移植マウスにおける、さまざまな投与量および投薬スケジュールでの５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を決定するため、ならびに５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥの遊離毒素ＭＭＡＥに対する抗腫瘍活性および非免疫ｖｃＭＭＡＥ抗体毒素結合体（２０９－ｖｃＭＭＡＥ）に対する抗腫瘍活性を比較するため、ならびに処置後の再成長のカイネティクスを決定するために、２つの同様の試験を行った。雌のＣＢ－１７　ＳＣＩＤマウス（８週齢）の側腹部にＰＨＴＸ－９ｃ腫瘍断片（２ｍｍ×２ｍｍ）を皮下（ＳＣ）接種した。腫瘍の成長を、週２回ノギスを使用してモニターし、平均腫瘍体積を、式（０．５×［長さ×幅^2］）を使用して算出した。平均腫瘍体積がおよそ１５０ｍｍ^3（試験Ａ）または１６０ｍｍ^3（試験Ｂ）に到達したとき、動物を処置群に無作為に分けた（試験Ａについてはｎ＝群当たり１０匹、試験Ｂについてはｎ＝群当たり９匹）。

【０５４７】

マウスを０．９３８ｍｇ／ｋｇ、１．８７５ｍｇ／ｋｇ、３．７５ｍｇ／ｋｇ、もしくは７．５ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥを用いて週１回の（ＱＷ）投薬スケジュール（３投与量）で静脈内に（ＩＶ）２０日間、またはビヒクル（０．９％食塩水）、０．０７５ｍｇ／ｋｇもしくは０．１５ｍｇ／ｋｇのＭＭＡＥ　ＩＶを含む対照を用いてＱＷスケジュールで、または１．８７５ｍｇ／ｋｇもしくは３．７５ｍｇ／ｋｇの２０９－ｖｃＭＭＡＥ　ＩＶを用いてＱＷ投薬スケジュールで２０日間処置した（試験Ａ）。第２の試験（試験Ｂ）では、マウスを、０．９３８ｍｇ／ｋｇ、１．８７５ｍｇ／ｋｇ、３．７５ｍｇ／ｋｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、もしくは１０．０ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥ　ＩＶを用いてＱＷスケジュール（３投与量）で、または３．７５ｍｇ／ｋｇのＩＶを週２回の（ＢＩＷ）スケジュール（６投与量）で、またはビヒクル、７．５ｍｇ／ｋｇもしくは１０ｍｇ／ｋｇの２０９－ｖｃＭＭＡＥを含む対照で、または０．１３５ｍｇ／ｋｇもしくは０．１８ｍｇ／ｋｇのＭＭＡＥのＱＷスケジュールでのＩＶ投与で、２０日間処置した。投与量（複数）は、ＱＷスケジュールについては１日目、８日目、および１５日目に、ならびにＢＩＷスケジュールについては１日目、４日目、８日目、１１日目、１５日目、および１８日目に投与した。免疫結合体の用量におけるＭＭＡＥの量を釣り合わせるために、以下の理論的根拠によって遊離のＭＭＡＥの用量を算出した：ＭＭＡＥの相当する用量は、ＭＬＮ０２６４用量の１．８％である。相当する用量のリンカー＋ＭＭＡＥは５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥの用量の４％である。これらの算出は、抗体当たり平均３．９のＭＭＡＥ分子および遊離の抗体の分子量１５０ｋＤに基づく。実際抗体の分子量は、グリコ

シル化の程度によってわずかに変わる。

【０５４８】

腫瘍体積および体重を週２回測定し、腫瘍の成長の遅延（ＴＧＤ）によって証明されるように再成長のカイネティクスを測定するために処置期間を超えて継続した。腫瘍体積の測定を腫瘍体積が処置群内の単一のマウスにおいて体重の１０％に到達するまで継続し、その時点でその群については終了した。腫瘍の成長阻害（ＴＧＩ）の百分率（［対照群の平均腫瘍体積－処置群の平均腫瘍体積］／対照群の平均腫瘍体積；Ｔ／Ｃ比）を２０日目に決定した。処置群すべてにわたるＴ／Ｃ比を、ウエルチの両側ｔ検定を使用して対照群のＴ／Ｃ比と比較した。１つの腫瘍がサイズの限度に到達した（およそ１０００ｍｍ^3）場合に全部の群について終了したので、平均再成長が遅かった群についてはＴＧＤを算出することができなかった。

【０５４９】

処置群の対間の経時的な腫瘍の成長の傾向における差を、線形混合効果回帰モデルを使用して評価した。これらのモデルから、各動物を複数の時点で測定したという事実が明らかとなる。各々の比較のために別個のモデルをフィッティングさせ、各処置群についての曲線下面積（ＡＵＣ）を、モデルからの予測値を使用して算出した。次いで、参照群と比較したＡＵＣにおけるパーセント減少（ｄＡＵＣ）を算出した。統計的に有意なＰ値（＜０．０５）は、２つの処置群についての経時的な傾向が異なったことを示唆している。結果が以下の表１９および２０に要約されている。

【０５５０】

どちらの試験においても５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥ－処置群の全てで抗腫瘍活性が観察され、その効果が用量依存的であることが示された。２つの試験の結果は同程度であった。ＱＷスケジュールにおいて０．９３８ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥを用いてＩＶで処置したマウスでは、ビヒクル群での処置と比較してＴＧＩは２０．７～２１．４％であり、Ｐ値は＜０．０５であった。ＱＷスケジュールにおいて１．８７５ｍｇ／ｋｇをＩＶ投与した処置群では、ＴＧＩは４１．３～４４．７％であり、Ｐ値は＜０．００１であった。３．７５ｍｇ／ｋｇをＱＷスケジュールでＩＶ投与した処置群では、ビヒクル群での処置と比較してＴＧＩは６５．３～６５．７％（ｐ＜０．００１）であった。７．５ｍｇ／ｋｇをＩＶ　ＱＷで投与した５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥでは、８４．１～８４．３％のＴＧＩがもたらされ（ｐ＜０．００１）、１０ｍｇ／ｋｇのＩＶ　ＱＷ（試験Ｂのみ）では、９１．２％のＴＧＩがもたらされた（ｐ＜０．００１）。３．７５ｍｇ／ｋｇをＢＩＷスケジュール（Ｓ）でＩＶ投与した場合、有意な阻害が観察され、ＴＧＩは８４．９％であった（ｐ＜０．００１）。

【０５５１】

７．５ｍｇ／ｋｇおよび１０．０ｍｇ／ｋｇの高投与量の２０９－ｖｃＭＭＡＥにおいて、それぞれ３５．７％および４５．４％のＴＧＩ（ｐ＜０．００１）を伴って中程度の抗腫瘍活性が観察されたが、低投与量の２０９－ｖｃＭＭＡＥ（１．８７５ｍｇ／ｋｇおよび３．７５ｍｇ／ｋｇ）では阻害を示さなかった（ｐ＞０．０５）。高い２０９－ｖｃＭＭＡＥによって観察された抗腫瘍活性は、おそらく免疫結合体のＭＭＡＥ部分による非特異的な活性に起因する。

【０５５２】

遊離の毒素ＭＭＡＥを投与することにより、混合した結果がもたらされた：０．０７５ｍｇ／ｋｇ、０．１３５ｍｇ／ｋｇ、および０．１５ｍｇ／ｋｇのＩＶ　ＱＷ投与では腫瘍の成長阻害はもたらされなかったが（ｐ＞０．０５）、０．１８ｍｇ／ｋｇのＩＶ　ＱＷ投与により、５０．４％のＴＧＩがもたらされた（ｐ＜０．００１）。

【０５５３】

治療期間に観察された最大の体重損失は、試験Ｂの、遊離の毒素０．１８ｍｇ／ｋｇのＭＭＡＥ群の７日目の２．３％および同じ試験の０．９３８ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９－ｖｃＭＭＡＥ群であった。これは、薬物が良好に耐容されたことを示す。

【０５５４】

腫瘍体積の測定は、治療期間を超えて、腫瘍体積が処置群内の単一のマウスで体重の１０％に到達するまで継続し、そこでその処置群については終了した。これらの試験では、腫瘍の再成長が用量依存的であることが明らかになった。

表１９．ＳＣＩＤマウスにおける一次性ヒト結腸腫瘍異種移植片の処置に関する試験Ａの結果。

【０５５５】

【表１９】

処置	投与量 (mg/kg)	投与方法/頻度	TGI	体重の変化（平均最大パーセント）	TGD（日数）/（または 最初の腫瘍が1000mm^{3}を超えるまでの日数）
ビヒクル	0	IV QW × 3用量	N/A	-0.2	0
209-vcMMAE	1.875	IV QW × 3用量	-2.0 (p>0.05)	8.3	0.6
209-vcMMAE	3.75	IV QW × 3用量	4.5 (p>0.05)	6.9	0.4
MMAE	0.075	IV QW × 3用量	5.0 (p>0.05)	8.3	1.0
MMAE	0.15	IV QW × 3用量	11.1 (p>0.05)	10.8	2.0
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3用量	21.4 (p>0.05)	9.0	3.3
5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3用量	44.7 (p>0.001)	10.6	8.2
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3用量	65.3 (p>0.001)	9.0	17.8
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3用量	84.1 (p>0.001)	7.5	(最初の腫瘍から58日間超)

表２０．ＳＣＩＤマウスにおける一次性ヒト結腸腫瘍異種移植片の処置に関する試験Ｂの結果。

【０５５６】

【表２０】

処置	投与量 (mg/kg)	投与方法/頻度	TGI	体重の変化（平均最大パーセント）	TGD (日数)/ (または 最初の腫瘍が1000mm^{3}を超えるまでの日数)
ビヒクル	0	IV QW × 3 用量	N/A	-1.8	0
209-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 用量	35.7 (p>0.001)	4.2	4.2
209-vcMMAE	10.0	IV QW × 3 用量	45.4 (p>0.001)	2.6	11.3
MMAE	0.135	IV QW × 3 用量	2.2 (p>0.05)	9.3	0.2
MMAE	0.18	IV QW × 3 用量	50.4 (p>0.001)	-2.3	8.6
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3 用量	20.7 (p>0.001)	-2.3	3.8
5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3 用量	41.3 (p>0.001)	5.6	6.6
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3 用量	65.7 (p>0.001)	-2.2	16
5F9-vcMMAE	3.75	IV BIW x 6 用量	84.9 (p>0.001)	-1.8	31.9
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 用量	84.3 (p>0.001)	6.5	(最初の腫瘍から47日間超)
5F9-vcMMAE	10.0	IV QW × 3 用量	91.2 (p>0.001)	7.2	(最初の腫瘍から56日間超)

裸の５Ｆ９抗ｈＧＣＣ抗体を用いたＣＴ２６　ｈＧＣＣ／ｌｕｃ＃３２播種性モデル（ｂａｌｂ／ｃマウス）における効力に関するパイロット試験

このモデルでは裸の抗体の、循環中のＧＣＣを発現している腫瘍細胞に結合する能力および新しい腫瘍の確立を妨げる能力を試験する。雌のｂａｌｂ／ｃマウスに、ＣＴ２６　ｈＧＣＣ／ｌｕｃ＃３２細胞をマウス当たり１×１０^{5}個およびマウス当たり５×１０^{5}個でｉ．ｖ．によって接種した。ビヒクルである０．９％のＮａＣｌおよび非特異的な抗体（裸の２０９）を、裸の５Ｆ９の投与と比較するために対照群に投与した。どちらの抗体も、ＩｇＧ１アイソタイプを有するように操作され（ｐＬＫＴＯＫ５８ベクターに）、したがってそれらのＦｃ領域は、細胞表面抗原（すなわち、５Ｆ９についてはＧＣＣ、および２０９については無関係の標的）に結合した後、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性反応を誘発することができた。接種する前日にｉ．ｖで投薬を開始し、投薬スケジュールは週１回ｉ．ｖ×４（ｑ７ｄ×４）であった。腫瘍の成長を、Ｘｅｎｏｇｅｎ画像処理システムによって週２回モニターした。体重および生存を同様に週２回モニターした。肺の重量およびＭＲＩ画像を含めた画像をこの試験の終わりに取得した。

【０５５７】

図２に示されている通り、どちらの５Ｆ９群（４０ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇ；マウス当たり１×１０^{5}個）も、効力を示す（接種後（ｐ．ｉ）３４日目：Ｔ／Ｃ（処置／対照）は０．０４～０．０５である）。ｐ．ｉ３４日目における５Ｆ９群についてのＴ／Ｃは２０９群と比較して０．１８～０．１４である。２０９の４０ｍｇ／ｋｇ群についてのＴ／Ｃは、０．９％のＮａＣｌ（ノーマルセーライン）群と比較して０．６４である。５Ｆ９の５×１０^{5}群では利益は認められなかった。

【０５５８】
この試験の終わりにおける各群の肺の重量を図３に示した。Ｔ検定：ビヒクル対２０９４０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．４；ビヒクル対５Ｆ９　４０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＜０．０５；ビヒクル対５Ｆ９　１０ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＜０．０１であった。肺の目視検査により、５Ｆ９－処置群における腫瘍小結節がビヒクルまたは２０９－処置群におけるものよりも少ないことが確認された。上記マウスのｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＭＲＩにより、ビヒクルで処置したマウスにおいて大量の肺腫瘍が周囲の組織への滲出（ｅｘｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ）および心臓変位（ｈｅａｒｔ　ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ）が示された。４０ｍｇ／ｋｇの５Ｆ９で処置したマウスでは、腫瘍の証拠はなく正常な肺の症状が認められた。

【０５５９】
生存曲線が図４に示されている。５Ｆ９処置群（１×１０^{5}）で生存における有意な増加が観察され、５Ｆ９の１０ｍｇ／ｋｇ群と４０ｍｇ／ｋｇ群との間に差はなかった。

【０５６０】
（実施例４）
抗体産生細胞系の生成
生産性が＞６００ｍｇ／Ｌである、５Ｆ９を発現する安定なＣＨＯ細胞系のクローンを生成するために、５Ｆ９のための発現ベクターを、軽鎖可変領域（配列番号１９）および重鎖可変領域（配列番号１７）を、ＷＴヒトＩｇＧ１　Ｆｃおよびネオマイシン耐性遺伝子を含有するｐＬＫＴＯＫ５８発現ベクターにサブクローニングすることによって生成した。５Ｆ９可変領域－ＩｇＧ１融合生成物の発現はＥＦ－１ａプロモーターの制御下である。

【０５６１】
抗ＧＣＣヒトモノクローナル抗体５Ｆ９可変領域のクローニングおよび配列決定
ヒトハイブリドーマ４６．５Ｆ９サブクローン８．２から全ＲＮＡを単離した（ＱｉａｇｅｎのＲＮｅａｓｙキット）。このハイブリドーマは、「標準の」公開されたカッパの軽鎖定常領域（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＷ３８３６２５、またはＢＭ９１８５３９）および「標準の」の公開されたＩｇＧ２の重鎖定常領域（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＢＸ６４０６２３、またはＡＪ２９４７３１）を有する。５’ｒａｃｅ－ｒｅａｄｙのポリＧ尾部をもつｃＤＮＡを従来の方法によって合成した（Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２巻、６２９～６３０頁（２００５年））。軽鎖可変領域を、５’ｒａｃｅによって、ポリＣアンカーオリゴをカッパ定常領域に特異的なリバースプライマーと組み合わせて使用してｃＤＮＡからＰＣＲ増幅した。重鎖可変領域を、ＩｇＧ２定常領域に特異的なリバースプライマーを公知の重鎖リーダー配列に特異的なフォワードプライマーと複数の組み合わせで用いて増幅した。ＰＣＲ産物をＴＯＰＯ（登録商標）クローニングし（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ．）、Ｍ１３ＦプライマーおよびＭ１３Ｒプライマーを用いて配列決定した。

【０５６２】
抗ＧＣＣヒトモノクローナル抗体５Ｆ９を担持する哺乳動物の発現ベクターの構築
５Ｆ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を担持する哺乳動物の発現ベクターを構築して産生ＣＨＯ細胞系を生成した。ネイティブな構築物については、５Ｆ９の軽鎖および重鎖の可変領域をｐＬＫＴＯＫ５８Ｄにサブクローニングした（米国特許出願第２００４００３３５６１号）。このベクターは、２種の哺乳動物の選択マーカー：ネオマイシン耐性およびＤＨＦＲ／メトトレキサート（増幅のために）を有する。ベクターにより、それぞれベクターのリーダー－カッパ定常領域およびリーダー－ＩｇＧ１（野生型Ｆｃ）定常領域の上流に位置するタンデムなＥＦ１アルファプロモーターから軽鎖および重鎖の両方が同時発現することが可能になる。サブクローニングするために、軽鎖および重鎖の可変領域を、配列が確認されたＴＯＰＯクローンから、ベクターのそれぞれのリーダー－カッパ領域およびリーダー－ＩｇＧ１領域の接合部に方向性クローニングのための独特の制限酵素認識部位を含有する遺伝子特異的プライマーを用いてＰＣＲ増幅した。プライマーの配列は、以下の通りである（５Ｆ９可変領域特異的配列は太字である）：

ネイティブな５Ｆ９軽鎖リーダー－可変プライマー：
フォワードＮｏｔＩ
【０５６３】
【化５５】

5’*ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA GCTACAGGTGTCCACTCC*GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-3’

(配列番号：234)

リバースＢｓｉＷＩ
【０５６４】
【化５６】

5’-*GCCACCGTACG*TTTGATTTCCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3’(配列番号:235)

ネイティブな５Ｆ９重鎖リーダー－可変プライマー
フォワードＥｃｏＲＩ
【０５６５】
【化５７】

5’ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT ACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3’(配列番号:236)

リバースＢｌｐｌ
【０５６６】
【化５８】

5’-GGAGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTGGTC-3’(配列番号:237)

クローンを、その軽鎖および重鎖の両方を二本鎖ＤＮＡ配列決定することによって確認した。
【０５６７】
２つのトランスフェクション方法：従来のＭＰＩプロセスおよびＣｒｕｃｅｌｌプロセスを使用して、構築物をＣＨＯ細胞に導入した。ＣＨＯ細胞のトランスフェクションを、ネイティブな５Ｆ９構築物を用いて、従来のＭＰＩプロセスを使用して開始した。電気穿孔またはＬｉｐｏｐｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００ＣＤトランスフェクションのいずれかとともに、線状化ＤＮＡおよび非線状化ＤＮＡを使用した。およそ３０の安定なプールを、Ｇ４１８、ヌクレオシドを含まない培地および５ｎＭのメトトレキサート中で選択することによって生成した。抗体産生レベルびついてのＦＭＡＴ解析に基づいて、３つの安定なプールを、クローニングするために選択した。産生量が最も多いプールは抗体を１２．２μｇ／ｍｌで分泌した。これらの３つのプールを十分に凍結させた。
【０５６８】
Ｃｒｕｃｅｌｌ　ＳＴＡＲ要素を評価して、ＳＴＡＲ要素を含有する５Ｆ９発現ベクターを作製することができる。
５Ｆ９／ｈＩｇＧ１重鎖ヌクレオチド配列は：
【０５６９】

【化５９】

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
ACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCC
TCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTC
TGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAAC
TTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG

(**配列番号**:230)

である。

５Ｆ９／ｈＩｇＧ１重鎖タンパク質配列は；

【０５７０】

【化６０】

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE
WIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

(**配列番号**:231)

である。

５Ｆ９／ｈＫａｐｐａ軽鎖ヌクレオチド配列は：

【０５７１】

【化６１】

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGT
CCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT
GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

(**配列番号**:232)

である。

５Ｆ９／ｈＫａｐｐａ軽鎖タンパク質配列は：

【０５７２】

【化６２】

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(**配列番号**:233)

である。

【０５７３】

以下に列挙されている５Ｆ９の重鎖および軽鎖の核酸配列をｐＴＯＫ５８Ｄベクターに挿入した：

【０５７４】

【化６３】

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatgacgcagtctccagccaccctgtctgt
ctccagg

ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccagg

ctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggaca

gagttcactctcaccatcggcagcctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtataaaacctggcctcg

gacgttcggccaagggaccaacgtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg

agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag

gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag

cagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct

cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag（**配列番号**:308）

【０５７５】
【化６４】

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagct

acaggtgtccactcccaggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaagccttcggagaccctgtccctcacctg

cgctgtctttggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagcccccagggaaggggctggagtggattg

gggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaag

aaccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgccgcggacacggctgtttattactgtgcgagagaacgtggatacac

ctatggtaactttgaccactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcc

ccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccg

gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactcta

ctccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccca

gcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaa

ctcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcac

atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg

ccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg

ctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa

agggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct

gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc

acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg

gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta

aataa **(配列番号**:309)

以下のＡｂｘ－２２９の重鎖および軽鎖の配列をコードする配列をｐＴＯＫ５８Ｄベクターに挿入した：
【０５７６】

【化６５】

atggagtttgggctgagctggctttttcttgtggctatt

ttaaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctc

ctgtgcagcctctggattcacctttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg

tctcaggtattagtgggagtggtggtaggacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat

tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatcgcga

ttttttggagtggtccatttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcgg

tcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc

gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagg

actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca

agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca

cctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctga

ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc

ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag

gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaa

agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc

tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac

aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca

gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc

cgggtaaataa （**配列番号**:310）

【０５７７】

【化６６】

atgaggctccctgctcagcttctc

ttcctcctgctactctggctcccagataccactggagaaatagtgatgacgccgtcttcagccaccctgtctgtgtctcc

aggggagagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagtagaaacttagcctggtaccagcagaaacctggcc

aggctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggtatcccagccaggttcagtggcagtgggtctggg

acagaattcactctcaccatcagcagcctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcaccagtatagtaactggat

gtgcagttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg

atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgg

aaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct

cagcagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctga

gctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag （**配列番号**:311）

本発明は、その実施形態を提供するために参考文献とともに示され、記載されているが、その形態および詳細において、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、さまざまな変更を行ってよいことが当業者には理解されよう。

【図１】

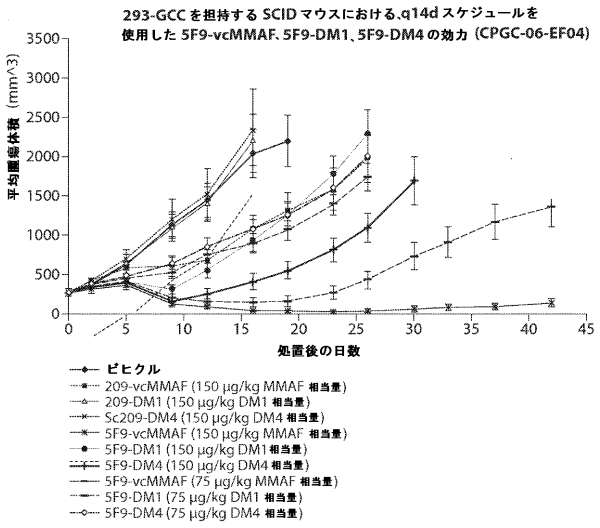


Fig. 1

【図２】

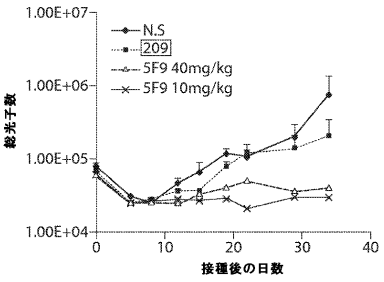


Fig. 2

【図３】

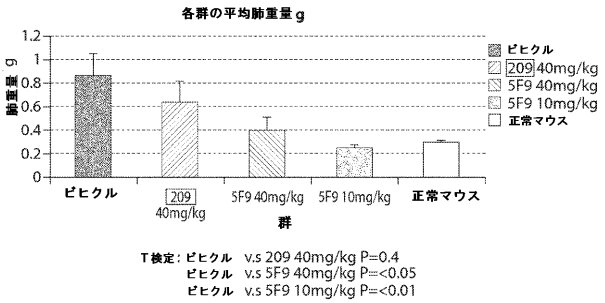


Fig. 3

【図４】

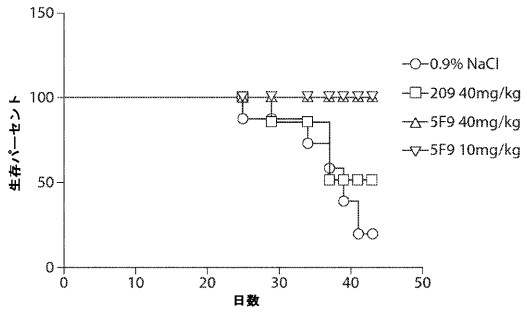


Fig. 4

【配列表】

2013507968000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/53686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395 (2010.01)
USPC - 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1
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)
USPC: 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPCL 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1; 424/134.1, 424/146.1 (text search)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, PGPB, JPAB); Google Scholar; GenCore Sequence Search (AA)
Search terms: Guanylyl Cyclase C (GCC; GUC2C; GUCY2C; STAR, ST Receptor); anti-GCC, immunoconjugate, auristatin, antibody 5F9, Ab 229, antibody 3G1, colon cancer; SEQ ID NOs: 2,4,18,20,46,48

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/0246071 A1 (GREEN et al) 2 November 2006 (02.11.2006). Especially SEQ ID NO: 567	1-5, 9-28
A	US 2003/0147809 A1 (GUDDAS) 7 August 2003 (07.08.2003). Especially SEQ ID NO: 6	1-5, 9-28
A	US 2003/0165496 A1 (BASI et al.) 4 September 2003 (04.09.2003). Especially SEQ ID NO: 9	1-5, 9-28
A	US 2009/0041717 A1 (MACDONALD et al.) 12 February 2009 (12.02.2009). Especially SEQ ID NO: 354	1-5, 9-28
A	US 2003/0099656 A1 (PATTI et al.) 29 May 2003 (29.05.2003). Especially SEQ ID NO: 12	1-5, 9-28
A	US 2009/0005257 A1 (JESPERS et al.) 1 January 2009 (01.01.2009). Esp. SEQ ID NO: 10	1-5, 9-28
A	US 2006/0024297 A1 (WOOD et al.) 2 February 2006 (02.02.2006).Especially SEQ ID NO: 664	6-8, 22 and 24-28
A	US 2008/0124345 A1 (ROTHE et al.) 29 May 2008 (29.05.2008) Especially SEQ ID NO: 289	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0031072 A1 (LA ROSA et al.) 12 February 2004 (12.02.2004). Especially SEQ ID NO: 271497	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0110933 A1 (RONDON et al.) 10 June 2004 (10.06.2004). Especially SEQ ID NO: 15.	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0081651 A1 (KARPUSAS) 29 April 2004 (29.04.2004). Especially SEQ ID NO: 1	6-8, 22 and 24-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
16 February 2011 (16.02.2011)	10 MAR 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/53686

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)
   - ☐ on paper
   - ☒ in electronic form

   b. (time)
   - ☐ in the international application as filed
   - ☒ together with the international application in electronic form
   - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.3 SEQ ID NOs: 2,4,18,20,46,48,58,60,62,64,66,68,106,108,110,112,114,116,190,192,194,196,198,200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/53686

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Group I: Claims 1-14 and 22-28, drawn to an anti-GCC antibody; an immunoconjugate, cell or vector comprising said anti-GCC antibody; and methods of using said anti-GCC antibody.
Group II: Claims 15-21 and 23, drawn to immunoconjugates.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the invention listed as Group I is a anti-GCC antibody. While the immunoconjugates set forth in Group II can comprise an anti-GCC antibody of Group I, it is readily apparent that the immunoconjugates of Group II can be conjugated to a variety of antibodies not limited by any special feature to the anti-GCC antibody of Group I. Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. With out a shared special technical feature, the inventions of Groups I and II lack unity of invention.
---please see exta 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 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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/53686

Continuation of:
Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Further, while both Group I and Group II share a 5F9 antibody, this special technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by the article entitled "Characterization of monoclonal antibodies to heat-labile enterotoxin encoded by a plasmid from a clinical isolate of Escherichia coli" by Belisle et al. (Infect Immun. 1984 March; 43(3): 1027-1032). Belisle teaches the 5F9 antibody (p 1028, right col, para 7). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード（参考）
	Ａ６１Ｐ	35/00	
	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

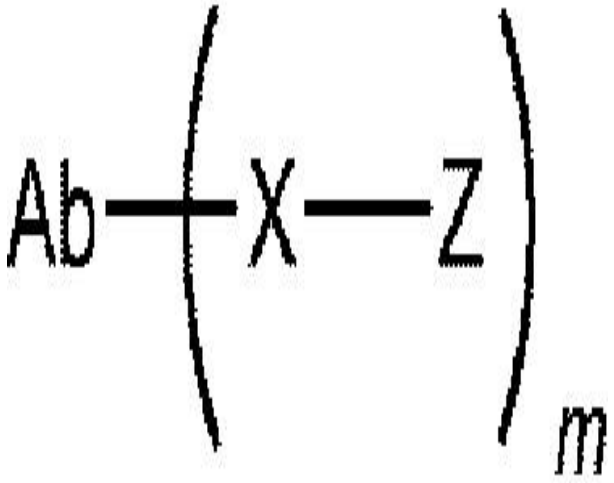
(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 ナム, サミュエル エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８３２, ハーバリル, ブライスデル ストリート ９２
(72)発明者 グリーンフィールド, エドワード エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ, ストートン, ポスカス ストリート １６０
(72)発明者 バブクック, ジョン
カナダ国 ブイ６アール ２アール２ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバ, ウエスト １２ティーエイチ アベニュー ４４８０
(72)発明者 オキーフ, セレッサ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５３, ウォーザン, リッチグレイン アベニュー ２０
(72)発明者 チン, シーチン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１, レキシントン, タフト アベニュー １４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA09 CA10 CA11 CA20 DA03 EA04 GA01
GA11 HA01 HA11
4C085 AA13 AA14 AA16 AA26 AA33 BB36 CC22 CC23
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	抗GCC分子和相关的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2013507968A	公开(公告)日	2013-03-07
申请号	JP2012535402	申请日	2010-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司 Amgen的不列颠哥伦比亚省		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司 Amgen的不列颠哥伦比亚省		
[标]发明人	ナムサミュエルエス グリーンフィールドエドワードエー バブクックジョン オキーフセレッサ チンシーチン		
发明人	ナム, サミュエル エス. グリーンフィールド, エドワード エー. バブクック, ジョン オキーフ, セレッサ チン, シーチン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61K47/6871 C07K16/30 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/77 C07K2317/92 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/395 A61K47/42 A61K49/14 A61K49/16 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/22 A61K39/39558 C07K2317/76 G01N33/573		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/AA33 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/254474 2009-10-23 US		
其他公开文献	JP2013507968A5 JP5925684B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了与GCC结合的抗体和与GCC结合的抗体的抗原结合片段。该抗体与GCC的细胞外结构域结合，可以内化。在一些实施方案中，抗体是人源化抗体，嵌合抗体或人抗体。还公开了编码抗体或其部分的核酸和载体，含有核酸的重组细胞，以及包含抗体或抗原结合片段的组合物。本发明还提供了利用本文提供的抗体和抗原结合片段的治疗和诊断方法。


Ab
X
Z
m