(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2009-539384
(P2009-539384A)
(43)公表日　平成21年11月19日(2009.11.19)

(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		4B064
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C085

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 226 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-514511 (P2009-514511)
(86)(22)出願日　平成19年6月6日 (2007.6.6)
(85)翻訳文提出日　平成21年1月16日 (2009.1.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/070513
(87)国際公開番号　WO2008/060705
(87)国際公開日　平成20年5月22日 (2008.5.22)
(31)優先権主張番号　60/811,349
(32)優先日　平成18年6月6日 (2006.6.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/811,357
(32)優先日　平成18年6月6日 (2006.6.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/866,772
(32)優先日　平成18年11月21日 (2006.11.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフォルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＤＬＬ４抗体および抗ＤＬＬ４抗体使用の方法

(57)【要約】
ＤＬＬ４は、重要かつ有利な治療標的として存在する。本発明は、抗ＤＬＬ４抗体、および、それらの抗体を含む組成物、およびそれらの抗体を使用する方法、キット、および製造用品を提供する。本発明の一部は、各種のＤＬＬ４結合因子（例えば、免疫複合体、抗体、およびその断片）の特定に基づく。本発明のＤＬＬ４結合因子は、ＤＬＬ４－Ｎｏｔｃｈ受容体経路の発現および／または活性に関連する病的状態を標的として使用するための、重要な治療および診断因子となる。

Clone 26.20

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGATEYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:54)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYNGPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:55)

Clone 26.14

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTSFRDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGSTDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:56)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVNGPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)

Clone 26.82

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:58)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

FIG. 6

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離抗ＤＬＬ４抗体であって：
（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＴＧＴＶＴ（配列番号１８）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＹＩＳＰＮＳＧＦＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、
を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。
【請求項２】
単離抗ＤＬＬ４抗体であって：
（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＮＧＰＳＴ（配列番号１５）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＡＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、
を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。
【請求項３】
ＨＶＲ－Ｌ３変異種が、下記の位置：９１（ＳまたはＷ）、９２（ＹまたはＦ）、９３（Ｔ、Ｎ、またはＳ）、９４（ＴまたはＧ）、９５（Ｐ、Ｑ、Ａ、またはＴ）、および／または９６（Ｐ、Ｓ、Ａ、またはＶ）の、任意の組み合わせにおいて、１～６個（１、２、３、４、５、または６個）の置換を含む、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項４】
ＨＶＲ－Ｈ２変異種が、下記の位置：５０（Ｖ、Ｌ、またはＹ）、５２（ＮまたはＳ）、５２ａ（ＰまたはＳ）、または５３（Ｎ、Ｑ、Ｔ、またはＩ）の、任意の組み合わせにおいて、１～４個（１、２、３、または４個）の置換を含む、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項５】

１、２、３、４、５、または６個のＨＶＲを含む単離ＤＬＬ４抗体であって、各ＨＶＲは、配列番号１～１８から成る群から選ばれる配列を含むか、該配列から成るか、または該配列から事実上成り、配列番号１０はＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号１１はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８は、ＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号１または２は、ＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３、４、５、６、７、または８は、ＨＶＲ－Ｈ２に対応し、配列番号９は、ＨＶＲ－Ｈ３に対応する、単離ＤＬＬ４抗体。

【請求項６】

請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１４、２、３、および９を含む、抗体。

【請求項７】

請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１５、１、５、および９を含む、抗体。

【請求項８】

請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１６、１、６、および９を含む、抗体。

【請求項９】

請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１７、１、７、および９を含む、抗体。

【請求項１０】

請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１８、１、８、および９を含む、抗体。

【請求項１１】

骨組構造配列の少なくとも一部が、ヒトの共通骨組構造配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の抗体。

【請求項１２】

請求項１または２に記載の抗体であって、前記修飾が、置換、挿入、または欠失である、抗体。

【請求項１３】

請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのκサブグループ共通骨組構造配列を含む、抗体。

【請求項１４】

請求項１～１２のいずれかに記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのサブグループＩＩＩ重鎖共通骨組構造配列を含む、抗体。

【請求項１５】

請求項１４に記載の抗体であって、該抗体が、位置７１、７３、または７８の一つ以上において置換を含む、抗体。

【請求項１６】

請求項１５に記載の抗体であって、前記置換が、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、または、Ｎ７８Ａの内の一つ以上である、抗体。

【請求項１７】

請求項１～１６のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項１８】

請求項１７に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項１９】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項１８に記載のベクター。
【請求項２０】
請求項１８または１９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項２１】
前記宿主細胞が原核細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２２】
前記宿主細胞が真核細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２３】
前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２４】
抗ＤＬＬ４抗体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）請求項１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）該抗体を回収すること、を含む方法。
【請求項２５】
抗ＤＬＬ４免疫複合体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）請求項１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）前記抗体を回収すること、を含む方法。
【請求項２６】
前記宿主細胞が原核細胞である、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記宿主細胞が真核細胞である、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２８】
ＤＬＬ４の検出のための方法であって、該方法が、生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
【請求項２９】
ＤＬＬ４発現に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有するか、または有することが疑われる患者から得た生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
【請求項３０】
前記抗ＤＬＬ４抗体が、検出可能に標識される、請求項２８～２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
請求項１～１６のいずれかに記載の抗ＤＬＬ４抗体を含む組成物。
【請求項３２】
請求項１７～１９のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組成物。
【請求項３３】
前記組成物が担体をさらに含む、請求項３１または３２に記載の組成物。
【請求項３４】
腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を要する被験体に対し、請求項１～１６のいずれかに記載の抗体の有効量を投与し、それによって、該腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置することを含む、方法。
【請求項３５】
前記腫瘍、癌、または細胞増殖性障害が、結腸癌、肺癌、または乳癌である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
有効量の抗血管形成剤を投与することをさらに含む、請求項３４または３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗血管形成剤が、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）の拮抗剤である、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】
前記ＶＥＧＦ拮抗剤が、抗ＶＥＧＦ抗体である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記抗ＶＥＧＦ抗体が、ベバシズマブである、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
有効量の化学療法剤を投与することをさらに含む、請求項３４～３９のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
血管形成に関連する病的状態を有する被験体において抗血管形成剤の効力を強化する方法であって、該抗血管形成剤に加えて、請求項１～１６のいずれかに記載の抗体の有効量を該被験体に投与して、それによって、該抗血管形成剤の効力を強化することを含む、方法。
【請求項４２】
血管形成に関連する前記病的状態が、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
血管形成に関連する前記病的状態が、眼内血管新生症である、請求項４１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に、分子生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体、およびその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
血管補給の発達は、多くの生理学的および病理学的過程にとって基本的要件である。胚および腫瘍などの活発に増殖する組織は、十分な血液補給を必要とする。これらの組織は、血管形成と呼ばれる過程を通じて、新規血管の形成を増進するプロ血管増殖因子を生産することによってこの要求を満たす。血管形成は、下記のステップの全て、または多くを含む、複雑ではあるが、整然とした生物事象である。ａ）内皮細胞（ＥＣ）が、既存のＥＣから増殖するか、または前駆細胞から分化する；ｂ）ＥＣが移動し合体してコード状構造を形成する；ｃ）次に、血管コードは、管形成を経過し、中心腔を持つ血管を形成する；ｄ）既存コードまたは血管が、芽を出し二次血管を形成する；ｅ）原始血管網は、さらに再編成および再形成を経過する；およびｆ）辺縁内皮細胞が招集されて、内皮管を包囲し、この血管に対し維持および修飾機能を付与する。このような細胞として、小血管のための辺縁細胞、比較的大型の血管のための平滑筋細胞、および心臓における心筋細胞が挙げられる（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３）。
【０００３】
血管形成が、種々の障害の病因に関与することは、現在では十分に知られている。そのような障害として、固形腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後線維増殖、血管腫、慢性的炎症、眼内血管新生病、例えば、増殖性網膜症、例えば、糖尿病網膜症、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）、血管新生緑内障、移植角膜組織およびその他の移植組織の免疫拒絶反応、慢性関節リューマチ、および乾癬が挙げられる（非特許文献４；非特許文献５；および非特許文献６）。
【０００４】
腫瘍増殖の場合、血管形成は、過形成から新形成への移行の決定、および、腫瘍の増殖および転移のための栄養補給のために必須であるようである（非特許文献７）。血管新生によって、腫瘍細胞は、正常細胞に比べて、成長への有利な手がかりおよび増殖自律性を獲得することが可能となる。腫瘍は、通常、単一異常細胞として始まるが、これは、利用可能な毛細管網からの距離のために、たかだか数立方ミリメートルの大きさにしか成長す

ることができず、それ以上成長、拡散することなく長期間「休眠状態」のまま留まることがあり得る。次に、いくつかの腫瘍細胞が、血管形成表現型にスイッチされて内皮細胞を活性化し、内皮細胞は増殖し、成熟して新規毛細血管となる。これらの新たに形成された血管は、一次腫瘍の継続的成長を可能とするばかりでなく、転移腫瘍細胞の拡散および転移増殖を可能とする。したがって、乳癌ばかりでなく、他のいくつかの腫瘍においても、腫瘍切片における微小血管密度と、患者の生存率との間には相関が観察されている。Ｗｅｉｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２４：１－６（１９９１）；Ｈｏｒａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３４０：１１２０－２４（１９９２）；Ｍａｃｃｈｉａｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３４０：１４５－４６（１９９２）。この血管形成スイッチを調節する正確な機序は十分には理解されていないが、腫瘍塊の新規血管形成は、多数の、血管形成刺激因子と阻害因子との間の差し引きバランスから得られると考えられている（Ｆｏｌｋｍａｎ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１（１）：２７－３１（１９９５））。

【０００５】

血管発達の過程は緊密に調整されている。これまで、相当量の分子が、これらの多くは、周辺細胞によって生産される分泌因子であるが、ＥＣ分化、増殖、移動、および、合体によるコード様構造の形成を調節することが示されている。例えば、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）は、血管形成の刺激、および血管透過性の誘導に関与する最重要因子として特定されている。Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１８：４－２５（１９９７）。一つのＶＥＧＦ対立遺伝子の欠失ですら胎児の死を招くという所見は、血管系の発達と分化においてこの因子の果たす役割が何ものにも替えがたいことを指し示す。さらに、ＶＥＧＦは、腫瘍および眼球障害に関連する血管新生の最重要介在因子であることが示されている。Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．上記。ＶＥＧＦ ｍＲＮＡは、調べた、大多数のヒト腫瘍によって過剰発現されていた。Ｂｅｒｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９１：１５３－５９（１９９３）；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｐａｔｈｏｌ．２６：８６－９１（１９９５）；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：４７２７－３５（１９９３）；Ｍａｔｔｅｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７３：９３１－３４（１９９６）；Ｄｖｏｒａｋ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１４６：１０２９－３９（１９９５）。

【０００６】

さらに、糖尿病性、およびその他の虚血関連性網膜症患者では、眼房水におけるＶＥＧＦの濃度レベルは、血管の活発な増殖と高い相関を持つ。Ａｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３１：１４８０－８７（１９９４）。さらに、ＡＭＤに冒される患者では、新生血管の網状膜においてＶＥＧＦが局在することが実験によって示されている。Ｌｏｐｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．３７：８５５－６８（１９９６）。

【０００７】

抗ＶＥＧＦ中和抗体は、ヌードマウスにおいて、ヒトの各種腫瘍細胞系統の増殖を抑え（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６２：８４１－４４（１９９３）；Ｗａｒｒｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９５：１７８９－９７（１９９５）；Ｂｏｒｇｓｔｒｏｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：４０３２－３９（１９９６）；Ｍｅｌｎｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：９２１－２４（１９９６））、かつ、さらに、虚血性網膜障害モデルにおいて眼内血管形成を抑制する（Ａｄａｍｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．１１４：６６－７１（１９９６））。したがって、抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体、またはその他のＶＥＧＦ活動の抑制因子は、腫瘍および各種眼内新生血管障害の処置のための、有望な候補となる。このような抗体は、例えば、１９９８年１月１４日公開の特許文献１、共に１９９８年１０月１５日公開の特許文献２および特許文献３に記載される。抗ＶＥＧＦ抗体の一つである、ベバシズマブは、特定癌の処置のために化学治療処方と組み合わせた使用について

ＦＤＡによって承認され、抗ＶＥＧＦ抗体断片である、ラニビズマブは、加齢性（ウェット）黄斑変性の処置についてＦＤＡによって承認されている。

【０００８】

治療薬剤としての開発に最適な臨床属性を有する介在因子が依然として求められていることは明らかである。本明細書に記載される発明は、この要求に応えるもので、かつ、その他の利益をも提供する。

【０００９】

本明細書に引用される文献は、特許出願および公開を含め全て、その全体を、引用により本明細書に含める。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】欧州特許第８１７，６４８号明細書
【特許文献２】国際公開第９８／４５３３１号パンフレット
【特許文献３】国際公開第９８／４５３３２号パンフレット

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｈａｎａｈａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７７：４８－５０（１９９７）
【非特許文献２】Ｈｏｇａｎ　＆　Ｋｏｌｏｄｚｉｅｊ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．３：５１３－２３（２００２）
【非特許文献３】Ｌｕｂａｒｓｋｙ　＆　Ｋｒａｓｎｏｗ，Ｃｅｌｌ　１１２：１９－２８（２００３）
【非特許文献４】Ｆｏｌｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１０９３１－３４（１９９２）
【非特許文献５】Ｋｌａｇｓｂｒｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．５３：２１７－３９（１９９１）
【非特許文献６】Ｇａｒｎｅｒ　Ａ．，“Ｖａｓｃｕｌａｒ　ｄｉｓｅａｓｅｓ，”Ｉｎ：Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｏｃｕｌａｒ　Ｄｉｓｅａｓｅ．Ａ　Ｄｙｎａｍｉｃ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｇａｒｎｅｒ　Ａ．，Ｋｌｉｎｔｗｏｒｔｈ　ＧＫ，ｅｄｓ．，２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ(Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ，１９９４)，ｐｐ１６２５－１７１０
【非特許文献７】Ｆｏｌｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３９：５８（１９８９）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は、一部は、各種のＤＬＬ４結合因子（例えば、免疫複合体、抗体、およびその断片）の特定に基づく。ＤＬＬ４は、重要かつ有利な治療標的として存在するが、本発明は、結合性ＤＬＬ４に基づく組成物および方法を提供する。本明細書に記載するように、本発明のＤＬＬ４結合因子は、ＤＬＬ４－Ｎｏｔｃｈ受容体経路の発現および／または活性に関連する病的状態を標的として使用するための、重要な治療および診断因子となる。したがって、本発明は、ＤＬＬ４結合に関連する、方法、組成物、キット、および製造用品を提供する。

【００１３】

本発明は、ＤＬＬ４に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体を提供する。

【００１４】

一局面では、本発明は、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。その場合、該抗体の完全長ＩｇＧ形は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上の結合親和性においてヒトのＤＬＬ４に特異的に結合する。当該分野において十分に知られるように、その受容体に対するリガンドの結合親和性は、種々のアッセイの内のいずれかによって定量することが可能であり

、種々の定量値として表される。したがって、一実施態様では、結合親和性は、Ｋｄ値として表され、内在的結合親和性を反映する（例えば、アビディティー効果を最小とした）。一般に、結合親和性は、細胞無添加状況であれ、または細胞関連状況であれ、インビトロで測定することが好ましい。本明細書に記載されるものを含め、当該分野で既知のいくつかのアッセイ、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、およびＥＬＩＳＡなど、いずれも結合親和性測定値を得るために使用することが可能である。ある実施態様では、単離抗ＤＬＬ４抗体は、同様の親和性においてヒトおよびマウスのＤＬＬ４に結合する、すなわち、ヒトのＤＬＬ４に対する結合親和性が、マウスのＤＬＬ４に対する結合親和性に比べて、１００倍を超えて大きくもないし、小さくもない。ある実施態様では、ヒトのＤＬＬ４に対する結合親和性は、マウスのＤＬＬ４に対する結合親和性よりも、１０倍を超えて大きくも小さくもない。ある実施態様では、抗体は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上の結合親和性において、マウスのＤＬＬ４に特異的に結合する。

【００１５】

一局面では、本発明は、単離抗ＤＤＬ４抗体であって、該抗体の完全長ＩｇＧ形が、ヒトのＤＤＬ４に対し、約2×10^{5}以上、または約1×10^{5}以上のk_{on}において結合する、抗体を提供する。当該分野において十分知られるように、リガンドの、その受容体に対する結合のk_{on}は、いくつかのアッセイの内のいずれかを用いて定量し、かつ、種々の定量値において表すことが可能である。

【００１６】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４のリガンド結合領域に結合する、単離抗体を提供する。ある実施態様では、単離抗体は、ＤＬＬ４細胞外ドメインを含むか、該ドメインから成るか、または、該ドメインから事実上成るポリペプチドに結合する。ある実施態様では、単離抗体は、ヒトのＤＬＬ４のアミノ酸２５２－２８２、１－２５２、１－２８６、１－３２４、および／または２１９－２８６を含むか、これらから成るか、またはこれらから事実上成るポリペプチドに結合する。

【００１７】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４結合について、Ｎｏｔｃｈ受容体と競合する、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。

【００１８】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の生物活性を抑制し、下げ、および／または阻止する、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。

【００１９】

一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、５、または６個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：

（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＹＮＧＰＳＴ（配列番号１５）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＡＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、

（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、

を含む。

【００２０】

一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：

（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＶＮＧＰＡＴ（配列番号１４）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＳＦＲＤＮＷＩＳ（配列番号２）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号３）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、

（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、

を含む。

【００２１】

一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：

（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ１７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＹＴＧＴＶＴ（配列番号１８）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＹＩＳＰＮＳＧＦＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、

（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、

を含む。

【００２２】

一局面では、本発明は、１、２、３、４、５、または６個のＨＶＲを含む抗体を提供する。各ＨＶＲは、配列番号１－１８から成る群から選ばれる配列を含むか、該配列から成るか、または該配列から事実上成り、配列番号１０はＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号１１はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８は、ＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号１または２は、ＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３、４、５、６、７、または８は、ＨＶＲ－Ｈ２に対応し、かつ、配列番号９は、ＨＶＲ－Ｈ３に対応する。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１２、１、３、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－

Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１３、１、４、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１４、２、３、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１５、１、５、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１６、１、６、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１７、１、７、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１８、１、８、９を含む。

【００２３】

本発明の抗体における変異ＨＶＲは、ＨＶＲにおいて一つ以上（例えば、２、３、４、５個、またはそれ以上）の修飾を有することが可能である。

【００２４】

一実施態様では、ＨＶＲ－Ｌ３変異種は、下記の位置：９１（ＳまたはＷ）、９２（ＹまたはＦ）、９３（Ｔ、Ｎ、またはＳ）、９４（ＴまたはＧ）、９５（Ｐ、Ｑ、Ａ、またはＴ）、および／または９６（Ｐ、Ｓ、Ａ、またはＶ）の、任意の組み合わせにおいて、１－６個（１、２、３、４、５、または６個）の置換を含む。

【００２５】

一実施態様では、ＨＶＲ－Ｈ２変異種は、下記の位置：５０（Ｖ、Ｌ、またはＹ）、５２（ＮまたはＳ）、５２ａ（ＰまたはＳ）、または５３（Ｎ、Ｑ、Ｔ、またはＩ）の、任意の組み合わせにおいて、１－４個（１、２、３、または４個）の置換を含む。

【００２６】

各位置に続く括弧の中の文字（単数または複数）は、例示の置換（すなわち、代替）アミノ酸を示す。当業者には明らかなように、本明細書に記載される背景における置換アミノ酸としての、他のアミノ酸の適性は、当該分野で既知であるか、および／または本明細書に記載される技術を用い通例のやり方で評価することが可能である。

【００２７】

一局面において、本発明は、配列番号１または２の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号３、４、５、６、７、または８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３領域を含む抗体を提供する。

【００２８】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１配列；

（ｉｉ）配列番号５の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。

【００２９】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１配列；

（ｉｉ）配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｌ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号１５の配列を含むＨＶＲ－Ｌ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。
【００３０】
一局面において、本発明は、下記：
（ｉ）配列番号１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１配列；
（ｉｉ）配列番号８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２配列；
（ｉｉｉ）配列番号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３配列
の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。
【００３１】
一局面において、本発明は、下記：
（ｉ）配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１配列；
（ｉｉ）配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｌ２配列；
（ｉｉｉ）配列番号１８の配列を含むＨＶＲ－Ｌ３配列
の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。
【００３２】
配列番号１－１８のアミノ酸配列は、図１ａおよび１ｂに示すように、個々のＨＶＲ（すなわち、Ｈ１、Ｈ２、またはＨ３）に関して番号付けする。番号付けは、後述するように、Ｋａｂａｔの番号付けシステムに一致する。
【００３３】
一局面では、本発明は、図１ａおよび１ｂに示す重鎖ＨＶＲ配列を含む抗体を提供する。
【００３４】
一局面では、本発明は、図１ａおよび１ｂに示す軽鎖ＨＶＲ配列を含む抗体を提供する。
【００３５】
本発明の抗体のいくつかの実施態様は、下記：
【００３６】
【化１】

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Asn*** Thr Ala

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Ser ***Arg*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***His*** Tyr Thr Thr Pro Pro

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 **（配列番号５２）**

（ＨＶＲ残基には下線を施す）

の配列番号５２に示される、ヒト化４Ｄ５抗体（ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８）（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の軽鎖可変ドメインを含む。
【００３７】
一実施態様では、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８軽鎖可変ドメイン配列は、位置３０、６６、および９１（それぞれ、上にボールド／イタリック体で示されるＡｓｎ、Ａｒｇ、およびＨｉｓ）の内の一つ以上において修飾される。一実施態様では、修飾されたｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８配列は、位置３０にＳｅｒ、位置６６にＧｌｙ、および／または、位置９１にＳｅｒを含む。したがって、一実施態様では、本発明の抗体は、下記：
【００３８】

【化２】

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Ser*** Thr Ala

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Ser ***Gly*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***Ser*** Tyr Thr Thr Pro Pro

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 **（配列番号５３）**

（ＨＶＲ残基には下線を施す）

の配列番号５２に示される、配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【００３９】

ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８に関する置換残基は、上にボールド／イタリック体で示す。

【００４０】

本発明の抗体は、ＤＬＬ４に対する結合が事実上保持される限り、適切であれば、任意の骨組可変ドメインを含むことが可能である。例えば、ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトのサブグループＩＩＩ重鎖骨組共通配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、骨組共通配列は、位置７１、７３、および／または７８において置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、および／または、７８はＡである。一実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、および同第５，８２１，３３７号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の重鎖可変ドメイン骨組構造配列を含む。一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトのκＩ軽鎖骨組共通配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、米国特許第６，４０７，２１３号明細書および同第５，８２１，３３７号明細書に記載されるように、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖ＨＶＲ配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、および同第５，８２１，３３７号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【００４１】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、５、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１５である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４２】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号２、３、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３

８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１４である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４３】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ　Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、８、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１８である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４４】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ　Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、５、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１５である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４５】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ　Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号２、３、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１４である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４６】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ　Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、８、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１８である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４７】

一実施態様では、本発明の抗体は、所望の標的結合親和性を獲得するために親和性熟成される。一例において、本発明の親和性熟成された抗体は、アミノ酸位置Ｈ２８、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４、Ｌ９５、および／またはＬ９６の内の一つ以上において置換を含む。一例において、本発明の親和性熟成された抗体は、下記の置換：（ａ）重鎖において、Ｖ５０Ｌ、Ｖ５０Ｙ、Ｎ５２Ｓ、Ｐ５２ａＳ、Ｎ５３Ｑ、Ｎ５３Ｔ、Ｎ５３Ｉ、Ｓ５６Ａ、Ｓ５６Ｆ、Ｔ５７Ｓ、Ｄ５８Ｅ、Ｄ５８Ｉ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｙ、または（ｂ）軽鎖において、Ｓ９１Ｗ、Ｙ９２Ｆ、Ｔ９３Ｎ、Ｔ９３Ｓ、Ｔ９４Ｇ、Ｐ９５Ｑ、Ｐ９５Ａ、Ｐ９５Ｔ、Ｐ９６Ｓ、Ｐ９６Ａ、Ｐ９６Ｖの内の一つ以上を含む。

【００４８】

一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５４の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５５の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５４の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５５の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４９】

一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５６の配列を含む、重鎖可変ドメインを含

む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５７の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５６の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５７の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。

【００５０】

一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５８の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５９の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５８の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５９の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。

【００５１】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４に対する結合に関して、前述の抗体のいずれかと競合する抗体を提供する。一局面では、本発明は、前述の抗体のいずれかと、ＤＬＬ４上の同じエピトープに結合する抗体を提供する。

【００５２】

当該分野で知られ、本明細書で下記にさらに詳細に記載されるように、抗体の超可変領域を区画するアミノ酸位置／境界は、観点、および当該分野で既知の各種定義（下記に記載）に応じて変動する可能性がある。可変ドメイン内のいくつかの位置は、その位置が、ある一組の基準の下では超可変領域の中に含めることが可能である一方で、別の一組の基準の下では超可変領域から外されるという点で、ハイブリッド超可変位置と見なしてもよい。一つ以上の、このような位置が、拡張超可変領域（下記にさらに詳細に定義する）の中に見出される可能性がある。

【００５３】

ある実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。ある実施態様では、抗体は、キメラ抗体、親和性熟成抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体から成る群から選ばれる。ある実施態様では、抗体は、抗体断片である。ある実施態様では、抗体は、Ｆａｂ、Ｆａｂ′、Ｆａｂ′－ＳＨ、$F(ab')_2$、またはｓｃＦｖである。

【００５４】

一実施態様では、抗体は、キメラ抗体、例えば、異種の、非ヒト、ヒト、またはヒト化配列（例えば、骨組構造および／または定常ドメイン配列）に移植された、非ヒトドナー由来の、抗原結合配列を含む抗体である。一実施態様では、非ヒトドナーはマウスである。一実施態様では、抗原結合配列は、合成的であり、例えば、突然変異誘発（例えば、ファージディスプレイなど）によって獲得される。一実施態様では、本発明のキメラ抗体は、マウスのＶ領域、およびヒトのＣ領域を持つ。一実施態様では、マウスの軽鎖Ｖ領域が、ヒトのカッパ軽鎖に融合される。一実施態様では、マウス重鎖Ｖ領域が、ヒトのＩｇＧ１　Ｃ領域に融合される。

【００５５】

本発明のヒト化抗体は、ＦＲにアミノ酸置換を持つもの、および、移植ＣＤＲの中に変化を持つ親和性熟成変異種を含む。ＣＤＲまたはＦＲにおける置換アミノ酸は、ドナーまたはレシピエント抗体の中に存在するものに限定されない。別の実施態様では、本発明の抗体はさらに、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ機能、およびＢ－細胞殺作用の強化をもたらす、Ｆｃ領域のアミノ酸残基の変化を含む。本発明の他の抗体として、安定性を向上させる特異的変化を持つものが挙げられる。別の実施態様では、本発明の抗体は、エフェクター機能の低下、例えば、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ機能の低下、および／またはＢ－細胞殺作用の低下をもたらす、Ｆｃ領域のアミノ酸残基の変化を含む。ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトの補体因子Ｃ１ｑ、および／または、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞におけるヒトのＦｃ受容体に対する結合低下（例えば、結合欠如）によって特徴づけられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトのＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ、および／またはＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合低下（例えば、結合欠如）によって特徴づけられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ＩｇＧクラス（例えば、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）であり、Ｅ２３３、Ｌ２３４、Ｇ２３６、Ｄ２６５、Ｄ２７０、Ｎ２９７、Ｅ３１８、Ｋ３２０、Ｋ３２２、Ａ３２７、Ａ３３０、Ｐ３３１、および／またはＰ３２９（

番号はＥＵ指数による）において少なくとも一つの突然変異を含む。ある実施態様では、抗体は、突然変異Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ、またはＤ２６５Ａ／Ｎ２９７Ａを含む。

【００５６】

一局面では、本発明は、本明細書に示される抗原結合配列の内のいずれかを含み、ＤＬＬ４に特異的に結合する、抗ＤＬＬ４ポリペプチドを提供する。

【００５７】

本発明の抗体は、ＤＬＬ４に（例えば、特異的に）結合し、ある実施態様では、ＤＬＬ４関連作用の内の一つ以上の局面を修飾する場合がある。そのような作用としては、例えば、ただしそれらに限定されないが、Ｎｏｔｃｈ受容体活性化の低下または阻止、Ｎｏｔｃｈ受容体下流方向への分子シグナル伝達の低下または阻止、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合の遮断または阻止、および／または、内皮細胞増殖の増進、および／または内皮細胞分化の抑制、および／または、動脈分化の抑制、および／または、腫瘍血管還流の抑制、および／または、腫瘍、細胞増殖性障害、または癌の処置および／または予防、ＤＬＬ４発現および／または活性と関連する障害の処置または予防、および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体の発現および／または活性と関連する障害の処置または予防の内の、任意の一つ以上が挙げられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、該抗体は、ＤＬＬ４の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に特異的に結合する。ある実施態様では、該抗体は、ＤＬＬ４細胞外ドメインから成るか、または事実上成るポリペプチドに特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上のＫＤにおいてＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、約2×10^{5}以上、または約1×10^{5}以上のk_{on}においてヒトのＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、ＤＬＬ４－リガンドと結合について競合する（ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合を下げるか、および／または阻止する）。

【００５８】

一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の抗体、および担体を含む組成物を提供する。一実施態様では、担体は、製薬学的に受容可能である。

【００５９】

一局面では、本発明は、本発明の抗ＤＬＬ４抗体をコードする核酸を提供する。

【００６０】

一局面では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

【００６１】

一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の核酸、および担体を含む組成物を提供する。一実施態様では、担体は、製薬学的に受容可能である。

【００６２】

一局面では、本発明は、本発明の核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターは、任意のタイプであってよく、例えば、発現ベクターなどの組み換えベクターであってもよい。種々の宿主細胞の内いずれのものを使用することも可能である。一実施態様では、宿主細胞は、原核細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である。一実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞などの哺乳動物細胞である。

【００６３】

一局面では、本発明は、本発明の抗体の作製法を提供する。例えば、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体（本明細書において定義するように、その完全長および断片を含む）、または免疫複合体の作製法であって、前記抗体（またはその断片）をコードする、本発明の組み換えベクターを、適切な宿主において発現させること、および、前記抗体を回収することを含む方法を提供する。

【００６４】

一局面では、本発明は、容器、および該容器の中に含まれる、本発明の一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を含む、組成物を含む製品を提供する。一実施態様では、組成物はさらに、抗

血管形成因子を含む。一実施態様では、抗血管形成因子は、抗ＶＥＧＦ抗体、例えば、ベバシズマブである。一実施態様では、該組成物は、本発明の核酸を含む。一実施態様では、抗体を含む組成物はさらに、ある実施態様では、製薬学的に受容可能な担体を含む。一実施態様では、抗血管形成因子を含む、第２の組成物が、容器の中に含まれる。一実施態様では、抗血管形成因子は、抗ＶＥＧＦ抗体、例えば、ベバシズマブである。一実施態様では、本発明の製品はさらに、対象に対して組成物（単数または複数）（例えば、抗体）を投与するための指示（例えば、本明細書に記載される方法の内のいずれかに関する指示）を含む。

【００６５】

一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を含む組成物を含む第１容器、およびバッファーを含む第２容器を含むキットを提供する。一実施態様では、バッファーは、製薬学的に受容可能である。一実施態様では、抗体を含む組成物はさらに、担体を含み、担体は、ある実施態様では、製薬学的に受容可能である。一実施態様では、キットはさらに、対象に、組成物（例えば、抗体）を投与するための指示を含む。

【００６６】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の抗ＤＬＬ４抗体の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００６７】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の核酸の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００６８】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の発現ベクターの使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００６９】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の宿主細胞の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００７０】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の製品の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００７１】

一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明のキットの使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。

【００７２】

本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性、例えば、発現および／または活性の上昇または低下、または、有害な発現および／または活性と関連する病的状態を修飾するために有用な方法および組成物を提供する。

【００７３】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性の上昇と関連する腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置または予防するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【００７４】

一局面では、本発明は、腫瘍または癌の増殖を緩和、抑制、阻止、または予防するため

の方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【００７５】

一局面では、本発明は、腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【００７６】

一局面では、本発明は、血管形成を抑制するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【００７７】

一局面では、本発明は、血管形成に関連する病的状態を処置するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。ある実施態様では、血管形成に関連する病的状態は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。ある実施態様では、血管形成に関連する病的状態は、眼内血管新生症である。

【００７８】

適切なものであれば、いずれの病的状態であっても、それに作用を及ぼすために本発明の方法を使用することが可能である。例示の障害は本明細書に記載されるが、例えば、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、および肝細胞癌、および、上記癌の転移形から成る群から選ばれる癌が挙げられる。

【００７９】

本発明の方法はさらに、追加の処置ステップを含むことが可能である。例えば、一実施態様では、方法は、標的細胞および／または組織（例えば、癌細胞）が、放射線処置、または化学療法剤または抗血管形成剤に暴露されるステップを含む。

【００８０】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４の検出法であって、サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。本明細書で用いる「検出」という用語は、コントロールの参照下、または参照無しにおける定性的および／または定量的検出（濃度測定）を含む。

【００８１】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４発現および／または活性に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有するか、疑われる患者から得た生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、ＤＬＬ４発現は、発現上昇、または異常発現である。ある実施態様では、障害は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。

【００８２】

別の局面では、本発明は、本発明に記載される、抗ＤＬＬ４抗体であって、検出ラベルを含む抗体を提供する。

【００８３】

別局面では、本発明は、本発明に記載される抗ＤＬＬ４抗体の内のいずれかと、ＤＬＬ４との複合体を提供する。ある実施態様では、複合体は、インビボ、またはインビトロに存在する。ある実施態様では、複合体は、癌細胞を含む。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、検出可能に標識される。

【図面の簡単な説明】

【００８４】

【図１Ａ】図１ａおよび１ｂは、抗ＤＬＬ４抗体の重鎖および軽鎖ＨＶＲループの配列である。数字は、重鎖ＨＶＲ配列Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３、および軽鎖ＨＶＲ配列Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３を示す。配列の番号付けは下記の通り。クローン１５２．２６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶ

Ｒ－Ｌ３は配列番号１２である）；クローン１５２．２６．６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号４である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１３である）；クローン１５２．２６．１４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号２である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１４である）；クローン１５２．２６．２０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号５である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１５である）；クローン１５２．２６．３４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号６である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１６である）；クローン１５２．２６．４０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号７である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１７である）；クローン１５２．２６．８２（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号８である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１８である）。

【００８５】

アミノ酸位置は、後述するように、Ｋａｂａｔ番号付けシステムにしたがって番号付けを行った。

【図１Ｂ】図１ａおよび１ｂは、抗ＤＬＬ４抗体の重鎖および軽鎖ＨＶＲループの配列である。数字は、重鎖ＨＶＲ配列Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３、および軽鎖ＨＶＲ配列Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３を示す。配列の番号付けは下記の通り。クローン１５２．２６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１２である）；クローン１５２．２６．６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号４である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１３である）；クローン１５２．２６．１４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号２である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１４である）；クローン１５２．２６．２０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号５である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１５である）；クローン１５２．２６．３４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号６である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１６である）；クローン１５２．２６．４０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号７である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１７である）；クローン１５２．２６．８２（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号８である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１８である）。

【００８６】

アミノ酸位置は、後述するように、Ｋａｂａｔ番号付けシステムにしたがって番号付けを行った。

【図２Ａ】図２は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：重鎖可変領域（ＶＨ）共通骨組構造（図２ａ、２ｂ）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（

配列番号１９）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２０－２２）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（配列番号２３）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２４－２６）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造拡張ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（配列番号２７）ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２８－３０）ヒトＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３１）ヒトのＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３２－３３）ヒトＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３４）ヒトのＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３５－３７）

【図２Ｂ】図２は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：重鎖可変領域（ＶＨ）共通骨組構造（図２ａ、２ｂ）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（配列番号１９）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２０－２２）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（配列番号２３）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２４－２６）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造拡張ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ ＣＤＲ（配列番号２７）ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２８－３０）ヒトＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３１）ヒトのＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３２－３３）ヒトＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３４）ヒトのＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３５－３７）

【図３】図３は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：軽鎖可変領域（ＶＬ）共通骨組構造（図３）ヒトのＶＬカッパサブグループＩ共通骨組構造（配列番号３８）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＩ共通骨組構造（配列番号３９）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＩＩ共通骨組構造（配列番号４０）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＶ共通骨組構造（配列番号４１）

【図４】図４は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖および重鎖の骨組領域配列を示す。上付き／ボールド体の数字は、Ｋａｂａｔによるアミノ酸位置を示す。

【図５】図５は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖および重鎖の、修飾／変異骨組領域配列を示す。上付き／ボールド体の数字は、Ｋａｂａｔによるアミノ酸位置を示す。

【図６】図６は、抗体クローン２６．２０、２６．１４、および２６．８２の、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を示す。

【図７Ａ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｂ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｃ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｄ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｅ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ

，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｆ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｇ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｈ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおける ＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ

，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図８Ａ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｂ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｃ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｄ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図９Ａ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、

腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｂ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｃ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｄ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｅ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｆ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗

ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｇ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｈ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｉ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｊ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｋ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｌ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａ

ｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｍ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｎ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｏ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｐ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図１０Ａ】マウス小腸のホメオスタシスにおいて、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である。コントロール（ａ，ｄ，ｇ，ｊ）、抗ＤＬＬ４抗体処理（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、６週間）（ｂ，ｅ，ｈ，ｋ）、およびＤＢＺ処理（３０μモル／ｋｇ、毎日、５日間）（ｃ，ｆ，ｉ，ｌ）マウスから得られた小腸の免疫組織化学的実験。Ｈ＆Ｅ（ａ，ｂ，ｃ）、およびアルシアンブルー染色（ｄ，ｅ，ｆ）に示されるように、ＤＢＺは、ＴＡ集団の、杯細胞による置換を引き起こした。この変化は、抗ＤＬＬ４抗体処理ではまったく見られなかった。Ｋｉ６７（ｇ，ｈ，ｉ）およびＨＥＳ－１（ｊ，ｋ，ｌ）染色は、抗ＤＬ

Ｌ４抗体が、ＤＢＺの作用を模倣しないことをさらに確認した。
【図１０Ｂ】マウス小腸のホメオスタシスにおいて、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である。コントロール（ａ，ｄ，ｇ，ｊ）、抗ＤＬＬ４抗体処理（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、６週間）（ｂ，ｅ，ｈ，ｋ）、およびＤＢＺ処理（３０μモル／ｋｇ、毎日、５日間）（ｃ，ｆ，ｉ，ｌ）マウスから得られた小腸の免疫組織化学的実験。Ｈ＆Ｅ（ａ，ｂ，ｃ）、およびアルシアンブルー染色（ｄ，ｅ，ｆ）に示されるように、ＤＢＺは、ＴＡ集団の、杯細胞による置換を引き起こした。この変化は、抗ＤＬＬ４抗体処理ではまったく見られなかった。Ｋｉ６７（ｇ，ｈ，ｉ）およびＨＥＳ－１（ｊ，ｋ，ｌ）染色は、抗ＤＬＬ４抗体が、ＤＢＺの作用を模倣しないことをさらに確認した。
【図１１Ａ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。
【図１１Ｂ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全

長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｃ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｄ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍ

ｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｅ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特

異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１２】Ｎｏｔｃｈ活性化によるＤＬＬ４の上方調整。ＤＢＺ（０．０８μＭ）の非存在下、または存在下に、Ｃ－末端固定Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）によってＨＵＶＥＣを刺激した。刺激３６時間後、内因性ＤＬＬ４発現を、抗ＤＬＬ４抗体によるＦＡＣＳ分析によって調べた。

【発明を実施するための形態】

【００８７】

本発明は、本明細書において、ＤＬＬ４発現および／または活性、例えば、発現および／または活性の上昇、または、有害な発現および／または活性と関連する病的状態の、例えば、処置または予防に有用な抗ＤＬＬ４抗体を提供する。ある実施態様では、本発明の抗体は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置するために使用される。ある実施態様では、本発明の抗体は、血管形成に関連する病的状態を処置するために使用される。

【００８８】

別局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、ＤＬＬ４の検出および／または単離、例えば、各種組織および細胞型におけるＤＬＬ４の検出用の試薬として有用性を見出す。

【００８９】

本発明はさらに、抗ＤＬＬ４抗体、および、抗ＤＬＬ４抗体をコードするポリヌクレオチドの作製法を提供する。

一般的技術

本明細書に記載されるか、または参照される技術および処置は、広く十分に理解されていて、当業者によって通例法にしたがって一般的に採用されるもので、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ３ｒｄ．ｅｄｔｉｏｎ（２００１）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．（２００３））；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．（１９９５）），Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．（１９８８）ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，ａｎｄ ＡＮＩＭＡＬ ＣＥＬＬ ＣＵＬＴＵＲＥ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．（１９８７））に記載される、広く利用される方法である。

定義

「単離」抗体とは、特定され、その天然の環境の成分から分離および／または回収された抗体である。その天然環境の汚染成分とは、該抗体の診断的または治療的使用を妨げると考えられる物質であって、酵素、ホルモン、およびその他の、タンパク様または非タンパク様溶質を含んでもよい。好ましい実施態様では、抗体は、（１）Ｌｏｗｒｙ法で定量した場合、抗体重量の９５％を超えるレベルまで精製され、そして最も好ましくは重量の９９％を超えるレベルまで精製されるか、（２）スピンカップ分離器によってＮ－末端、または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を獲得するのに十分な程度にまで精製されるか、または（３）Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ（商標）ブルー、または好ましくは銀染色使用の還元的、または非還元的状態におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均一とされるまで精製される。単離抗体は、組み換え細胞内のインシトゥー状態の抗体を含む。なぜなら、抗体の天然環境の少なくとも一成分は存在しないからである。同様に、単離抗体は、組み換え細胞周囲の媒体における抗体を含む。しかしながら、通常、単離抗体は、少なくとも一つの

精製ステップによって調製される。

【００９０】

「単離」核酸分子とは、特定されて、該抗体核酸の天然供給源において通常関連する、少なくとも一つの汚染性核酸分子から分離される核酸分子である。単離核酸分子は、それが天然で見出される形状または背景とは異なる。したがって、単離核酸は、それが天然細胞において存在するときの核酸分子とは区別される。しかしながら、単離核酸分子は、通常抗体を発現する、細胞内に含まれる核酸分子、例えば、天然細胞のものとは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【００９１】

「Ｋａｂａｔと同様の、可変ドメインの番号付け」、または「Ｋａｂａｔと同様の、アミノ酸位置の番号付け」という用語、およびその変異種は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）による抗体編集において、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのために使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の直線的アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲの短縮、または挿入に対応して、より少ない、または余分なアミノ酸を含んでもよい。例えば、重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後に、単一のアミノ酸挿入（Ｋａｂａｔによれば５２ａ）、および、重鎖ＦＲ残基８２の後に、複数の挿入残基（Ｋａｂａｔによれば８２ａ、８２ｂ、および８２ｃ）を含んでもよい。残基に関するＫａｂａｔ番号付けは、任意の抗体について、該抗体配列の、整列によるＫａｂａｔの「標準的」番号付け配列との相同領域において決定されてもよい。

【００９２】

本明細書で用いる、「事実上同様の」、または「事実上同じ」という語句は、二つの数値（一般的には、一方は本発明の抗体に関連し、他方は、参照／比較抗体に関連する）の間の近似が十分に高度であって、当業者であれば、この二つの数値間の差は、前記数値（例えば、Ｋｄ値）によって測定される生物学的特徴の背景において、ほとんど、または、全く生物学的および／または統計学的に有意ではないと見なすと考えられる程度のものであることを示す。前記二つの数値間の差は、参照／比較抗体の数値の関数として、好ましくは約５０％未満、好ましくは約４０％未満、好ましくは約３０％未満、好ましくは約２０％未満、好ましくは約１０％未満である。

【００９３】

「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位、および、その結合パートナー（例えば、抗原）の間の、非共有的相互作用の加算合計強度を指す。別様に指示しない限り、本明細書で用いる「結合親和性」とは、結合ペア（例えば、抗体および抗原）のメンバー同士の間における１：１相互作用を反映する、内在的結合親和性を指す。そのパートナーＹに対する、分子Ｘの親和性は、一般に、解離定数（Ｋｄ）によって表される。親和性は、当該分野で既知の一般的方法、例えば、本明細書に記載される方法によって測定することが可能である。低親和性抗体は、一般に、抗原への結合が遅く、速やかに解離する傾向を持つが、一方、高親和性抗体は、一般に、抗原に対しより速やかに結合し、より長く結合状態に留まる傾向を持つ。結合親和性を測定するには、種々の方法が知られるが、その内のいずれのものも、本発明の目的のために使用が可能である。特異的例示実施態様が下記に記載される。

【００９４】

一実施態様では、本発明による“Ｋｄ”または「Ｋｄ値」は、下記のアッセイによって記載されるように、対象抗体のＦａｂ形と、その抗原によって実行される、放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される。アッセイは、一連の規定濃度の未標識抗原の存在下に、最小濃度の（^{125}Ｉ）標識抗原とＦａｂを平衡させ、次いで、抗Ｆａｂ抗体塗布プレートによって結合抗原を捕捉することによって、Ｆａｂの、溶液結合親和性

を測定する（Ｃｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３：８６５－８８１）。このアッセイのための条件を定めるため、マイクロタイタープレート（Ｄｙｎｅｘ）に、５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）に溶解した、捕捉性の抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ　Ｌａｂｓ）５μｇ／ｍｌを塗布し、一晩置き、次いで、ＰＢＳに溶解した２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン、室温（約２３℃）、２～５時間によってブロックした。非吸着性プレート（Ｎｕｎｃ　＃２６９６２０）では、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を、対象Ｆａｂの連続希釈液と混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５９３－４５９９における抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ－１２の評価と一致して）。次に、この対象Ｆａｂを一晩インキュベートする。一方、インキュベーションは、平衡の達成を確保するために、さらに長期間（例えば、６５時間）続けてもよい。その後、この混合物を、捕捉プレートに移し、室温でインキュベートする（例えば、１時間）。次に、溶液を除き、プレートを、ＰＢＳに溶解した０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０で８回洗浄する。プレートを乾燥後、１５０μｌ／ウェルのシンチレーション試薬（ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ（商標）－２０；Ｐａｃｋａｒｄ）を加え、プレートを、ＴｏｐＣｏｕｎｔガンマカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ）において１０分間カウントする。最大結合の２０％以下を示す各Ｆａｂの濃度を、競合結合アッセイに用いるために選ぶ。別の実施態様では、ＢＩＡｃｏｒｃ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用い表面プラズモン共鳴によって、ＫｄまたはＫｄ値を、２５℃で、固定抗原ＣＭ５チップについて～１０反応単位（ＲＵ）として測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示にしたがって、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を、１０ｍＭの酢酸ナトリウムｐＨ４．８で希釈し５μｇ／ｍｌ（～０．２μＭ）とし、次いで、５μｌ／分の流速で注入し、約１０反応単位（ＲＵ）の結合タンパクを実現する。抗原注入後、１Ｍエタノールアミンを注入して、無反応基をブロックする。反応速度測定のために、Ｆａｂの２倍連続希釈（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳ溶液として、約２５μｌ／分の流速で、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０（ＰＢＳＴ）と共に、２５℃で注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、会合および解離センサーグラムを同時適合させることによって、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計算する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、k_{off}/k_{on}として計算する。例えば、Ｃｈｅｎ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３：８６５－８８１を参照されたい。上の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を超えた場合、オン速度は、蛍光消光法を用いて定量することが可能である。この方法は、漸増濃度の抗原の存在下に、２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形）のＰＢＳ液（ｐＨ７．２）の、分光光度計、例えばフロー停止器装備分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、または、攪拌赤色キュベット付き８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定される、２５℃における蛍光発射強度（励起＝２９５ｎｍ；発射＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域幅）の増減を測定する。

【００９５】

本発明による「オン速度」または「会合速度」、または「会合速度」または“k_{on}”は、さらに、固定抗原ＣＭ５チップ、～１０反応単位（ＲＵ）について、２５℃でＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００、またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、上記と同じ表面プラズモン共鳴法によって定量することが可能である。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示にしたがって、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を、１０ｍＭ

の酢酸ナトリウムｐＨ４．８で希釈し５μｇ／ｍｌ（～０．２μＭ）とし、次いで、５μｌ／分の流速で注入し、約１０反応単位（ＲＵ）の結合タンパクを実現する。抗原注入後、１Ｍエタノールアミンを注入して、無反応基をブロックする。反応速度測定のために、Ｆａｂの２倍連続希釈（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳ溶液として、約２５μｌ／分の流速で、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０（ＰＢＳＴ）と共に、２５℃で注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、会合および解離センサーグラムを同時適合させることによって、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計算する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、$k_{off}／k_{on}$として計算する。例えば、Ｃｈｅｎ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９３：８６５－８８１を参照されたい。しかしながら、上の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が$10^{6}Ｍ^{-1}Ｓ^{-1}$を超えた場合、オン速度は、蛍光消光法を用いて定量することが好ましい。この方法は、漸増濃度の抗原の存在下に、２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形）のＰＢＳ液（ｐＨ７．２）の、分光光度計、例えばフロー停止器装備分光光度計（Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、または、攪拌赤色キュベット付き８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定した、２５℃における蛍光発射強度（励起＝２９５ｎｍ；発射＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域幅）の増減を測定する。

【００９６】

本明細書で用いる「ベクター」という用語は、それが連結される別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指すことが意図される。ベクターの一型は、「プラスミド」である。これは、さらに別のＤＮＡセグメントを連結させることが可能な、環状の、２本鎖ＤＮＡループを指す。もう一型のベクターは、ファージベクターである。もう一型のベクターは、ウィルスベクターである。このベクターでは、添加ＤＮＡセグメントは、ウィルスゲノムの中に連結される。あるベクターは、導入された宿主細胞において自律複製することが可能である（例えば、細菌性複製起源を持つ細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入と同時に宿主細胞のゲノムの中に組み込まれ、そのため、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、あるベクターは、それらが動作可能的に連結される遺伝子の発現を指令することが可能である。このようなベクターは、本明細書では、「組み換え発現ベクター」（または、単純に「組み換えベクター」）と呼ばれる。一般に、組み換えＤＮＡ法に有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形を取る。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、時に、相互交換的に使用される。なぜなら、プラスミドは、もっとも普通に使用されるベクター形だからである。

【００９７】

本明細書で相互交換的に使用される、「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さの、ヌクレオチドポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオシキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および／またはその類縁体、または、ＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼによって、または合成反応によって、ポリマーの中に組み込むことが可能な任意の基質であってもよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびその類縁体を含んでもよい。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合、該ポリマーの重合の前または後に付与してもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後、例えば、ラベルとの結合などによってさらに修飾されてもよい。他の種類の修飾としては、例えば、「キャップ」、一つ以上の天然ヌクレオチドの、類縁体による置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルフォスフォネート、フォスフォトリエステル、フォスフォアミデート、カルバミン酸塩など）による修飾、および、荷電結合（例えば、フォスフォロチオエート、フォスフォロジチオエートなど）による修飾、側基、例えば、タンパク（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リシンなど）を含むもの、介在因子（例えば

、アクリジン、プソラレンなど）を有するもの、キレート剤を含むもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属など）、アルキル化剤を含むもの、修飾結合を含むもの（アルファアノマー核酸など）が、未修飾形ポリヌクレオチドと並んで、挙げられる。さらに、糖類に通常存在するヒドロキシル基のいずれのものも、例えば、フォスフォン酸基、リン酸基によって置換されてもよいし、標準的保護基によって保護されてもよいし、または、追加のヌクレオチドとのさらに新たな結合のために活性化されてもよいし、または、固相、または半固相支持体に結合されてもよい。５′および３′末端ＯＨは、リン酸化されるか、または、アミン、または、１から２０個の炭素原子を有する、有機キャップ基によって置換されてもよい。他のヒドロキシル基も、誘導体形成して標準的保護基とされてもよい。ポリヌクレオチドはさらに、当該分野で一般的に知られる、リボースまたはデオキシリボース糖の類縁体、例えば、２′－Ｏ－メチル－、２′－Ｏ－アリル、２′－フルオロ－、または２′－アジド－リボース、炭素環糖類縁体、アルファーアノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類縁体、および、メチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシド類縁体を含むことが可能である。一つ以上のフォスフォジエステル結合が、別の結合基によって置換されてもよい。そのような別様結合基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、リン酸塩が、Ｐ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、（Ｏ）NR_2（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ′、ＣＯ、またはCH_2（「フォルムアセタール」）によって置換される実施態様が挙げられる。なお、前式において、ＲまたはＲ′は、独立に、Ｈ、または、任意にエーテル（－Ｏ－）結合、アリール、アルケニル、シクロアルケニル、またはアラルジルを含む、置換または未置換アルキル（１－２０Ｃ）である。ポリヌクレオチドにおける、必ずしも全ての結合が同じである必要はない。上の記述は、ＲＮＡおよびＤＮＡを含む、本明細書で参照する全てのポリヌクレオチドに適用される。

【００９８】

本明細書で用いる「オリゴヌクレオチド」は、一般に、ただし必ずしもそうとは限らないが、長さが約２００ヌクレオチド長の、一般に短い、一般に一本鎖の、一般に合成ポリヌクレオチドを指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、互いに排除的ではない。ポリヌクレオチドに関する上の記述は、等しく、完全に、オリゴヌクレオチドにも適用が可能である。

【００９９】

ペプチドまたはポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」とは、候補配列と、特定のペプチドまたはポリペプチド配列とを整列させ、要すれば、最大の配列同一性パーセントを達成するようギャップを導入した後、かつ、保存的置換を配列同一性の一部と考慮しないで得られた、特定ペプチドまたはポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である、候補配列のアミノ酸残基のパーセントと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを求めるための整列は、従来技術の能力の範囲内の種々の方法で、例えば、一般に入手が可能なコンピュータソフトウェア、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭｇＡｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて実現することが可能である。当業者であれば、比較される配列同士の全長に亘って最大整列を実現するのに必要な、いずれかのアルゴリズムを含め、整列を測定するための適切なパラメータを決定することが可能である。しかしながら、本発明の目的のためには、アミノ酸配列同一性パーセント値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．が著作権を有し、ソースコードは、ユーザー文書と共に、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ Ｏｆｆｉｃｅ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．，２０５５９に寄託され、米国著作権登録番号第ＴＸＵ５１００８７号の下に登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａによって一般に市販されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムはＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標） Ｖ４．０Ｄ

での使用のために作られている。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定されており、変動しない。

【０１００】

アミノ酸配列比較のためにＡＬＩＧＮ－２が用いられる場合、任意のアミノ酸配列Ｂとの、に関する、または、に対する、任意のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（これは、別に、任意のアミノ酸配列Ｂと、に関し、または、に対し、あるアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む、任意のアミノ酸配列Ａと表現することも可能である）は、下記のように計算される：

１００掛ける・分数Ｘ／Ｙ

上式において、Ｘは、ＡおよびＢのプログラム整列において、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって同一マッチと評価されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さが、アミノ酸配列Ｂの長さに等しくない場合、Ｂに対するＡのアミノ酸配列同一性％は、Ａに対するＢのアミノ酸配列同一性％と等しくならないことが理解されよう。

【０１０１】

別様に指示しない限り、本明細書で用いるアミノ酸配列同一性％値は、全て、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを用いて、先の段落で記述したようにして得られたものである。

【０１０２】

本明細書で用いる“ＤＬＬ４”（相互交換的に「デルタ様４」とも呼ばれる）という用語は、特記または文脈から別様に指示されない限り、任意の天然の、または変異（天然であると、合成であるとを問わず）ＤＬＬ４ペプチドを指す。「天然配列」という用語は、天然の短縮形または分泌形（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然の変異形（例えば、選択的スプライス形）、および天然の対立遺伝子変異形を特異的に包含する。「野生型ＤＬＬ４」という用語は、一般に、天然ＤＬＬ４タンパクのアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「野生型ＤＬＬ４配列」という用語は、一般に、天然のＤＬＬ４に見られるアミノ酸配列を指す。

【０１０３】

本明細書で用いる「Ｎｏｔｃｈ受容体」（相互交換的に“Ｎｏｔｃｈ”とも呼ばれる）という用語は、特記または文脈から別様に指示されない限り、任意の、天然または変異（天然であると、合成であるとを問わず）Ｎｏｔｃｈ受容体ポリペプチドを指す。ヒトは、四つのＮｏｔｃｈ受容体（Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、およびＮｏｔｃｈ４）を有する。「天然配列」という用語は、天然の短縮形または分泌形（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然の変異形（例えば、選択的スプライス形）、および天然の対立遺伝子変異形を特異的に包含する。「野生型Ｎｏｔｃｈ受容体」という用語は、一般に、天然Ｎｏｔｃｈ受容体タンパクのアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「野生型Ｎｏｔｃｈ受容体配列」という用語は、一般に、天然のＮｏｔｃｈ受容体に見られるアミノ酸配列を指す。

【０１０４】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、もっとも広い意味で相互交換的に用いられ、モノクローナル抗体（例えば、完全長または完全なモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異的抗体（例えば、所望の生物活性を示す限りにおいて、二重特異的抗体）を含み、さらに、（本明細書においてさらに詳細に記述されるように）いくつかの抗体断片を含んでもよい。抗体は、ヒトのもの、ヒト化、および／または親和性熟成されたものであってもよい。

【０１０５】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分の配列が、抗体間で大きく異なり、それが、各特定の抗体において、その特定の抗原に対する結合および特異性に使用されると

いう事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインを通じて均一には分布していない。可変性は、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方に見られる、相補性決定領域（ＣＤＲ）、または超可変領域（ＨＶＲ）と呼ばれる、三つのセグメントに集中する。可変ドメインの比較的高度に保存される領域を、骨組構造（ＦＲ）と呼ぶ。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、三つのＣＤＲによって接続される、大部分βシート構造を採用する、四つのＦＲ領域を含む。ＣＤＲは、このβシート構造を接続し、ある場合には、その一部となるループを形成する。各鎖のＣＤＲは、ＦＲ領域によって近接して一緒に保持され、他の鎖のＣＤＲと共に、抗体の抗原結合部位の形成に貢献する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１）を参照）。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接には関与しないが、各種エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与を示す。

【０１０６】

抗体をパパイン消化することによって、それぞれが単一抗原結合部位を有する“Ｆａｂ”断片と呼ばれる、二つの、同じ抗原結合断片、および、残余の“Ｆｃ”断片が得られる。後者の名前は、それが容易に結晶化することができる、その能力を反映する。ペプシン処理によって、二つの抗原結合部位を有し、かつ、依然として抗原に架橋結合することが可能な、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片が得られる。

【０１０７】

“Ｆｖ”とは、完全な抗原認識および結合部位を含む、抗体の最小断片である。２本鎖Ｆｖ分子では、この領域は、緊密な、非共有的連結で結ばれた、１本の重鎖および１本の軽鎖の可変ドメインのダイマーから成る。単一鎖Ｆｖ分子では、１本の重鎖および１本の軽鎖可変ドメインが、屈曲性ペプチドリンカーによって共有的に連結され、そのため、軽鎖および重鎖は、２本鎖Ｆｖ分子のものと同様の「ダイマー」構造として連結することが可能である。各可変ドメインの、三つのＣＤＲが相互作用を持ち、このＶＨ－ＶＬダイマーの表面に抗原結合部位を定めるのは、この形態においてである。以上まとめると、６つのＣＤＲが抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一可変ドメイン（または、抗原に対して特異的な、僅か三つのＣＤＲしか含まない、Ｆｖの半分）であっても、全体結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を持つ。

【０１０８】

Ｆａｂ断片はさらに、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第１定常ドメイン（ＣＨ１）を持つ。Ｆａｂ′断片は、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端において数個の残基を余分に持つことによって、Ｆａｂ断片とは異なる。この残基は、抗体のヒンジ領域の１個以上のシステインを含む。定常ドメインのシステイン残基（単数または複数）が、遊離チオール基を担持するＦａｂ′を、本明細書ではＦａｂ′－ＳＨと表示する。Ｆ（ａｂ′）$_2$抗体断片は、もともと、その間にヒンジ・システインを有する、Ｆａｂ′断片ペアとして生産された。抗体断片の、他の化学的結合も知られている。

【０１０９】

任意の脊椎動物種から得られた抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる、はっきりと異なる二つのタイプの内の一方に割り当てられる。

【０１１０】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てられる。免疫グロブリンには、大きく五つのクラスがある：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭで、これらの内のいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）に、例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$、ＩｇＧ$_4$、ＩｇＡ$_1$、およびＩｇＡ$_2$に分割することが可能である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する、重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンの、サブユニット構造および三次元形態も周知である。

【０１１１】

「抗体断片」は、完全な抗体の一部しか含まないが、その一部は、それが完全な抗体に存在する場合、その部分と通常関連する機能の内の少なくとも一つ、好ましくは大部分または全てを保持することが好ましい。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ′、Ｆ（ａｂ′）２、およびＦｖ断片；ダイアボディー；線状抗体；単一鎖抗体分子；および、抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原結合能を保持する。別の実施態様では、抗体断片、例えば、Ｆｃ領域を含む断片は、それが完全な抗体に存在する場合Ｆｃ領域と通常関連する生物機能、例えば、ＦｃＲｎ結合、抗体半減期修飾、ＡＤＣＣ機能、および補体結合の内の少なくとも一つを保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と事実上同様のインビボ半減期を有する、一価抗体である。例えば、そのような抗体断片は、該断片にインビボ安定性を付与することが可能なＦｃ配列と連結する、抗原結合アームを含んでもよい。

【０１１２】

本明細書で用いる「超可変領域」、“ＨＶＲ，”または“ＨＶ”という用語は、配列において超可変的で、および／または、構造的に定められたループを形成する、抗体の可変ドメインを指す。一般に、抗体は、六つの超可変領域：ＶＨに三つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、およびＶＬに三つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。いくつかの超可変領域区画が用いられており、本明細書にも包含される。Ｋａｂａｔ相補性決定領域（ＣＤＲ）は、配列可変性に基づき、もっとも広く用いられている（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１））。Ｃｈｏｔｈｉａは、代わりに、構造的ループの位置を参照する（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））。ＡｂＭ超可変領域は、ＫａｂａｔのＣＤＲと、Ｃｈｏｔｈｉａの構造ループの間の妥協の産物であり、Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＡｂＭ抗体モデル化ソフトウェアによって使用される。「接触」超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらの超可変領域それぞれの残基を下記に掲げる。

【０１１３】

【化３】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	（Ｋａｂａｔ番号付け）			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	（Ｃｈｏｔｈｉａ番号付け）			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

超可変領域は、下記のように「延長型超可変領域」を含んでもよい：ＶＬでは、２４－３６または２４－３４（Ｌ１）、４６－５６または５０－５６（Ｌ２）、および８９－９７（Ｌ３）、および、ＶＨでは、２６－３５（Ｈ１）、５０－６５または４９－６５（Ｈ２）、および９３－１０２、９４－１０２、または９５－１０２（Ｈ３）。可変ドメイン

の残基は、これらの定義のそれぞれについて、上記のＫａｂａｔらにしたがって番号付けされる。

【０１１４】

「骨組構造」または“ＦＲ”残基は、本明細書で定義される超可変領域以外の、可変ドメイン残基である。

【０１１５】

本明細書で用いる「モノクローナル抗体」という用語は、事実上均一な抗体集団から得られる抗体、すなわち、集団を構成する個々の抗体が同一であるか、および／または、同じエピトープ（単数または複数）に結合する抗体を指す。ただし、モノクローナル抗体の生産時に生じる可能性のある変異種は除く。このような変異種は、一般に、少量ながら存在するものである。このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体であり、複数のポリペプチド配列の中から、単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって獲得される。例えば、選択プロセスは、複数のクローン、例えば、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組み換えＤＮＡクローンのプールから、一意のクローンの選択を含んでもよい。選ばれた標的結合配列は、例えば、標的に対する親和性をさらに上げるために、標的結合配列をヒト化するため、多重特異的抗体を創出するためなどのために変えられてもよいこと、および、この標的結合配列を変えられた抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることを理解しなければならない。通常、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製品と違って、モノクローナル抗体調製品の、各モノクローナル抗体は、ある抗原の、ある単一決定基のみを指向する。その特異性の外に、モノクローナル抗体調製品は、通常、他の免疫グロブリンによって汚染されないという利点を有する。「モノクローナル」という修飾語は、抗体が、事実上均一な抗体集団から得られたものであることを示すものであって、その抗体が、何かの特定の方法によって生産されることを要求するものと考えてはならない。例えば、本発明にしたがって使用されるモノクローナル抗体は、種々の技術、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３－６８１，(Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８１)を参照）、組み換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号明細書を参照）、ファージディスプレイ技術（例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）；Ｓｉｄｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３８（２）：２９９－３１０（２００４）；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４０（５）：１０７３－１０９３（２００４）；Ｆｅｌｌｏｕｓｅ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０１（３４）：１２４６７－１２４７２（２００４）；および、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８４（１－２）：１１９－１３２（２００４）、および、ヒトの免疫グロブリン配列をコードする、ヒト免疫グロブリン座位または遺伝子の一部、または全てを有する動物において、ヒト、またはヒト様抗体を生産するための技術（例えば、国際公開第１９９８／２４８９３号パンフレット；国際公開第１９９６／３４０９６号パンフレット；国際公開第１９９６／３３７３５号パンフレット；国際公開第１９９１／１０７４１号パンフレット；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏ．，７：３３（１９９３）；米国特許第５，５４５，８０６号明細書；同第５，５６９，８２５号明細書；同第５，５９１，６６９号明細書（全て、ＧｅｎＰｈａｒｍ）；同第５，５４５，８０７号明細書；国際公開第１９９７／

１７８５２号パンフレット；米国特許第５，５４５，８０７号明細書；同第５，５４５，８０６号明細書；同第５，５６９，８２５号明細書；同第５，６２５，１２６号明細書；同第５，６３３，４２５号明細書；および同第５，６６１，０１６号号明細書；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）；Ｌｏｎｇｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６８：８５６－８５９（１９９４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ，３６８：８１２－８１３（１９９４）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４：８４５－８５１（１９９６）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４：８２６（１９９６）；および、Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３：６５－９３（１９９５）によって作製されてもよい。

【０１１６】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、最小の、非ヒト免疫グロブリン由来配列を含む、キメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、非ヒト動物種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギ、または、非ヒト霊長類の超可変領域によって置換されるヒト免疫グロブリンである。ある場合、ヒト免疫グロブリンの骨組構造領域（ＦＲ）の残基は、対応する、非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体、またはドナー抗体にも認められない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つの、通常は、二つの可変ドメインの事実上全てを含み、該可変ドメインにおいて、超可変ループの全て、または事実上全ては、非ヒト免疫グロブリンに対応し、ＦＲの全て、または事実上全ては、ヒトの免疫グロブリン配列である。さらに、ヒト化抗体は、免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を任意に含む。これ以上の詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９（１９８８）；および、Ｐｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照されたい。さらに、下記の総説、およびその中に引用される文献を参照されたい：Ｖａｓｗａｎｉ ａｎｄ Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ａｎｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ，Ａｓｔｈｍａ ＆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１：１０５－１１５（１９８８）；Ｈａｒｒｉｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ ２３：１０３５－１０３８（１９９５）；Ｈｕｒｌｅ ａｎｄ Ｇｒｏｓｓ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：４２８－４３３（１９９４）。

【０１１７】

「キメラ」抗体（免疫グロブリン）は、ある特定動物種由来の抗体、またはある特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一、または相同の重鎖および／または軽鎖の一部を有するが、一方、鎖（単数または複数）の残余部分は、それらが所望の生物活性を呈する限り、別の動物種由来の抗体、または、別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、および、そのような抗体の断片と同一か、または相同である（米国特許第４，８１６，５６７号明細書、およびＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１:６８５１－６８５５（１９８４））。本明細書で用いるヒト化抗体は、キメラ抗体のサブセットである。

【０１１８】

「単一鎖Ｆｖ」または“ｓｃＦｖ”抗体断片は、単一ポリペプチド鎖として存在する、抗体のＶＨおよびＶＬドメインを含む。一般に、ｓｃＦｖポリペプチドはさらに、該ｓｃＦｖポリペプチドが、抗原結合のために所望の構造を形成することが可能となるように、ＶＨおよびＶＬドメインの間にポリペプチドリンカーを含む。ｓｃＦｖに関する総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６

９－３１５（１９９４）を参照されたい。

【０１１９】

「抗原」とは、ある抗体が選択的に結合することが可能な、指定の抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、またはその他の、天然または合成化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが好ましい。

【０１２０】

「ダイアボディ」という用語は、二つの抗原結合部位を有する、小型の抗体断片であって、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）において軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む抗体断片を指す。同じ鎖の二つのドメインの対合を不可能とするほど短いリンカーを用いると、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合することを強制され、二つの抗原結合部位を創出する。ダイアボディーについては、例えば、欧州特許第４０４，０９７号明細書；国際公開第９３／１１１６１号パンフレット；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０:６４４４－６４４８（１９９３）により詳細に記載される。

【０１２１】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体、および／または、本明細書に開示されるヒト抗体の作製技術の内のいずれかを用いて作製される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体に関するこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に排除する。

【０１２２】

「親和性熟成」抗体とは、その、一つ以上のＣＤＲに、一つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更（単数または複数）を持たない親抗体と比べて、抗原に対する該抗体の親和性に向上がもたらされる抗体である。好ましい親和性熟成抗体は、標的抗原に対し、ナノモル、場合によってはピコモルの親和性を有する。親和性熟成抗体は、当該分野で既知の手順によって生産される。Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９－７８３（１９９２）は、ＶＨおよびＶＬドメインシャフリングによる親和性熟成を記載する。ＣＤＲおよび／または骨組構造残基のランダムな突然変異誘発が、Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３８０９－３８１３（１９９４）；Ｓｃｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ １６９：１４７－１５５（１９９５）；Ｙｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：１９９４－２００４（１９９５）；Ｊａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４（７）：３３１０－９（１９９５）；および、Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６（１９９２）に記載される。

【０１２３】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然のＦｃ領域配列、または、Ｆｃ領域アミノ酸配列変異種）による生物活性を指し、抗体アイソタイプに応じて変動する。抗体エフェクター機能の例としては：Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害性；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞介在細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方調整；およびＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１２４】

「抗体依存性細胞介在細胞傷害作用」または「ＡＤＣＣ」とは、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するＦｃ受容体（ＦｃＲ）に結合した分泌ＩｇＧは、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原担持標的細胞に対して特異的に結合し、次いで、該標的細胞を細胞毒素によって殺すことを可能とする、細胞傷害性の一形態である。抗体は、これらの細胞傷害性細胞を「武装」させるので、この殺作用には必須である。ＡＤＣＣを仲介する一次細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩしか発現しないが、一方、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞におけるＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２（１９９１）の４６４ページの表３にまとめられる。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するためには、イ

ンビトロＡＤＣＣアッセイ、例えば、米国特許第５，５００，３６２号明細書または同第５，８２１，３３７号明細書、または米国特許第６，７３７，０５６号明細書に記載されるアッセイを実行してもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、対象分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるものと同様の、動物モデルにおいて評価してもよい。

【０１２５】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一つ以上のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。この細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行することが好ましい。ＡＤＣＣを仲介するヒト白血球の例としては、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞傷害性Ｔ細胞、および好中球が挙げられるが、ＰＢＭＣおよびＮＫ細胞が好ましい。エフェクター細胞は、天然の供給源、例えば、血液から単離されてもよい。

【０１２６】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を記述する。好ましいＦｃＲは、ヒトＦｃＲの天然配列である。さらに、好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体に結合するもの（ガンマ受容体）で、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩサブクラスで、これらの受容体の、対立遺伝子変異種、および選択的スプライス形を含む受容体である。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性化受容体」）およびＦｃγＲＩＩＢ（「抑制受容体」）を含む。これらは、主に、その細胞原形質ドメインにおいて異なるだけの、近似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞原形質ドメインに、免疫受容体のチロシン主体活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含む。抑制受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞原形質ドメインに、免疫受容体のチロシン主体抑制モチーフ（ＩＴＩＭ）を含む（Ｄａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３－２３４（１９９７）による総説を参照）。ＦｃＲは、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５－３４（１９９４）；および、ｄｅ Ｈａａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１（１９９５）において総説されている。将来特定されるものも含めて、他のＦｃＲも、本明細書の、この用語“ＦｃＲ”によって包含される。本用語はさらに新生児受容体のＦｃＲであって、母親のＩｇＧの胎児への輸送を担当し（Ｇｕｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）、およびＫｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））、免疫グロブリンのホメオスターシスを調節する受容体を含む。国際公開第００／４２０７２号パンフレット（Ｐｒｅｓｔａ）は、ＦｃＲへの結合が向上、または低減させられた抗体変異種を記載する。この特許公報の内容を、特に指定して引用により本明細書に含める。さらに、Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい。

【０１２７】

ＦｃＲへの結合を測定する方法は既知である（例えば、Ｇｈｅｔｉｅ １９９７，Ｈｉｎｔｏｎ ２００４）。インビボにおけるヒトＦｃＲｎに対する結合、ヒトＦｃＲｎに対する高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウスにおいて、または、トランスフェクションしたヒト細胞系統において、または、Ｆｃ変異ポリペプチドを投与した霊長類において、定量することが可能である。

【０１２８】

「補体依存性細胞傷害性」、または“ＣＤＣ”とは、補体の存在下における標的細胞の分解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体システムの第１成分（Ｃ１ｑ）の、その認識抗原に結合した（適切なサブクラスの）抗体に対する結合によって起動される。補体

の活性化を評価するためには、ＣＤＣアッセイ、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載されるものと同様のアッセイを実行してもよい。

【０１２９】

Ｆｃ領域のアミノ酸配列を変えられ、Ｃ１ｑ結合能が上昇、または下降させられたポリペプチド変異種が、米国特許第６，１９４，５５１Ｂ１号明細書、および国際公開第９９／５１６４２号パンフレットに記載される。これらの特許公開公報の内容を、特に指定して引用により本明細書に含める。さらに、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４:４１７８－４１８４（２０００）を参照されたい。

【０１３０】

「Ｆｃ領域含有ポリペプチド」という用語は、Ｆｃ領域を含む、抗体または免疫アドヘジン（下記の定義参照）などのポリペプチドを指す。Ｆｃ領域のＣ－末端リジン（ＥＵ番号付けシステムによると残基４４７）は、例えば、該ポリペプチドの精製時、または、該ポリペプチドをコードする核酸の組み換え加工によって除去してもよい。したがって、Ｆｃ領域を有するポリペプチドを含有する、本発明による組成物は、Ｋ４４７含有ポリペプチド、全Ｋ４４７除去ポリペプチド、または、Ｋ４４７含有、およびＫ４４７非含有ポリペプチドの混合物を含むことが可能である。

【０１３１】

「阻止性」抗体、または「拮抗」抗体とは、それが結合する抗原の生物活性を抑制するか、または低減する抗体である。好ましい阻止性抗体または拮抗抗体は、抗原の生物活性を、事実上または完全に抑制する。

【０１３２】

本明細書で用いる「作用抗体」とは、対象ポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

【０１３３】

本発明の目的のための「ヒトアクセプター骨組構造」とは、ヒトの免疫グロブリン骨組構造、またはヒトの共通骨組構造から導かれる、ＶＬまたはＶＨ骨組構造のアミノ酸配列を含む骨組構造である。ヒト免疫グロブリン骨組構造、またはヒト共通骨組構造「から導かれる」ヒトアクセプター骨組構造は、それと同じアミノ酸配列を含んでもよいし、あるいは、それに先行するアミノ酸配列変化を含んでもよい。先行アミノ酸変化が存在する場合、先行アミノ酸変化は、好ましくは５個以下、好ましくは４個以下、または３個以下である。先行アミノ酸変化がＶＨに存在する場合、その変化は、位置７１Ｈ、７３Ｈ、および７８Ｈの内の三つ、二つ、または一つだけにあることが好ましい：例えば、これらの位置におけるアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔ、および／または７８Ａであってもよい。一実施態様では、ヒトのＶＬアクセプター骨組構造は、配列において、ヒトのＶＬ免疫グロブリン骨組配列、またはヒトの共通骨組構造配列と同じである。

【０１３４】

「ヒトの共通骨組構造」とは、ヒトの免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ骨組構造配列の選択において、もっとも普通に出現するアミノ酸残基を代表する骨組構造である。一般に、ヒトの免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループから行われる。一般に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔらの言うサブグループである。一実施態様では、ＶＬに関しては、サブグループは、Ｋａｂａｔらの言うように、サブグループカッパＩである。一実施態様では、ＶＨに関しては、サブグループは、Ｋａｂａｔらの言うように、サブグループＩＩＩである。

【０１３５】

「ＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造」は、Ｋａｂａｔらの重鎖可変領域サブグループＩＩＩのアミノ酸配列から得られる共通配列を含む。一実施態様では、ＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造アミノ酸配列は、下記の配列：

【０１３６】

【化４】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号 42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (配列番号 43)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号 44)-H3-WGQGTLVTVSS (配列番号 45).

それぞれの少なくとも一部、または全てを含む。

【０１３７】

「ＶＬサブグループＩ共通骨組構造」は、Ｋａｂａｔらの軽鎖可変領域カッパサブグループＩのアミノ酸配列から得られる共通配列を含む。一実施態様では、ＶＨサブグループＩ共通骨組構造アミノ酸配列は、下記の配列：

【０１３８】

【化５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号 46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号 47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号 48)-L3-FGQGTKVEIK (配列番号 49).

それぞれの少なくとも一部、または全てを含む。

【０１３９】

「障害」または「疾患」とは、本発明の物質／分子、または方法による処置を施した場合、それによって利益を受けると予想される全ての状態である。これは、慢性および急性の障害または疾患であって、哺乳動物を、問題の障害に対して罹りやすくさせる病的状態を含む。本発明において処置される障害の非限定的例として、悪性および良性腫瘍；上皮癌、芽細胞腫、および肉腫を含む。

【０１４０】

「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖と関連する障害を指す。一実施態様では、細胞増殖性障害は癌である。

【０１４１】

本明細書で用いる「腫瘍」とは、悪性であると良性であるとを問わず、全ての、新生の細胞成長および増殖、および、全ての前癌および癌様細胞および組織を指す。「癌」、「癌様」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」は、本明細書において言及される場合、相互に排除的ではない。

【０１４２】

「癌」および「癌様」という用語は、通常、無統制な細胞成長／増殖によって特徴づけられる、哺乳動物における生理的状態を指すか、または記述する。癌の例として、例えば、ただしこれらに限定されないが、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このような癌のより詳細な例として、例えば、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、すい臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、メラノーマ、および、種々の頭部および頸部癌が挙げられる。無統制な血管形成は、本発明の組成物および方法によって処置することが可能な多くの障害を招く。それらの障害は、非新形成、および新形成病態の両方を含む。新形成物としては、例えば、前述のものが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。非新形成障害としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、不快な、または異常な過形成、関節炎、慢性関節リューマチ（ＲＡ）、乾癬、乾癬プラーク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、アテローム硬化プラーク、糖尿病性、およびその他の増殖性網膜症で、例えば、未熟児網膜症などの網膜症、水晶体後線維増殖、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新形成、移植角膜組織血管新形成、移植角膜組織の免疫拒絶反応、網膜／脈絡膜血管新形成、隅角血管新形成（ルベオーシス）、眼内血管新生病、血管再狭窄、

動静脈変形（ＡＶＭ）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺過形成（グレーブズ病を含む）、角膜およびその他の組織の移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺傷害／ＡＲＤＳ、敗血症、一次肺高血圧、悪性肺滲出、脳浮腫（例えば、急性発作／閉塞性頭部傷害／外傷と関連する）、滑膜炎症、ＲＡにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、過栄養骨形成、骨関節炎（ＯＡ）、難治性腹水、多のう胞卵巣疾患、子宮内膜炎、流体疾患（すい臓炎、仕切り症候群、火傷、腸疾患）の第３間隔、子宮類線維腫、早産、ＩＢＤ（クローン病および潰瘍性結腸炎）などの慢性炎症、腎臓異種移植拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、不快な、または異常な組織塊の成長（非癌）、出血性関節、肥大瘢痕、毛髪成長抑制、オスラー－ウェーバー症候群、膿形成肉芽腫、水晶体後線維増殖、強皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心内膜液滲出（心膜炎に関連するものなど）、および胸水滲出が挙げられる。

【０１４３】

本明細書で用いる「処置」とは、処置される個体または細胞の天然のコースを変えようとする試みとしての臨床的介入を指し、予防のためか、または臨床病理の進行時のいずれかに実行することが可能である。処置の望ましい作用としては、病気の発生または再発の阻止、症状の緩和、いずれのものであれ、病気の直接または間接の病理的結果の低減、転移の阻止、病気の進行速度の低下、病状の寛解または緩和、および、治癒または予後の改善が挙げられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、疾病または障害の発達を遅らせるために使用される。

【０１４４】

「個体」とは、脊椎動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。哺乳動物としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、農場動物（例えば、ウシ）、スポーツ動物、ペット（例えば、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類、マウス、およびラットが挙げられる。

【０１４５】

処置のための「哺乳動物」とは、哺乳動物として分類される任意の動物、例えば、ヒト、家畜、および農場動物、および動物園動物、スポーツ動物、またはペット動物（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【０１４６】

「有効量」とは、所望の治療または予防結果を実現するために必要な、投与回数および期間において有効な量を指す。

【０１４７】

本発明の物質／分子、作用剤または拮抗剤の「治療的有効量」は、要因、例えば、個体の病状、年齢、性別、および体重、および、物質／分子、作用剤または拮抗剤の、該個体において所望の反応を誘起する能力に応じて変動してよい。さらに、治療的有効量とは、その量においては、治療的有効作用の方が、該物質／分子、作用剤または拮抗剤の、何らかの毒作用または有害作用よりも優勢となる量である。「予防的有効量」とは、所望の予防結果を実現するために必要な、投与回数および期間において有効な量を指す。通常、ただし常にそうであるとは限らないが、予防用量は、病気の前、または初期段階で使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量よりも少ない。

【０１４８】

本明細書で用いる「細胞傷害剤」という用語は、細胞の機能を抑制または阻止するか、および／または、細胞の破壊を誘起する物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、およびＬｕの放射性同位元素）、化学療法剤、例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他の仲介性薬剤、酵素およびその断片（例えば、核酸分解酵素）、抗生物質、および毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の小型分子毒素または酵素的に活性の毒素で、その断片および／または変異種を含む毒素）、および、後述の、

各種抗腫瘍剤または抗癌剤を含むことが意図される。他の細胞傷害剤は後述される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。

【０１４９】

「化学療法剤」とは、癌の処置に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパ、およびＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロスフォスファミド；スルフォン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；エチレンイミンおよびメチルアメラミン、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンフォスフォルアミド、トリエチレンチオフォスフォルアミド、およびトリメチロロメラミンなど；アセトゲニン（特に、ブラタシンおよびブラタシノン）；デルター９－テトラヒドロカナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標））；ベーターラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類縁体トポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ（登録商標））、ＣＰＴ－１１（イリノテカン、ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および９－アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類縁体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィル酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン（合成類縁体ＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エルカセロビン；パンクラティスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロールナファジン、クロロフォスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン；抗生物質、例えば、エネジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特に、カリケアミシンガンマ１Ｉ，およびカリケアミシンオメガＩ１（例えば、Ａｇｎｅｗ，Ｃｈｅｍ Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１８３－１８６（１９９４）を参照））；ダイネミシン、例えば、ダイネミシンＡなど；エスペラミシン；および、ネオカルジノスタチン発色団、および関連発色タンパク・エネジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロロマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）ドキソルビシン（モルフォリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、およびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗体謝剤、例えば、メトトレキセート、および５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸類縁体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート；プリン類縁体、例えば、フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類縁体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸；アセグラトン；アルドフォスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダ

イニン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシン、およびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）ポリサッカリド複合体（ＪＨＳ Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２′，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、Ｔ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ（登録商標）、ＦＩＬＤＥＳＩＮ（登録商標））；ダカルバジン；マノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（“Ａｒａ－Ｃ”）；チオテパ；タキソイド、例えば、ＴＡＸＯＬ（登録商標）パクリタキセル（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（登録商標）パクリタキセルの、クレモフォル非含有、アルブミン加工ナノ粒子処方（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐａｒｔｎｅｒｓ，Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）、およびＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）ドキセタキセル（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ，Ａｎｔｏｎｙ，Ｆｒａｎｃｅ）；クロランブシル；ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標））；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類縁体、例えば、シスプラチン、およびカルボプラチン；ビンブラスチン（ＶＥＬＢＲＡＮ（登録商標））；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩＮ（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボビン；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド、例えば、レチン酸；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））；前記の内のいずれかの、製薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体；および、前記の二つ以上の組み合わせ、例えば、ＣＨＯＰ、すなわち、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニソロンの併用治療の短縮形、およびＦＯＬＦＯＸ、すなわち、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標））と、５－ＦＵおよびロイコボビンとの組み合わせによる処置処方の短縮形が挙げられる。

【０１５０】

さらにこの定義に含まれるものは、癌の増殖を促進することが可能なホルモンの作用を調整、低減、阻止、または抑制するように作用する抗ホルモン剤であり、体系的、または全身処置の形を取ることが多い。抗ホルモン剤は、それ自身がホルモンであってもよい。例としては、抗エストロゲン、および、選択的エストロゲン受容体修飾剤（ＳＥＲＭ）、例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェンを含む）、ＥＶＩＳＴＡ（登録商標）ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、およびＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）トレミフェンなど；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方調整剤（ＥＲＤ）；卵巣を抑制または機能停止するように働く薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）作用剤、例えば、ＬＵＰＲＯＮ（登録商標）およびＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標）酢酸ルプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、およびトリプテレリン；その他の抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、およびビカルタミド；および、副腎におけるエストロゲン生産を調整する酵素アロマターゼを抑制する、アロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）酢酸メゲストロール、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタニー、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）ボロゾール、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）レトロゾール、およびＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）アナストロゾールが挙げられる。さらに、この化学療法剤の定義は、ビスフォスフォネート、例えば、クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）、またはＯＳＴＡＣ（登録商標））、ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標）エピドロネート、ＮＥ－５８０９５、ＺＯＭＥＴＡ

（登録商標）ゾレドロン酸／ゾレドロネート、ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標）アレンドロネート、ＡＲＥＤＩＡ（登録商標）パミドロネート、ＳＫＥＬＩＤ（登録商標）チルドロネート、またはＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標）リセドロネート；および、トロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類縁体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の遺伝子、例えば、ＰＫＣ－アルファ、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、および、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦ－Ｒ）の遺伝子の発現を抑制するもの；ワクチン、例えば、ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチン、および遺伝子治療ワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、およびＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチン；ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；ラパチニブジトシレート（ＥｒｂＢ－２およびＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小型分子阻害剤、ＧＷ５７２０１６とも呼ばれる）；および、前記の内のいずれかの製薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体を含む。

【０１５１】

本明細書で用いる「増殖阻害剤」とは、インビトロ、またはインビボのいずれかにおいて細胞（例えば、ＤＬＬ４を発現する細胞）の増殖を抑制する化合物または組成物を指す。したがって、この増殖阻害剤は、Ｓ期の細胞（例えば、ＤＬＬ４を発現する細胞）のパーセントを著明に減らすものであってもよい。増殖阻害剤の例としては、細胞周期の進行を阻止する（Ｓ期以外の時点において）薬剤、例えば、Ｇ１停止およびＭ－期停止を誘発する薬剤が挙げられる。古典的Ｍ期阻止剤としては、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン、およびトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンが挙げられる。Ｇ１停止させ、さらに進んでＳ期停止をもたらす薬剤は、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、およびａｒａ－Ｃである。さらに詳細な情報は、Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｍｅｎｄｅｌｓｏｈｎ ａｎｄ Ｉｓｒａｅｌ，ｅｄｓ．，Ｃｈａｐｔｅｒ １，表題“Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ｏｎｃｏｇｅｎｅｓ，ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ”，Ｍｕｒａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ：Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９５）、特に１３ページに見出すことができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、いずれも、樹木いちいから得られる抗癌剤である。ヨーロッパいちいから得られるドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｐｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｐｏｒｅｒ）は、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）の半合成類縁体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、脱重合を阻止することによって微小管を安定化し、これは、細胞分裂の抑制をもたらす。

【０１５２】

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

【０１５３】

「抗腫瘍組成物」という用語は、少なくとも一つの活性治療剤、例えば、「抗癌剤」を含む、癌の処置に有用な組成物を指す。治療剤（抗癌剤、本明細書では、別に「抗腫瘍剤」とも呼ばれる）の例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、放射線療法に使用される薬剤、抗血管形成剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、トキシン、および、他の癌処置薬、例えば、抗ＶＥＧＦ中和性抗体、ＶＥＧＦ拮抗剤、抗ＨＥＲ－２、抗ＣＤ２０、表皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）拮抗剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ阻害剤、エルロチニブ、ＣＯ

Ｘ－２阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、またはＶＥＧＦ受容体（単数または複数）の内の一つ以上に結合する、拮抗剤（例えば、中和性抗体）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）および／または幹細胞因子（ＳＣＦ）に対する受容体チロシンキナーゼの阻害剤（例えば、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標）Ｎｏｖａｒｔｉｓ））、ＴＲＡＩＬ／Ａｐｏ２Ｌ、および、その他の、生物活性および有機化学薬剤などが挙げられる。

【０１５４】

本出願で用いられる「プロドラッグ」という用語は、製薬学的活性物質の前駆体または誘導体であって、親薬剤と比べて、腫瘍細胞に対しより細胞傷害性が低く、酵素的に活性化または変換されて、より活性的な親形態になるものを指す。例えば、Ｗｉｌｍａｎ，“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ，１４，ｐｐ．３７５－３８２，６１５ｔｈ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｂｅｌｆａｓｔ（１９８６）、および Ｓｔｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ：Ａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｂｏｒｃｈａｒｄｔ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄ．），ｐｐ．２４７－２６７，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（１９８５）を参照されたい。本発明のプロドラッグとしては、例えば、ただしこれらに限定されないが、リン酸塩含有プロドラッグ、チオフォスフェート含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Ｄ－アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ベーターラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されるフェノキシアセタミド含有プロドラッグ、または任意に置換されるフェニルアセタミド含有プロドラッグ、５－フルオロシトシン、および、より活性の高い細胞傷害性遊離薬剤に変換することが可能な、他の５－フルオロウリジンプロドラッグが挙げられる。本発明において使用するためにプロドラッグ形に誘導体形成することが可能な細胞傷害剤の例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、前述の化学療法剤が挙げられる。

【０１５５】

「抗血管形成剤」または「血管形成阻害剤」とは、血管形成、脈管形成、または不要な血管透過性を直接・間接に抑制する、低分子量物質、ポリヌクレオチド（例えば、抑制性ＲＮＡ（ＲＮＡｉまたはｓｉＲＮＡ））、ポリペプチド、単離タンパク、組み換えタンパク、抗体、その複合体または融合タンパクを指す。例えば、抗血管形成剤は、上に定義した血管形成剤に対する抗体または他の拮抗剤、例えば、ＶＥＧＦに対する抗体、ＶＥＧＦ受容体、可溶性ＶＥＧＦ受容体断片に対する抗体、または、ＶＥＧＦ受容体シグナル伝達を阻止する小型分子（例えば、ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２８４、ＳＵ６６６８、ＳＵＴＥＮＴ（登録商標）／ＳＵ１１２４８（スニチニブマレート）、ＡＭＧ７０６、または、例えば、国際公開第２００４／１１３３０４号パンフレットに記載されるもの）である。抗血管形成剤はさらに、天然の血管形成阻害剤、例えば、アンギオスタチン、エンドスタチンなどを含む。例えば、Ｋｌａｇｓｂｒｕｎ ａｎｄ Ｄ'Ａｍｏｒｅ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，５３：２１７－３９（１９９１）；Ｓｔｒｅｉｔ ａｎｄ Ｄｅｔｍａｒ，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２２：３１７２－３１７９（２００３）（例えば、表３は、悪性メラノーマにおける抗血管形成治療を掲げる）；Ｆｅｒｒａｒａ ＆ Ａｌｉｔａｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ５（１２）：１３５９－１３６４（１９９９）；Ｔｏｎｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２２：６５４９－６５５６（２００３）（例えば、表２は、抗血管形成因子を列挙する）；および、Ｓａｔｏ Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，８：２００－２０６（２００３）（例えば、表１は、臨床治験で使用された抗血管形成剤を列挙する）を参照されたい。

本発明の組成物、およびその作製法

本発明は、抗ＤＬＬ４抗体を含む製薬組成物を含む組成物、および抗ＤＬＬ４抗体をコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。本明細書で用いる組成物は、ＤＬＬ４に結合する、一つ以上の抗体、および／または、ＤＬＬ４に結合する、一つ以上の抗体を

コードする配列を含む、一つ以上のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物はさらに、適切な担体、例えば、製薬学的に受容可能な賦形剤、例えば、当該分野で周知のバッファーを含む賦形剤を含んでもよい。

【０１５６】

本発明はさらに、単離抗体およびポリヌクレオチドの実施態様を包含する。本発明はさらに、事実上純粋な抗体、およびポリヌクレオチドの実施態様を包含する。

【０１５７】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体はモノクローナルであることが好ましい。さらに、本発明の範囲に含まれるものは、本明細書に提供される抗ＤＬＬ４抗体のＦａｂ、Ｆａｂ′、Ｆａｂ′－ＳＨ、およびＦ（ａｂ′）$_2$断片である。これらの抗体断片は、酵素消化などの従来手段によって創出してもよいし、あるいは、組み換え技術によって生成してもよい。この抗体断片は、キメラであっても、またはヒト化されていてもよい。これらの断片は、下記に記載される診断および治療目的のために有用である。

【０１５８】

モノクローナル抗体は、事実上均一な抗体の集団から獲得される。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量において天然に出現する可能性のある突然変異を除いては、同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、別々の抗体の混合物ではないという、その抗体の特徴を示す。

【０１５９】

本発明の抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、最初にＫｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって記載されたハイブリドーマ法を用いて作製することが可能であるが、あるいは、組み換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）によって作製してもよい。

【０１６０】

ハイブリドーマ法では、マウス、またはその他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターを免疫化して、免疫化のために使用されたタンパクに対して特異的に結合する抗体を生産する、または生産することが可能なリンパ球を誘起する。ＤＬＬ４に対する抗体は、一般に、ＤＬＬ４およびアジュバントを複数回皮下（ｓｃ）、または腹腔内（ｉｐ）に注入することによって誘起する。ＤＬＬ４は、当該分野で周知の方法によって調製してもよく、そのあるものは、下記に本明細書において記述される。一実施態様では、免疫グロブリン重鎖のＦｃ部分に融合したＤＬＬ４の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、ＤＬＬ４誘導体によって動物を免疫化する。好ましい実施態様では、ＤＬＬ４－ＩｇＧ１融合タンパクで動物を免疫化する。動物は、通常、ＤＬＬ４と、モノフォスフォリル脂質Ａ（ＭＰＬ）／トレハロースジクリノミコレート（ＴＤＭ）（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）との、免疫原性融合体または誘導体に対して免疫化され、溶液は、複数箇所の皮内に注入される。２週間後、動物をブーストする。７から１４日後、動物は採血され、血清について抗ＤＬＬ４力価を定量した。力価がプラトーに達するまで動物をブーストした。

【０１６１】

それとは別に、リンパ球は、インビトロで免疫化してもよい。次に、リンパ球を、適切な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いて骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１６２】

このように調製したハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の、親の骨髄腫細胞の増殖または生存を抑制する、一つ以上の物質を含む、適切な培養培地に撒き、育成する。例えば、もしも、親の骨髄腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠くならば、ハイブリドーマ用の培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（ＨＡＴ培地）

、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠乏細胞の増殖を阻止する。

【０１６３】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選ばれた抗体生産細胞による抗体の安定な高レベル生産を支持し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性を持つものである。これらの中でも、好ましい骨髄腫細胞系統は、マウスの骨髄腫細胞系統、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ＵＳＡから入手が可能な、ＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍から得られたもの、および、米国基準菌株保存機関、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ，ＵＳＡから入手が可能なＳｐ－２またはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞である。ヒトのモノクローナル抗体の生産用として、ヒトの骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞系統が従来から記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１６４】

ハイブリドーマ細胞が成育する培養培地は、ＤＬＬ４に向けたモノクローナル抗体の生産に関して定量される。ハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法、または、インビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、または固相酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）によって定量することが好ましい。

【０１６５】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって定量することが可能である。

【０１６６】

所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が特定された後、このクローンを、限界希釈処置によってサブクローンし、標準的方法によって育成してもよい（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭ、またはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において、腹水腫瘍としてインビボで育成してもよい。

【０１６７】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、通例の免疫グロブリン精製処置、例えば、プロテインＡ－セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーによって、培養培地、腹水液、または血清から適切に分離される。

【０１６８】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、併合ライブラリーを用い、所望の一つの活性、または複数の活性を有する合成抗体クローンを求めてスクリーニングすることによって作製することも可能である。原理的には、ファージコートタンパクに融合した抗体可変領域（Ｆｖ）の各種断片を提示するファージを含むファージライブラリーをスクリーニングすることによって、合成抗体クローンが選択される。このようなファージライブラリーは、所望の抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別にかけられる。所望の抗原に結合することが可能なＦｖ断片を発現するクローンは、抗原に吸着され、したがって、ライブラリー中の非結合クローンから分離される。次に、この結合クローンは、抗原から溶出され、さらに、抗原吸着／溶出から成る数サイクルを重ねることによって濃縮させることが可能である。本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、どれも、適切な抗原スクリーニング処置を設計し、対象ファージクローンを選別し、次いで、該対象ファージクローンのＦｖ配列、お

よび、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３に記載される、適切な定常領域（Ｆｃ）を用いて、完全長の、抗ＤＬＬ４抗体クローンを構築することによって獲得することが可能である。

【０１６９】

抗体の抗原結合ドメインは、約１１０アミノ酸から成る、二つの可変（Ｖ）領域、一方は、軽鎖（ＶＬ）由来のもの、もう一方は重鎖（ＶＨ）由来のものから形成される。これらは、共に、三つの超可変ループ、すなわち、相補性決定領域（ＣＤＲ）を提示する。可変ドメインは、ファージにおいて、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、ＶＨおよびＶＬが、短い、屈曲性のペプチドで共有的に連結される、単一鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片として、あるいは、それぞれが定常ドメインに融合され、非共有的に相互作用を持つ、Ｆａｂ断片として機能的に提示することが可能である。本明細書で用いる場合、ｓｃＦｖをコードするファージクローン、およびＦａｂをコードするファージクローンは、まとめて「Ｆｖファージクローン」、または「Ｆｖクローン」と呼ぶ。

【０１７０】

ＶＨおよびＶＬ遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって別々にクローンし、ファージライブラリーにおいてランダムに再結合させ、次いで、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化された供給源から得られたライブラリーは、ハイブリドーマの構築を要することなく、免疫原に対し高い親和性を持つ抗体を提供する。それとは別に、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ，１２：７２５－７３４（１９９３）によって記載されるように、天然のレパトーリーをクローン化して、全く免疫化無しで得られる、広範な非自己および自己抗原に対する、単一供給源のヒト抗体を得ることが可能である。最後に、天然のライブラリーは、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）に記載されるように、幹細胞由来の、未再編成Ｖ－遺伝子セグメントを合成的にクローンし、超可変のＣＤＲ３領域をコードするランダム配列を含むＰＣＲプライマーを用い、インビトロで再編成を実行することによって合成的に作製することが可能である。

【０１７１】

繊維状ファージを用い、マイナーコートタンパクｐＩＩＩに融合させることによって抗体断片を提示する。この抗体断片は、例えば、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載されるように、ＶＨおよびＶＬが、屈曲性ポリペプチドスペーサによって同じポリペプチド鎖に接続される、単一鎖Ｆｖ断片として提示することが可能であり、あるいは、例えば、Ｈｏｏｇｅｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９:４１３３－４１３７（１９９１）に記載されるように、一方の鎖はｐＩＩＩに融合され、他方鎖は、細菌宿主細胞の細胞周辺腔に分泌され、そこで、Ｆａｂ－コートタンパク構造の集合体が、野生型コートタンパクのあるものを押しのけることによってファージ表面に提示されるＦａｂ断片として提示することが可能である。

【０１７２】

一般に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒトまたは動物から採取される免疫細胞から得られる。抗ＤＬＬ４クローンに偏向したライブラリーが所望ならば、被検体をＤＬＬ４で免疫化し、抗体反応を発生させ、脾臓細胞、および／または、循環性Ｂ細胞、他の抹消血リンパ球（ＰＢＬ）を回収して、ライブラリー構築に備える。好ましい実施態様では、抗ＤＬＬ４クローンに偏向した、ヒトの抗体遺伝子断片ライブラリーは、機能的なヒトの免疫グロブリン遺伝子アレイを担持する（かつ、機能的な内因性抗体生産システムを欠如する）トランスジェニックマウスにおいて、抗ＤＬＬ４抗体反応を発生させ、そうす

ることによって、ＤＬＬ４免疫化が、ＤＬＬ４に対するヒト抗体を生産するＢ細胞を生じるようにさせることによって得られる。ヒト抗体を生産するトランスジェニックマウスの生成は後述される。

【０１７３】

抗ＤＬＬ４反応細胞集団をさらに濃縮するには、ＤＬＬ４特異的膜結合抗体を発現するＢ細胞を単離するための、適切なスクリーニング処理、例えば、ＤＬＬ４アフィニティークロマトグラフィーによる細胞分離、または、細胞を、フルオロクロム標識ＤＬＬ４に吸着させ、次いで、蛍光表示細胞分取法（ＦＡＣＳ）を用いることによって実現することが可能である。

【０１７４】

それとは別に、免疫化されないドナーからの脾臓細胞、および／またはＢ細胞、または他のＰＢＬを用いることによって、可能な抗体ライブラリーの、より優れた代表物が得られ、かつ、ＤＬＬ４が抗原性ではない動物種（ヒト、または非ヒト）による抗体ライブラリーの構築が可能となる。インビトロで抗体遺伝子構築体を組み込んだライブラリーのためには、幹細胞を被検体から採取すると、未再編成抗体遺伝子セグメントをコードする核酸が得られる。対象免疫細胞は、様々の動物種、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ類、ｌｕｐｒｉｎｅ、イヌ類、ネコ類、ブタ類、ウシ類、ウマ類、および鳥類などから得ることが可能である。

【０１７５】

抗体の可変領域遺伝子セグメント（ＶＨおよびＶＬセグメントを含む）をコードする核酸は、対象細胞から回収され、増幅される。再編成済みＶＨおよびＶＬ遺伝子ライブラリーの場合は、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），８６：３８３３－３８３７（１９８９）に記載されるように、リンパ球からゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡを単離し、次いで、再編成済みＶＨおよびＶＬ遺伝子の５′および３′末端に適合するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を実行することによって種々のＶ遺伝子レパートリーを発現させることによって、所望ＤＮＡを得ることが可能である。Ｏｒｌａｎｄｉら（１９８９）およびＷａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４１：５４４－５４６（１９８９）に記載されるように、成熟Ｖ－ドメインをコードするエキソンの５′末端に逆行プライマー、およびＪ－セグメント内部に基づく順行プライマーを用いて、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡからＶ遺伝子を増幅することが可能である。しかしながら、ｃＤＮＡから増幅する場合には、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９：８８－８９（１９９１）に記載されるように、逆行プライマーはさらに、リーダーエキソンに基づいてもよく、順行プライマーは、Ｓａｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），８６：５７２８－５７３２（１９８９）に記載されるように、定常領域内部に基づいてもよい。相補性を最大にするためには、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）またはＳａｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．（１９８９）に記載されるように、プライマーの中に縮重を組み込んでもよい。ライブラリーの多様性は最大化することが好ましいが、そのためには、例えば、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）の方法に記載されるように、あるいは、Ｏｒｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１：４４９１－４４９８（１９９３）の方法に記載されるように、免疫細胞核酸サンプル中に存在する、利用可能な全てのＶＨおよびＶＬ再編成体を増幅するために、各Ｖ－遺伝子ファミリーを標的としたＰＣＲプライマーを使用する。増幅ＤＮＡを発現ベクターにクローンするために、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）によって記載されるように、一端のタグとして、ＰＣＲプライマーの内部に、希少な制限部位を導入することも可能であるし、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）に記載されるように、標識プライマーによってさらにＰＣＲ増幅することによって導入することも可能である。

【０１７６】

合成的に再編成されたＶ遺伝子レパートリーを、インビトロでＶ遺伝子セグメントから

得ることが可能である。ヒトのＶＨ－遺伝子セグメントの多くは、クローニングされ、配列決定され（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：７７６－７９８（１９９２）に報告される）、かつマップされる（Ｍａｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ．，３：８８－９４（１９９３）に報告される）。これらのクローニングされたセグメント（Ｈ１およびＨ２ループの、全ての大きな立体配座を含む）を用いて、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）に記載されるように、種々の配列および長さを持つＨ３ループをコードするＰＣＲプライマーを用いて、多様なＶＨ遺伝子レパートリーを生成することが可能である。さらに、ＶＨレパートリーは、Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４４５７－４４６１（１９９２）に記載されるように、全ての配列多様性を、単一長の長いＨ３ループに基づいて作製することが可能である。ヒトのＶκおよびＶλセグメントは、クローニングされ、配列決定されており（Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２３：１４５６－１４６１（１９９３）に報告される）、それらを用いて合成の軽鎖レパートリーを作製することが可能である。ある範囲のＶＨおよびＶＬフォールド、およびＬ３およびＨ３長に基づく、合成Ｖ遺伝子レパートリーは、相当の構造的多様性の抗体をコードする。Ｖ－遺伝子コードＤＮＡの増幅後、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）の方法にしたがって、生殖系列Ｖ－遺伝子セグメントをインビトロで再編成することが可能である。

【０１７７】

抗体断片のレパートリーは、ＶＨおよびＶＬ遺伝子レパートリーをいくつかのやり方で組み合わせることによって構築することが可能である。各レパートリーは、異なるベクターにおいて創出することが可能であり、これらのベクターは、例えば、Ｈｏｇｒｅｆｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１２８：１１９－１２６（１９９３）に記載されるようにインビトロで組み合わせることも可能であるし、あるいは、例えば、組み合わせ感染によって、例えば、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２１：２２６５－２２６６（１９９３）に記載されるｌｏｘＰシステムを用いて、インビボで組み合わせることも可能である。このインビボ組み合わせ法は、大腸菌の形質転換効率によって課せられるライブラリーサイズの制限を克服するために、Ｆａｂ断片の二鎖性を利用する。天然のＶＨおよびＶＬレパートリーを別々に、一方はファージミドに、他方はファージベクターにクローニングする。次に、ファージミド含有細菌をファージ感染して、各細胞が異なる組み合わせを持ち、かつ、ライブラリーサイズは、存在する細胞の数（約10^{12}クローン）によってのみ制限されるようにして、二つのライブラリーを組み合わせる。両ベクターとも、インビボ再編シグナルを含むので、ＶＨおよびＶＬ遺伝子は、単一レプリコンに再結合され、ファージ粒子に共同パックされる。これらの巨大ライブラリーによって、高親和性（約10^{-8}ＭのＫｄ$^{-1}$）の多様な抗体が多数得られる。

【０１７８】

それとは別に、レパートリーは、例えば、Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：７９７８－７９８２（１９９１）に記載されるように、同じベクターに順次クローニングされてもよいし、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）に記載されるように、ＰＣＲによって一種に組立てしてから、クローニングしてもよい。ＰＣＲ組立ては、屈曲性ペプチドスペーサをコードするＤＮＡによってＶＨおよびＶＬ　ＤＮＡを連結して、単一鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）レパートリーを形成するために使用することが可能である。さらに別の技術では、Ｅｍｂｌｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２０：３８３１－３８３７（１９９２）に記載されるように、「細胞内ＰＣＲ組立て」を用いて、ＰＣＲによってリンパ球内でＶＨおよびＶＬ遺伝子を結合し、次いで、連結遺伝子のレパートリーをクローニングする。

【０１７９】

天然ライブラリー（天然か、または合成）によって生産される抗体は、中等の親和性（約10^6から$10^7 M^{-1}$のKd^{-1}）を持つことが可能であるが、上記Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）に記載されるように、二次ライブラリーを構築し、その中から再選択することによって親和性熟成をインビトロで模倣することが可能である。例えば、Ｈｏｗｋｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２６：８８９－８９６（１９９２）の方法、または、Ｇｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８９：３５７６－３５８０（１９９２）の方法にあるように、間違え易いポリメラーゼ（Ｌｅｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，１：１１－１５（１９８９）に報告される）を用いることによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することが可能である。さらに、選ばれた個別のＦｖクローンにおいて、対象ＣＤＲにまたがる、ランダム配列を有すプライマーによるＰＣＲを用いることによって、一つ以上のＣＤＲにランダムに突然変異を発生させ、比較的高度な親和性を持つクローンを求めてスクリーニングすることによって、親和性熟成を実行することが可能である。国際公開第９６０７７５４号パンフレット（１９９６年3月１４日公開）は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定域に突然変異を導入し、軽鎖遺伝子ライブラリーを創製する方法を記載する。もう一つの効果的な方法は、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されるように、ファージディスプレイによって選ばれたＶＨまたはＶＬドメインを、免疫化されないドナーから得られた天然のＶドメイン変異種のレパートリーと再結合させ、数ラウンドの鎖シャッフリングを行って、より高い親和性を求めてスクリーニングすることである。この技術によって、10^{-9}Ｍ範囲の親和性を持つ抗体および抗体断片の生産が可能となる。

【０１８０】

ＤＬＬ４核酸およびアミノ酸配列は、当該分野において既知である。ＤＬＬ４をコードする核酸配列は、ＤＬＬ４の所望領域のアミノ酸配列を用いて設計することが可能である。それとは別に、ＧｅｎＢａｎｋのアクセス番号ＮＭ＿０１９０７４のｃＤＮＡ配列（または、その断片）がある。ＤＬＬ４は、膜貫通タンパクである。細胞外領域は、８個のＥＧＦ様反復列の外、全てのＮｏｔｃｈリガンドの間で保存され、受容体結合に必要なＤＳＬドメインを含む。さらに、この予想タンパクは、膜貫通領域、および、触媒モチーフを全く欠く細胞質内尾部を含む。ヒトのＤＬＬ４タンパクは、６８５個のアミノ酸のタンパクであり、下記の領域：シグナルペプチド（アミノ酸１－２５）；ＭＮＮＬ（アミノ酸２６－９２）；ＤＳＬ（アミノ酸１５５－２１７）；ＥＧＦ様（アミノ酸２２１－２５１）；ＥＧＦ様（アミノ酸２５２－２８２）；ＥＧＦ様（アミノ酸２８４－３２２）；ＥＧＦ様（アミノ酸３２４－３６０）；ＥＧＦ様（アミノ酸３６６－４００）；ＥＧＦ様（アミノ酸４０２－４３８）；ＥＧＦ様（アミノ酸４４０－４７６）；ＥＧＦ様（アミノ酸４８０－５１８）；膜貫通（アミノ酸５２９－５５１）；細胞原形質ドメイン（アミノ酸５５２－６８５）を含む。ヒトＤＬＬ４のアクセス番号は、ＮＭ＿０１９０７４であり、マウスＤＬＬ４のアクセス番号は、ＮＭ＿０１９４５４である。

【０１８１】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、当該分野で既知の種々の方法によって調製することが可能である。そのような方法としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、Ｅｎｇｅｌｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｇｎｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，２８：７１６－７３４（１９８９）に記載される方法の内のいずれかによる化学合成、例えば、トリエステル、亜リン酸塩、フォスフォロアミダイト、およびＨ－フォスフォン酸法が挙げられる。一実施態様では、発現宿主細胞によって好まれるコドンが、ＤＬＬ４コードＤＮＡの設計に用いられる。それとは別に、ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、ゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーから単離することが可能である。

【０１８２】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡ分子を構築した後、このＤＮＡ分子は、プラスミドなどの発現ベクターにおいて発現調節配列に作動可能に連結される。その際、この調節配列は、ベクターによって形質転換される宿主細胞によって認識される。一般に、プラスミド配列

は、宿主細胞と適合性を持つ動物種から得られた複製および調節配列を含む。ベクターは、通常、複製部位の外に、形質転換細胞において表現型選択の実行を可能とするタンパクをコードする配列を有す。原核および真核宿主細胞における発現にとって好適なベクターは、当該分野で既知であり、いくつかは、本明細書においても記載される。真核生物、例えば、酵母、または、多細胞生物、例えば、哺乳動物から得られた細胞を使用してもよい。

【０１８３】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、分泌リーダー配列に、任意に作動可能に連結され、宿主細胞によって、発現産物が、培地に分泌されることを可能とする。分泌リーダー配列の例としては、例えば、ｓｔＩＩ、エコチン、ｌａｍＢ、ヘルペスＧＤ、ｌｐｐ、アルカリフォスファターゼ、インベルターゼ、およびアルファ因子が挙げられる。さらに、本発明で使用するのに好適なのは、プロテインＡの３６アミノ酸リーダー配列である（Ａｂｒａｈｍｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，４：３９０１（１９８５））。

【０１８４】

好ましくは、本発明の、前述の発現またはクローニングベクターによって、宿主細胞をトランスフェクション、または形質転換し、通例のもので、プロモーターを誘起するように適切に修飾された栄養培地で培養し、形質転換細胞を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅する。

【０１８５】

トランスフェクションとは、何らかのコード配列が実際に発現されるかどうかとは無関係に、宿主細胞によって発現ベクターが取り込まれることを指す。例えば、$CaPO_4$沈殿、および電気穿孔などの、数多くのトランスフェクション法が当業者には知られる。トランスフェクションが上手くいったかどうかは、一般に、宿主細胞の内部において、このベクターの動作を示す何かの兆候が起こった時点で認識される。トランスフェクションのための方法は、当該分野で周知であり、いくつかは本明細書にも後述される。

【０１８６】

形質転換は、ＤＮＡを、該ＤＮＡが、染色体外要素として、または染色体組み込み体として複製可能となるように、生物体に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、その細胞に適切な標準技術を用いて形質転換は実行される。形質転換のための方法は、当該分野で周知であり、いくつかは本明細書において後述される。

【０１８７】

ＤＬＬ４を生産するために使用される原核宿主細胞は、上にＳａｍｂｒｏｏｋらの中に概説されるようにして培養することが可能である。

【０１８８】

ＤＬＬ４を生産するために使用される哺乳動物宿主細胞は、当該分野で周知であり、その内のいくつかは本明細書にも記述される、種々の培地において培養することが可能である。

【０１８９】

本開示に言及される宿主細胞は、インビトロ培養細胞の外、宿主動物の体内の細胞も包含する。

【０１９０】

ＤＬＬ４の精製は、当該分野で認知済みの方法、その内のいくつかは本明細書にも記述される、によって実現してもよい。

【０１９１】

精製ＤＬＬ４は、基質、例えば、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、各種アクリルコポリマー、ヒドロキシルメタクリレートゲル、ポリアクリルおよびポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性およびイオン性担体など、ファージディスプレイクローンのアフィニティークロマトグラフィー分離に使用するのに好適な基質に付着させることが可能である。基質に対するＤＬＬ４タンパクの付着は、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．４４（１９７６）に記載される方法で

実現することが可能である。ポリサッカリド基質、例えば、アガロース、デキストラン、またはセルロースに対してタンパクリガンドを付着させるために一般に用いられる技術は、ハロゲン化シアノゲンによって担体を活性化し、次いで、このペプチドリガンドの一次脂肪族または芳香族アミンを、活性化基質に結合させることを含む。

【０１９２】

それとは別に、ＤＬＬ４を、吸着プレートのウェルに塗布すること、吸着プレートに固定した宿主細胞において発現させること、または、細胞分取に使用すること、ストレプトアビジン塗布ビーズによって捕捉されるようにビオチンに結合すること、または、ファージディスプレイライブラリーの選別のために使用される、他の任意の周知の方法において使用することが可能である。

【０１９３】

ファージライブラリーを、該ファージ粒子の少なくとも一部が吸着体と結合するのに好適な条件下で、固定ＤＬＬ４と接触させる。通常、ｐＨ、イオン強度、温度などを含む条件は、生理的条件を模倣するように選ばれる。固相に結合したファージは、洗浄され、例えば、Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８８:７９７８－７９８２（１９９１）に記載されるように酸で溶出されるか、あるいは、例えば、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）によって記載されるようにアルカリによって溶出されるか、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５３：６２４－６２８（１９９１）の抗原競合法と同様の手順によって、ＤＬＬ４抗原競合体によって溶出される。ファージは、１回の選択ラウンドで２０～１，０００倍濃縮することが可能である。さらに、この濃縮ファージは、細菌培養において育成し、さらに数回の選択ラウンドを経過させることが可能である。

【０１９４】

選択の効率は、多くの要因、例えば、洗浄時の解離反応速度、単一ファージにおける複数の抗体断片が同時に抗原に嵌合することが可能かどうか、などの要因に依存する。速やかな解離反応速度（および、弱い結合親和性）を有する抗体は、短時間の洗浄、多価ファージディスプレイ、および、固相に対し高密度の抗原コーティングを使用することによって保持することが可能である。高密度は、多価相互作用によってファージを安定化させるばかりでなく、一旦解離したファージの再結合を促進する。解離反応速度の低い（および、結合親和性の高い）抗体の選択は、Ｂａｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）、および国際公開第９２／０９６９０号パンフレットに記載されるように、長時間の洗浄、および一価のファージディスプレイを用いることによって、かつ、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されるように、低密度の抗原コーティングを用いることによって促進することが可能である。

【０１９５】

ＤＬＬ４に対し、異なる親和性を持つファージ抗体、場合によっては、親和性が僅かしか違わないファージ抗体を区別することも可能である。しかしながら、ある選ばれた抗体のランダムな突然変異誘発（例えば、前述のアフィニティー熟成技術のあるもので行われるもののような）は、たくさんの突然変異種を生じさせるが、その多くは抗原に結合し、ごく僅かのものは比較的高い親和性で結合すると考えられる。ＤＬＬ４を制限した場合、希少な高親和性ファージは、競合の結果排除される可能性がある。全ての高親和性突然変異を保持するために、ファージを、過剰なビオチニル化ＤＬＬ４と、ビオチニル化ＤＬＬ４がＤＬＬ４に対する標的モル親和定数よりも低いモル濃度となる条件下でインキュベートすることが可能である。次に、高親和性結合性ファージを、ストレプトアビジン塗布常磁性ビーズによって捕捉することが可能である。このような「平衡捕捉」は、抗体を、その結合親和性にしたがって捕捉することを可能とし、その感度は、比較的低い親和性を持つ、きわめて過剰なファージの中から、親和性が僅かに２倍しか高くない突然変異クローンの単離を可能とする。さらに、解離反応速度に基づいて識別するように、固相に結合し

たファージの洗浄に使用される条件を操作することも可能である。

【０１９６】

抗ＤＬＬ４クローンは、活性選択してもよい。一実施態様では、本発明は、Ｎｏｔｃｈ受容体（例えば、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、および／またはＮｏｔｃｈ４）と、ＤＬＬ４の間の結合は阻止するが、Ｎｏｔｃｈ受容体と第２タンパクの間の結合は阻止しない抗ＤＬＬ４抗体を提供する。このような抗ＤＬＬ４抗体に対応するＦｖクローンは、（１）前述のようにしてファージライブラリーから抗ＤＬＬ４クローンを単離し、ファージクローンのこの単離集団を、該集団を適切な細菌宿主において育成することによって、任意に増幅すること；（２）それに対して、それぞれ、阻止活性および非阻止活性が望まれるＤＬＬ４および第２タンパクを選択すること；（３）抗ＤＬＬ４ファージクローンを、固定ＤＬＬ４に吸着させること；（４）過剰な第２タンパクを用いて、第２タンパクの結合決定基と重複、または、それと共有されるＤＬＬ４－結合決定基を認識する、不要のクローンがあればそれらを全て溶出すること；および、（５）工程（４）の後でも依然として吸着したままのクローンを溶出すること、によって選択することが可能である。所望の阻止性／非阻止性を有するクローンは、本明細書に記載される選択手順を１回以上繰り返すことによってさらに任意に濃縮することが可能である。

【０１９７】

ハイブリドーマ由来モノクローナル抗体をコードするＤＮＡ、または、本発明のファージディスプレイＦｖクローンは、従来の手順を用いて（例えば、ハイブリドーマまたはファージＤＮＡ鋳型から、対象領域をコードする重鎖および軽鎖を特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いることによって）、簡単に単離され、かつ、配列決定される。一旦単離されたならば、このＤＮＡは、発現ベクターの中に設置し、次に、宿主細胞、例えば、大腸菌、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または、他の条件下では免疫グロブリンを生産しない骨髄腫細胞中にトランスフェクションし、該組み換え宿主細胞において、所望のモノクローナル抗体の合成を実現することが可能である。抗体コードＤＮＡの、細菌における組み換え発現に関する総説としては、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６（１９９３）およびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ，１３０：１５１（１９９２）が挙げられる。

【０１９８】

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖および／または軽鎖定常領域をコードする、既知のＤＮＡ配列（例えば、適切なＤＮＡ配列は、上記Ｋａｂａｔらから得ることが可能である）と結合させて、完全または部分長の重鎖および／または軽鎖をコードするクローンを形成することが可能である。この目的のために、任意のアイソタイプの定常領域、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥの定常領域を使用すること、および、その定常領域は、ヒトまたは任意の動物種から獲得することが可能であることが理解されよう。一動物種（例えば、ヒト）の可変ドメインＤＮＡ由来のＦｖクローンで、別の動物種の定常領域ＤＮＡに融合させて、「ハイブリッド」の完全長重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成したものは、本明細書で用いる「キメラ」および「ハイブリッド」抗体の定義の中に含められる。好ましい実施態様では、ヒト可変領域ＤＮＡ由来のＦｖクローンは、ヒトの定常領域ＤＮＡに融合されて、全体ヒトの、完全または部分長重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成する。

【０１９９】

本発明のハイブリドーマから得られた、抗ＤＬＬ４抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の、マウスの相同配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによってさらに修飾することが可能である（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１－６８５５（１９８４）の方法に見られるように）。ハイブリドーマ由来抗体またはその断片、あるいは、Ｆｖクローン由来抗体またはその断片をコードする

ＤＮＡは、該免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全て、または一部を共有的に結合することによってさらに修飾することが可能である。このようにして、本発明のＦｖクローン、またはハイブリドーマ由来抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

抗体断片

本発明は、抗体断片を含有する。ある状況では、抗体全体よりも、抗体断片を使用する方が有利なことがある。断片の比較的小さいサイズのために、速やかな排泄が可能となり、固形腫瘍への接近が改善される可能性がある。

【０２００】

抗体断片の生産のために種々の技術が開発されている。従来、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化によって得られていた（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４：１０７－１１７（１９９２）；およびＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照）。しかしながら、今では、これらの断片は、組み換え宿主細胞によって直接生産することが可能である。Ｆａｂ、Ｆｖ、およびＳｃＦｖ抗体断片は、全て、大腸菌において発現させ、分泌させることが可能であり、したがって、これらの断片を、容易に大量に生産することが可能である。それとは別に、Ｆａｂ′－ＳＨ断片を、直接大腸菌から回収し、化学的に結合させて、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片を形成することが可能である（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３－１６７（１９９２））。別の方法によれば、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片は組み換え宿主細胞培養から直接単離される。救済受容体結合性エピトープ残基を含み、インビボ半減期を延長させたＦａｂおよびＦ（ａｂ′）$_2$断片が、米国特許第５，８６９，０４６号明細書に記載される。抗体断片生産のための、他の技術も、当業者には明白であろう。別の実施態様では、選択抗体は、単一鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。国際公開第９３／１６１８５号パンフレット；米国特許第５，５７１，８９４号明細書および同第５，５８７，４５８号明細書を参照されたい。ＦｖおよびｓＦｖは、定常領域を欠くが、結合部位は元のままの、唯一の分子である。したがって、これらは、インビボ使用の際、非特異的結合の抑制に好適である。ｓＦｖ融合タンパクは、ｓＦｖのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパクを付着させた融合体を生成するように構築してもよい。Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｅｄ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ上記を参照されたい。さらに、抗体断片は、例えば、米国特許第５，６４１，８７０号明細書に記載されるように「線状抗体」であってもよい。このような線状抗体断片は、単一特異的であっても、二重特異的であってもよい。

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を含有する。非ヒト抗体をヒト化するために種々の方法が当該分野において知られる。例えば、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から得られた一つ以上のアミノ酸残基を、その中に導入させて有することが可能である。これらの、非ヒトアミノ酸残基は、よく、「輸入」残基と呼ばれるが、これらは、通常、「輸入」可変領域から取られる。ヒト化は、事実上、Ｗｉｎｔｅｒおよびその共同研究者らの方法にしたがって（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６）、ヒト抗体の対応配列の代わりに、超可変領域配列を置換することによって行われる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第４，８１６，５６７号明細書）であって、元のヒトの可変ドメインが、事実上より少なくなるように、非ヒト動物種由来の対応配列によって置換される抗体である。実際には、ヒト化抗体は、通常、いくつかの超可変領域残基、および、場合によってはいくつかのＦＲ残基が、げっ歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

【０２０１】

ヒト化抗体作製のために使用される、軽鎖および重鎖の、ヒト可変ドメインの選択は、

抗原性の抑制のためにきわめて重要である。いわゆる「最善適合」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列が、既知のヒト可変ドメイン配列の全体ライブラリーに対してスクリーニングされる。次に、げっ歯類配列に対してもっとも近似するヒト配列が、ヒト化抗体のヒトの骨組構造として受容される（Ｓｉｍｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６；Ｃｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１）。もう一つの方法は、軽鎖または重鎖のある特定サブグループの、全てのヒト抗体の共通配列から得られた特定骨組構造を使用する。この同じ骨組構造は、いくつかの異なるヒト化抗体に使用することが可能である（Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５；Ｐｒｅｓｔａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３）。

【０２０２】

さらに、抗体は、抗原に対する高い親和性、および、他の有利な生物学的特性を保有しつつヒト化されることが重要である。この目標を達成するために、一方法によれば、ヒト化抗体は、親配列、および、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、種々の概念的ヒト化産物の分析過程によって調製される。免疫グロブリンの三次元モデルは、普通に利用可能であり、当業者には親しいものである。選択された、免疫グロブリン候補配列の、予想される三次元立体配座構造を図示し、表示するコンピュータプログラムが市販されている。これらの表示を検査することによって、免疫グロブリン候補配列の機能における、これら残基の予想される役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンの、その抗原に対する結合能に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、レシピエントおよび輸入配列からＦＲ残基を選択し、所望の抗体特性、例えば、標的抗原（単数または複数）に対する親和性の増加が実現されるように、それらを組み合わせることが可能となる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響において、直接に、そしてもっとも実質的に関与する。

ヒト抗体

本発明の、ヒトの抗ＤＬＬ４抗体は、前述のように、既知の、ヒト定常ドメイン配列（単数または複数）と、ヒト由来ファージディスプレイライブラーから選ばれた、Ｆｖクローン可変ドメイン配列（単数または複数）を組み合わせることによって構築することが可能である。それとは別に、本発明の、ヒトの、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することも可能である。ヒトモノクローナル抗体生産のための、ヒトの骨髄腫細胞およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞系が、例えば、Ｋｏｚｂｏｒ　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８７）；およびＢｏｅｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：８６（１９９１）によって記載される。

【０２０３】

現在では、内因性免疫グルブリン生産を全く見ることなく、免疫化によって、ヒト抗体の完全レパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生産することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異マウスにおいて、抗体の重鎖連結域（ＪＨ）遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体生産の完全抑制をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異マウスにヒトの生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを転送すると、抗原チャレンジによって、ヒト抗体の生産がもたらされる。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｙｅａｒ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７：３３（１９９３）を参照されたい。

【０２０４】

さらに、遺伝子シャッフリングを用いて、非ヒトの、例えば、げっ歯類の抗体から、ヒ

トの抗体を得ることが可能である。この場合、ヒト抗体は、最初の非ヒト抗体と同様の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法によれば、前述のようなファージディスプレイ技術によって得られた、非ヒト抗体断片の重鎖または軽鎖可変領域のいずれかが、ヒトのＶドメイン遺伝子のレパートリーによって置換され、それによって、非ヒト鎖／ヒト鎖ｓｃＦｖまたはＦａｂキメラの集団が創出される。抗原によって選択することによって、非ヒト鎖／ヒト鎖キメラｓｃＦｖまたはＦａｂで、そこにおいては、一次ファージディスプレイクローンにおいて対応する非ヒト鎖の除去と同時に破壊された抗原結合部位を、ヒト鎖が回復する、すなわち、エピトープが、ヒト鎖のパートナーを支配する（インプリントする）キメラ抗体断片が単離される。残余の非ヒト鎖を置換するためにこのプロセスを繰り返すと、ヒト抗体が得られる（１９９３年４月１日公開の、国際公開第９３／０６２１３号パンフレットを参照）。従来の、ＣＤＲ移植による非ヒト抗体のヒト化と違って、この技術は、非ヒト起源のＦＲまたはＣＤＲを全く含まない、完全なヒトの抗体を提供する。

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有する、モノクローナルの、好ましくは、ヒトの、またはヒト化抗体である。本発明の場合、結合特異性の一つは、ＤＬＬ４に対するものであり、他方は、他の任意の抗原に対する。例示の二重特異性抗体は、ＤＬＬ４タンパクの二つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体はさらに、ＤＬＬ４を発現する細胞に対し、細胞傷害性薬剤を局在化するために使用してもよい。これらの抗体は、ＤＬＬ４結合性アーム、および、細胞傷害剤（例えば、サポニン、抗インターフェロンα、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート、または放射性同位元素ハプテン）に結合するアームを持つ。二重特異性抗体は、完全長抗体として、または、抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ′）$_2$二重特異性抗体）として調製することが可能である。

【０２０５】

二重特異性抗体の作製法は当該分野において既知である。従来、二重特異性抗体の組み換え生産は、異なる特異性を持つ、二つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアの同時発現に基づいていた（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７（１９８３））。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クワドローマ）は、１０種の異なる抗体分子から成る混合物を生産する可能性があり、この内、適正な二重特異的構造を持つものはただ一つである。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって実行される、適正分子の精製は、面倒で、かつ、生産収率は低い。同様の手順が、１９９３年５月１３日公開の国際公開第９３／０８８２９号パンフレット、およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５（１９９１）に開示される。

【０２０６】

別の、より好ましい方法によれば、所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する、抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合は、少なくともヒンジの一部、ＣＨ２、およびＣＨ３領域を含む、免疫グロブリン定常ドメイン配列と行われることが好ましい。融合部の少なくとも一部において、軽鎖結合に必要な部位を含む、重鎖の第１定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合部、および、要すれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡを、別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時にトランスフェクションする。これによって、構築に使用される三つのポリペプチド鎖の不等比率が最適収率を与える実施態様において、三つのポリペプチド断片の相互比の調整に大きな融通性が得られる。しかしながら、少なくとも二つのポリペプチド鎖の、同等比の発現が高い収率をもたらすか、あるいは、その比は、特に重要性を持たない場合には、二つのポリペプチド鎖、または三つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を一つの発現ベクターに挿入することも可能である。

【０２０７】

本法の一つの好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、一アームに第１結合特異性、

および、他方アームに、ハイブリッド免疫グロブリンの重鎖－軽鎖ペア（第２の結合特異性を与える）を有する、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖から構成される。この非対称構造は、所望の二重特異性化合物を、不要な免疫グロブリン鎖結合から容易に分離させることが見出された。なぜなら、免疫グロブリン軽鎖は、この二重特異性抗体の片方だけにしか存在しないので、分離がし易くなるからである。この方法は、国際公開第９４／０４６９０号パンフレットに記載される。二重特異性抗体の生成に関するさらに詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照されたい。

【０２０８】

もう一つの方法によれば、一対の抗体分子の界面を、組み換え細胞培養体から回収される、ヘテロダイマーのパーセントが最大となるように加工することが可能である。好ましい界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメンの、少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面の、一つ以上の小型アミノ酸側鎖が、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）によって置換される。大型側鎖（単数または複数）と同じ、又は近似の大きさを持つ相補的「腔」が、大型アミノ酸側鎖を、小型側鎖（例えば、アラニン、またはトレオニン）で置換することによって、第２抗体分子の界面に創出される。これによって、ホモダイマーなどの、他の、不要な最終産物を上回って、ヘテロダイマーの収率を上げるための機構が得られる。

【０２０９】

二重特異性抗体は、架橋結合される、または「ヘテロ接合される」抗体を含む。例えば、このヘテロ接合体における抗体の一方は、アビジンに結合させ、他方はビオチンに結合させることが可能である。このような抗体が、例えば、有害細胞に対して免疫系細胞を標的させるために（米国特許第４，６７６，９８０号）、および、ＨＩＶ感染の処置のために（国際公開第９１／００３６０号パンフレット、国際公開第９２／００３７３号パンフレット、および欧州特許第０３０８９号明細書）提案されている。ヘテロ接合抗体は、都合のよいものであれば、いずれの架橋結合法を用いて作製してもよい。好適な架橋結合剤は周知であり、いくつかの架橋結合法とともに、米国特許第４，６７６，９８０号明細書に記載される。

【０２１０】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術も文献に記載される。例えば、二重特異性抗体は、化学的結合を用いて調製することが可能である。Ｂｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）は、完全な抗体を、タンパク分解酵素によって切断して、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片を生成する手順を記載する。これらの断片は、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール複合体形成剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元する。次に、得られたＦａｂ′をチオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換する。次に、Ｆａｂ′－ＴＮＢ誘導体の一方を、メルカプトエチルアミンによって還元してＦａｂ′－チオールに再変換し、等モル量の、他方のＦａｂ′－ＴＮＢ誘導体と混ぜ合わせて、二重特異性抗体を形成する。生産された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定のための薬剤として使用することが可能である。

【０２１１】

最近の進歩によって、大腸菌からのＦａｂ′－ＳＨ断片の回収が容易になったが、これらの断片を化学的に結合して二重特異性抗体を形成することが可能である。Ｓｈａｌａｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）は、完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ′）$_2$分子の生産を記載する。各Ｆａｂ′断片は大腸菌から分離して分泌され、インビトロで管理された化学結合に供され二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、ＨＥＲ２受容体を過剰発現する細胞、および正常なヒトＴ細胞に結合が可能であるだけでなく、ヒトの乳癌目標物に対する、ヒトの細胞傷害性リンパ球の分解活性を誘導することが可能である。

【０２１２】

組み換え細胞培養体から二重特異性抗体断片を直接作製し、単離するために種々の技術

も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて生産されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク由来のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合によって結合させて、二つの異なる抗体から成るＦａｂ′部分とする。この抗体ホモダイマーを、ヒンジ領域において還元して、モノマーを形成し、次いで、再度酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はさらに、抗体ホモダイマーの生産のために利用することが可能である。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって記載される「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片作製の、別の機構を提供する。この断片は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に、リンカーによって接続される重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含み、その際、リンカーが短すぎるために、同じ鎖における二つのドメインの間の対向は不可能とされる。したがって、一断片のＶＨおよびＶＬドメインは、別断片の相補的ＶＬおよびＶＨドメインと対向することを強制されるので、二つの抗原結合部位が形成される。単一鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーを用いて二重特異性断片を作製する、もう一つの戦略も報告されている。Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照されたい。

【０２１３】

２価を超える抗体も考慮の対象とされる。例えば、三重特異性抗体を調製することは可能である。Ｔｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

多価抗体

多価抗体は、該抗体が結合する抗原を過剰発現する抗体によって、二価抗体よりも速やかに取り込まれる（および／または異化される）と考えられる。本発明の抗体は、３個以上（例えば、４価抗体）の抗原結合部位を有する多価抗体（ＩｇＭクラスとは別に）であることが可能であり、このような抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸を組み換え的に発現することによって簡単に生産することが可能である。多価抗体は、ダイマー化ドメイン、および３個以上の抗原結合部位を含むことが可能である。好ましいダイマー化ドメインは、Ｆｃ領域またはヒンジ領域を含む（または、から成る）。このシナリオでは、抗体は、Ｆｃ領域、および、Ｆｅ領域に対してアミノ末端側を持つ３個以上の結合部位を含む。本発明において好ましい多価抗体は、３から約８個、好ましくは４個の抗原結合部位を含む（または、から成る）。この多価抗体は、二つ以上の可変ドメインを含む、少なくとも一つのポリペプチド鎖（および、好ましくは二つのポリペプチド鎖）を含む。例えば、ポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＤ１－（Ｘ１）ｎ－ＶＤ２－（Ｘ２）ｎ－Ｆｃを含んでもよい。前式において、ＶＤ１は第１可変ドメインであり、ＶＤ２は第２可変ドメインであり、Ｆｃは、Ｆｃ領域の一ポリペプチド鎖であり、Ｘ１およびＸ２は、アミノ酸またはポリペプチドであり、ｎは０または１である。例えば、このポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＨ－ＣＨ１－屈曲性リンカー－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖；または、ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖を含んでもよい。本発明の多価抗体は、さらに、少なくとも二つの（好ましくは、四つの）軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。本発明の多価抗体は、例えば、約２から約８個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでもよい。本発明の考察の対象とされる軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメイン、および、任意にさらにＣＬドメインを含む。

抗体変異種

ある実施態様では、本明細書に記載される抗体の、アミノ酸配列修飾体（単数または複数）も考察の対象とされる。例えば、抗体の結合親和性および／またはその他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、該抗体核酸の中に適切なヌクレオチド変化を導入することによって調製される。このような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内部の残基の欠失、および／または該残基への挿入、および／または、該残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを行って、最終構築体に、該最終構築体が所望の特性を有する限り、到達してもよい。アミノ酸変更は、配列決定が行われた時点で、被検抗体アミノ酸配列の中に導入されてもよ

い。

【０２１４】

突然変異誘発のための好ましい位置である、抗体のある残基または領域を特定するのに有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５によって記載されるもので「アラニン走査突然変異誘発法」と呼ばれる。この方法で、一残基、または一群の標的残基が特定され（例えば、ａｒｇ，ａｓｐ，ｈｉｓ，ｌｙｓ，およびｇｌｕなどの荷電残基）、該アミノ酸の抗原との相互作用に影響を及ぼすために、中性、または負に荷電したアミノ酸（もっとも好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）によって置換される。次に、その置換部位に、または、該部位のために、さらにそれ以外の変異種を導入することによって、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置を微細に調節する。こうすると、アミノ酸配列変動を導入するための位置はあらかじめ指定されるが、突然変異の性質自体をあらかじめ指定する必要はない。例えば、ある任意の部位における突然変異の性能を分析するには、その標的コドンまたは領域においてａｌａ走査またはランダム突然変異誘発を行ない、発現された免疫グロブリンを、所望の活性についてスクリーニングする。

【０２１５】

アミノ酸配列の挿入は、長さが１残基から、百以上の残基を含むポリペプチドの範囲までの、アミノ－および／またはカルボキシ－末端融合ばかりでなく、単一または複数アミノ酸の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、Ｎ－末端メチオニル残基を有する抗体、または、細胞傷害性ポリペプチドに融合される抗体が挙げられる。抗体分子の、他の挿入性変異体としては、抗体のＮ－またはＣ－末端の、酵素（例えば、ＡＤＥＰＴ）、または、抗体の血清半減期を延長させるポリペプチドへの融合が挙げられる。

【０２１６】

ポリペプチドのグリコシル化は、通常、Ｎ－結合、またはＯ－結合である。Ｎ－結合とは、炭水化物成分の、アスパラギン残基の側鎖に対する付着を指す。トリペプチド配列、すなわち、Ｘがプロリン以外の任意のアミノ酸である、アスパラギン－Ｘ－セリン、および、アスパラギン－Ｘ－トレオニンは、アスパラギン側鎖に対する、炭水化物成分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおいてこれらトリペプチド配列のいずれかが存在すると、それは、可能なグリコシル化部位を創出する。Ｏ－結合グリコシル化は、糖類の内の一つ、Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの、ヒドロキシアミノ酸、もっとも一般的にはセリンまたはトレオニンに対する付着を指す。ただし、５－ヒドロキシプロリン、または５－ヒドロキシリシンを使用してもよい。

【０２１７】

抗体に対するグリコシル化部位の添加は、アミノ酸配列を、それが、前述のトリペプチド配列（Ｎ－結合グリコシル化部位のために）の内の一つ以上を含むように変えることによって好都合に実現される。変更はさらに、元の抗体の配列に、一つ以上のセリンまたはトレオニン残基を付加、または置換代入する（Ｏ－結合グリコシル化部位のために）ことによって実現してもよい。

【０２１８】

抗体がＦｃ領域を含む場合、それに付着される炭水化物は変えられてもよい。例えば、抗体のＦｃ領域に付着されるフコースを欠く、成熟炭水化物構造を有する抗体が、米国特許出願ＵＳ２００３／０１５７１０８号明細書（Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ．）に記載される。さらに、米国特許第２００４／００９３６２１号明細書（Ｋｙｏｗａ Ｈａｋｋｏ Ｋｏｇｙｏ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）を参照されたい。抗体のＦｃ領域に付着される２分性Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）を有する抗体が、国際公開第２００３／０１１８７８号パンフレット、Ｊｅａｎ－Ｍａｉｒｅｔ ｅｔ ａｌ．および米国特許第６，６０２，６８４号明細書、Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．に参照される。抗体のＦｃ領域に付着されるオリゴッサカリド中に少なくとも一つのガラクトース残基を有する抗体が、国際公開第１９９７／３００８７号パンフレット、Ｐａｔｅｌ ｅｔ ａｌ．に報告される。さらに、

そのＦｃ領域に変更炭水化物を付着させた抗体に関しては、国際公開第１９９８／５８９６４号パンフレット（Ｒａｊｕ，Ｓ．）および国際公開１９９９／２２７６４号パンフレット（Ｒａｊｕ，Ｓ．）を参照されたい。さらに、グリコシル化を修飾させた抗原結合分子については、米国特許第２００５／０１２３５４６号明細書（Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．）を参照されたい。

【０２１９】

本発明において好ましいグリコシル化変異種は、Ｆｃ領域に付着する炭水化物構造がフコースを欠くＦｃ領域を含む。このような変異種では、ＡＤＣＣ機能が改善される。Ｆｃ領域はさらに、その中に、ＡＤＣＣをさらに改善する、一つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の位置２９８、３３３、および／または３３４（残基のＥｕ番号付けによる）における置換を含む。「脱フコシル化」または「フコース欠乏」抗体に関する公刊物の例としては、米国特許第２００３／０１５７１０８号明細書；国際公開第２０００／６１７３９号パンフレット；国際公開第２００１／２９２４６号パンフレット；米国特許第２００３／０１１５６１４号明細書；米国特許第２００２／０１６４３２８号明細書；米国特許第２００４／００９３６２１号明細書；米国特許第２００４／０１３２１４０号明細書；米国特許第２００４／０１１０７０４号明細書；米国特許第２００４／０１１０２８２号明細書；米国特許第２００４／０１０９８６５号明細書；国際公開第２００３／０８５１１９号パンフレット；国際公開第２００３／０８４５７０号；国際公開第２００５／０３５５８６号；国際公開第２００５／０３５７７８号パンフレット；国際公開第２００５／０５３７４２号パンフレット；Ｏｋａｚａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３６:１２３９－１２４９（２００４）；Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４（２００４）が挙げられる。脱フコシル抗体を生産する細胞系統の例としては、タンパクのフコシル化を欠くＬｅｃ１３　ＣＨＯ細胞が挙げられる（Ｒｉｐｋａ　ｅｔ　ａｌ．Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２４９：５３３－５４５（１９８６）；米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８Ａ１号明細書、Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ；および国際公開第２００４／０５６３１２Ａ１号パンフレット、Ａｄａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．，の特に実施例１１）、およびノックアウト細胞系統、例えば、アルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞（Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４（２００４））。

【０２２０】

もう一つのタイプの変異種は、アミノ酸置換変異種である。これらの変異種では、抗体分子の少なくとも一つのアミノ酸残基が、異なる残基によって置換される。置換による突然変異誘発にとってもっとも興味深い部位として、超可変領域が挙げられるが、ＦＲ変化も考慮の対象とされる。保存的置換が、「好ましい置換」という表題の下に表１に示される。もしもこのような置換が、生物学的活性に変化をもたらすならば、表１に「例示置換」と表示され、アミノ酸クラスに関連してさらに後述される、より実質的な変化を導入して、その産物をスクリーニングしてもよい。

【０２２１】

【表１】

元の残基	例示置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

抗体の生物学的特性の実質的修飾は、（ａ）置換区域のポリペプチドのバックボーン構造、例えば、シートまたは螺旋立体構造の維持、（ｂ）標的部位における分子の電荷または疎水性、または、（ｃ）側鎖の体積、に対するその作用において著明に異なる置換を選択することによって実現される。天然残基は、共通の側鎖特性に基づいて下記のようにグループ分けされる：

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；
（２）中性、親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；
（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；
（４）塩基性：ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；
（５）鎖の方向性に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ、および、
（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０２２２】

非保存的置換は、これらの内の１クラスの１メンバーを、別のクラスと交換することを必要とする。

【０２２３】

一タイプの置換変異種は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の、一つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる開発のために選ばれる変異種（単数または複数）は、その作製の元になった親抗体に比べて、生物学的特性が改善される。

このような置換変異種を生成するための好適な方法は、ファージディスプレイによるアフィニティー熟成を含む。簡単に言うと、超可変部位（例えば、６－７部位）を突然変異誘発して、各部位において可能な全てのアミノ酸置換を生成する。このようにして生成された抗体を、繊維状ファージ粒子から、各粒子内部にパックされるＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物に対する融合体として提示させる。次に、このファージディスプレイされる変異種を、本明細書に開示されるように、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を行って、抗原結合に著明に貢献する超可変領域残基を特定することが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、抗体および抗原間の接触点を特定するために、抗原・抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であろうと考えられる。このような接触残基および隣接残基は、本発明において改良を加えた技術による置換のための候補となる。一旦このような変異種が生成されたならば、この一連の変異種に対し、本明細書に記載されるようにスクリーニングを実施し、一つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を示す抗体を将来の開発のために選んでもよい。

【０２２４】

抗体のアミノ酸変異種をコードする核酸分子は、当該分野で既知の様々な方法によって調製される。そのような方法として、例えば、ただしこれらに限定されないが、天然供給源からの単離（天然の、アミノ酸配列変異種の場合）、または、オリゴヌクレオチド介在性（または、部位指向性）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、および、抗体の、以前に調製した変異種、または非変異種のカセット突然変異誘発が挙げられる。

【０２２５】

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのＦｃ領域に一つ以上のアミノ酸置換を導入して、Ｆｃ領域変異種を生成することが好ましい場合がある。このＦｃ領域変異種は、ヒンジシステインの位置も含む、一つ以上のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトのＦｃ領域配列（例えば、ヒトのＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４　Ｆｃ領域）を含んでもよい。本明細書の記載および従来技術の教示に一致して、ある実施態様では、本発明の方法に使用される抗体は、野生型抗体に比べ、例えば、Ｆｃ領域に一つ以上の変化を含んでもよいことが考えられる。にも拘らず、これらの抗体は、その野生型対応物に比べ、治療的有用性のために要求される、事実上同じ特徴を保持することが考えられる。例えば、国際公開第９９／５１６４２号パンフレットに記載されるように、例えば、Ｆｃ領域においてある変化を実行し、それが、Ｃｌｑ結合および／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）に変化（すなわち、上昇または低下）をもたらすことが考えられる。Ｆｃ領域変異種の、他の例については、さらに、Ｄｕｎｃａｎ　＆　Ｗｉｎｔｅｒ　Ｎａｔｕｒｅ　３２２：７３８－４０（１９８８）；米国特許第５，６４８，２６０号明細書；米国特許第５，６２４，８２１号明細書；および国際公開第９４／２９３５１号パンフレットを参照されたい。国際公開第００／４２０７２号パンフレット（Ｐｒｅｓｔａ）および国際公開第２００４／０５６３１２号パンフレット（Ｌｏｗｍａｎ）は、ＦｃＲに対する結合が向上または低減した抗体変異種を記載する。これら特許公開の内容を、引用により特に指定して本明細書に含める。さらに、Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい。半減期が延び、母親ＩｇＧの、胎児への転送を担当する、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）（Ｇｕｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）およびＫｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））に対する結合が上昇した抗体が、米国特許第２００５／００１４９３４Ａ１号明細書（Ｈｉｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）に記載される。これらの抗体は、Ｆｃ領域の、ＦｃＲｎに対する結合を上昇させる一つ以上の置換をその中に持つＦｃ領域を含む。Ｆｃ領域のアミノ酸配列を変化させ、Ｃ１ｑ結合能を上昇または低下させたポリペプチド変異種が、米国特許第６，１９４，５５１Ｂ１号明細書、国際公開９９／５１６４２号パンフレットに記載される。これら特許公開の内容を、引用により特に指定して本明細書に含める。さらに、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４:４１７８－４１８４（２０００

）を参照されたい。

抗体誘導体

本発明の抗体は、当該分野で既知で、簡単に入手が可能な、新たな非タンパク成分を含むようにさらに修飾することが可能である。抗体の誘導体形成に好適な成分は、水に可溶なポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー、またはランダムコポリマー）、および、デキストラン、またはポリ（ｎ－ビニールピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、酸化プロリプロピレン／酸化エチレンコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニールアルコール、およびそれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水におけるその安定性のために製造において有利である場合がある。このポリマーは、どのような分子量を有していてもよく、分枝しても、分枝してなくともよい。抗体に付着されるポリマーの数は変動してよいが、一つを超えるポリマーが付着される場合、それらは、同じ分子であっても、異なる分子であってもよい。一般に、誘導体形成のために使用されるポリマーの数および／または種類は、例えば、改善される抗体の特性または機能、その抗体誘導体が、定められた条件下で治療に使用されるのかどうかなどの配慮点に基づいて決定することが可能である。

所望の特性を有する抗体に関するスクリーニング

本発明の抗体は、当該分野で既知の種々のアッセイを用いて、その物理的／化学的特性および生物学的機能に関して解明することが可能である。ある実施態様では、抗体は、ＤＬＬ４に対する結合；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体活性化の低減または阻止；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体下流の分子シグナル伝達の低減または阻止；および／または、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体結合の遮断または阻止；および／または、内皮細胞増殖の増進；および／または、内皮細胞分化の抑制；および／または動脈分化の抑制；および／または、腫瘍血管還流の抑制；および／または、腫瘍、細胞増殖性障害、または癌の処置および／または予防；および／または、ＤＬＬ４発現および／または活性と関連する障害の処置または予防；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体発現および／または活性と関連する障害の処置また予防、の内の任意の一つ以上について特徴が解明される。

【０２２６】

精製抗体はさらに、一連のアッセイ、例えば、ただしこれらに限定されないが、Ｎ－末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、およびパパイン消化などによって特徴を解明することが可能である。

【０２２７】

本発明のある実施態様では、本発明において生産される抗体は、その生物活性に関して分析される。ある実施態様では、本発明の抗体は、その抗原結合活性について試験される。当該分野で既知で、本発明において使用することが可能な抗原結合アッセイとしては、例えば、ただし限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（固相酵素免疫測定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインＡイムノアッセイなどの技術を用いる、任意の直接的、または競合的結合アッセイが挙げられる。例示の抗原結合アッセイが、下記の実施例において示される。

【０２２８】

さらに別の実施態様では、本発明は、ＤＬＬ４に対する結合に関して、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体と競合する、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を提供する。このような競合抗体としては、抗体２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２によって認識されるＤＬＬ４

エピトープと同じ、または重複するＤＬＬ４エピトープを認識する抗体が挙げられる。このような競合抗体は、標識された２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体と競合して、固定されたＤＬＬ４に結合する抗ＤＬＬ４ハイブリドーマの上清をスクリーニングすることによって獲得することが可能である。無関係抗体を含む（または、抗体無しの）コントロール結合混合物において検出される結合標識抗体の量に比べて、競合抗体を含むハイブリドーマ上清は、対象競合結合混合物において検出される結合標識抗体の量を低下させる。本明細書に記載される競合結合アッセイは、いずれも、前記手順に使用するのに好適である。

【０２２９】

別の局面では、本発明は、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の一つ以上の（例えば、２、３、４、５、および／または６個の）ＨＶＲを含む、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を提供する。２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の、一つ以上のＨＶＲを含む、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の一つ以上のＨＶＲ（単数または複数）を、鋳型抗体配列、例えば、マウス親抗体の対応配列にもっとも近似する、ヒトの抗体配列に、あるいは、親抗体の軽鎖または重鎖の特定サブグループの全てのヒト抗体の共通配列に移植し、かつ、このようにして得られた、付属の定常領域配列（単数または複数）を持つか、または持たない、キメラ軽鎖および／または重鎖可変領域配列（単数または複数）を、本明細書に記載されるように、組み換え宿主細胞において発現させることによって構築することが可能である。

【０２３０】

本明細書に記載される独特の特性を有する、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、好都合な、いずれかの方法によって、所望の特性について抗ＤＬＬ４ハイブリドーマクローンをスクリーニングすることによって獲得することが可能である。例えば、もしも、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合を阻止するか、または阻止しない抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を望むのであれば、候補抗体を、競合結合アッセイにおいて、例えば、プレートウェルにＤＬＬ４を塗布し、対象とするＮｏｔｃｈ受容体を過剰に含む抗体液を、該塗布プレートに重層し、結合抗体を酵素的に、例えば、競合結合ＥＬＩＳＡであって、結合抗体を、ＨＲＰ－結合抗Ｉｇ抗体か、または、ビオチニル化抗Ｉｇ抗体に接触させ、プレートを、例えば、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよび／または過酸化水素で現像してＨＲＰ発色反応を起こさせ、ＥＬＩＳＡプレートリーダーによる４９０ｎｍにおける分光光度計測によってそのＨＲＰ発色反応を検出する、ＥＬＩＳＡを用いて試験することが可能である。

【０２３１】

一実施態様では、本発明は、エフェクター機能の全ては持たないが、その若干を所有する変更抗体を考慮の対象とする。このような抗体は、あるエフェクター機能（例えば、補体、およびＡＤＣＣ）は不要であるか、有害であるが、インビボにおける抗体半減期が重要な、多くの応用において望ましい候補となる。ある実施態様では、生産される免疫グロブリンのＦｃ活性が、所望の特性だけが保持されることを確かめるために測定される。ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ活性の低下／消失を確かめるために、インビトロおよび／またはインビボ細胞傷害性アッセイを実行することが可能である。例えば、抗体が、ＦｃγＲ結合を欠く（したがって、ＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎ結合活性は保持することを確かめるために、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを実行することが可能である。ＡＤＣＣを仲介する一次細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現するが、一方、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞におけるＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９：４５７－９２（１９９１）の４６４ページの表３にまとめられる。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するインビトロアッセイの一例が、米国特許第５，５００，３６２号明細書または同第５，８２１，３３７号明細書に記載される。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞として、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、およびナチュラルキラー

（ＮＫ）細胞が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、対象分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ａ ９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるものと同様の動物モデルにおいて評価してもよい。さらに、抗体が、Ｃ１ｑに結合できないこと、したがって、ＣＤＣ活性を欠くことを確かめるために、Ｃ１ｑ結合アッセイを実行してもよい。補体活性を評価するために、ＣＤＣアッセイ、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載されるようなＣＤＣアッセイを実行してもよい。さらに、ＦｃＲｎ結合、およびインビボクリアランス／半減期定量を、当該分野で既知の方法、例えば、実施例セクションに記載される方法を用いて実行することも可能である。

ベクター、宿主細胞、および組み換え法

本発明の抗体を組み換え生産するためには、該抗体をコードする核酸を単離し、複製可能なベクターに挿入し、さらにクローニング（ＤＮＡの増幅）、または発現させる。抗体をコードするＤＮＡは、通例手順を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）、簡単に単離され、配列決定される。多くのベクターが市販されている。ベクターの選択は、一部は、使用される宿主細胞に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核性であるか、真核性（一般に、哺乳動物起源）である。この目的のためには、任意のアイソタイプの定常領域、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥ定常領域などの使用が可能であること、および、このような定常領域は、ヒトまたは、任意の動物種から入手が可能であることが理解されよう。

【０２３２】

ａ．原核宿主細胞による抗体の生成

ｉ．ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的組み換え技術を用いて獲得することが可能である。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞などの抗体生産細胞から単離し、配列決定してもよい。それとは別に、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機、またはＰＣＲ技術を用いて合成することも可能である。一旦獲得されたならば、ポリペプチドをコードする配列は、原核細胞宿主において、複製し、異種ポリヌクレオチドを発現することが可能な組み換えベクターに挿入される。市販され、当該分野で既知の多くのベクターが、本発明の目的のために使用が可能である。適切なベクターの選択は、主に、そのベクターに挿入される核酸のサイズ、および、そのベクターによって形質転換される特定宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅または発現、またはその両方）、および、それが存在する特定宿主細胞との適合性に応じて、種々の成分を含む。ベクターの成分としては、一般に、例えば、ただしこれらに限定されないが：複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、シグナル配列、異種核酸挿入体、および転写終結配列が挙げられる。

【０２３３】

一般に、宿主細胞と適合する動物種から得られた、レプリコンおよび調節配列を含むプラスミドが、これらの宿主と組み合わされて使用される。このベクターは、通常、複製部位のほか、形質転換細胞において表現型選択を与えることが可能なマーキング配列を有す。例えば、大腸菌は、通常、大腸菌種から得られたプラスミドであるｐＢＲ３２２によって形質転換される。ｐＢＲ３２２は、アンピシリン（Ａｍｐ）およびテトラサイクリン（Ｔｅｔ）耐性をコードする遺伝子を含むので、形質転換細胞を特定するための簡単な手段を提供する。ｐＢＲ３２２、その誘導体、または、他の微生物プラスミド、またはバクテリオファージはさらに、内因性タンパクの発現のために該微生物によって使用されるプロモーターを含んでもよく、あるいは、含むように修飾されてもよい。特定抗体の発現のために使用されるｐＢＲ３２２の例が、Ｃａｒｔｅｒらの、米国特許第５，６４８，２３７号明細書に詳述される。

【０２３４】
さらに、宿主微生物と適合するレプリコンおよび調節配列を含むファージベクターも、これらの宿主と関連する形質転換ベクターとして使用することが可能である。例えば、λＧＥＭ（商標）－１１などのバクテリオファージは、大腸菌ＬＥ３９２などの、感受性宿主細胞の形質転換に使用することが可能な組み換えベクターの作製に利用することが可能である。
【０２３５】
本発明の発現ベクターは、それぞれ、各ポリペプチド成分をコードする、二つ以上のプロモーター－シストロンペアを含んでもよい。プロモーターとは、シストロンに対して上流（５′）に位置し、シストロンの発現を変調する、翻訳されない、調整配列である。原核細胞プロモーターは、通常、二つのクラス、誘導性および構成的に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養分の有無、または温度変化に応じて、その調節下のシストロンの転写レベルの上昇を起動するプロモーターである。
【０２３６】
種々の可能な宿主細胞によって認識される、たくさんのプロモーターがあり、それらはよく知られる。選択されるプロモーターは、制限酵素消化によって元のＤＮＡからプロモーターを取り除き、該単離プロモーター配列を、本発明のベクターの中に挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作動可能に連結することが可能である。標的遺伝子の直接的増幅および／または発現のために、天然のプロモーター配列、および多数の異種プロモーターの両方の使用が可能である。ある実施態様では、異種プロモーターが利用される。それは、一般に、天然標的ポリペプチドプロモーターと比べて、異種プロモーターの方が、標的遺伝子の発現において、より大きな転写、およびより高い収率を可能とするからである。
【０２３７】
原核性宿主において使用するのに好適なプロモーターとしては、Ｐｈｏ　Ａプロモーター、β－ガラクタマーゼ、およびラクトースプロモーターシステム、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーターシステム、およびハイブリッドプロモーター、例えば、ｔａｃまたはｔｒｃプロモーターが挙げられる。しかしながら、細菌において機能的な、他のプロモーター（例えば、他の、既知の細菌またはファージプロモーター）も同様に好適である。それらのヌクレオチド配列は公表されているので、当業者であれば、それらを、任意の必要制限部位を供給するように、リンカーまたはアダプターを用いて、標的軽鎖および重鎖をコードするシストロンに作動可能に連結することが可能である（Ｓｉｅｂｅｎｌｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８０）　Ｃｅｌｌ　２０：２６９）。
【０２３８】
本発明の一局面では、組み換えベクター内の各シストロンは、発現されたポリペプチドの、膜を横断する転置を指令する、分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの一成分であってもよいし、あるいは、ベクターの中に挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であってもよい。本発明のために選ばれるシグナル配列は、宿主細胞によって認識、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものでなければならない。異種ポリペプチドに付属のシグナル配列を認識し、処理しない原核宿主細胞の場合は、そのシグナル配列は、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐ、または熱安定エンテロトキシンＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡ、およびＭＢＰから成る群から選ばれる、原核性シグナル配列によって置換される。本発明の一実施態様では、発現システムの両シストロンに使用されるシグナル配列は、ＳＴＩＩシグナル配列、およびその変異種である。
【０２３９】
別局面では、本発明による免疫グロブリンの生産は、宿主細胞の細胞原形質で起こることも可能であり、したがって、各シストロンの内部に分泌シグナル配列の存在を要しない。この場合、免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、細胞原形質内部で発現され、フォールド形成し、組立てされて機能的免疫グロブリンを形成する。ある宿主株（例えば、大腸菌

ｔｒｘＢ－株）は、ジスルフィド結合の形成に有利な細胞原形質条件を提供し、そのため、発現されたタンパクサブユニットの適切なフォールド形成および組立てが可能となる。Ｐｒｏｂａ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ｇｅｎｅ，１５９：２０３（１９９５）。

【０２４０】

本発明の抗体の発現に好適な原核宿主細胞としては、古細菌、および真正細菌、例えば、グラム陰性、またはグラム陽性生物が挙げられる。有用な細菌の例としては、例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｂａｃｉｌｌｉ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｐｓｕｄｏｍｏｎａｓ種（例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｒｈｉｚｏｂｉａ、Ｖｉｔｒｅｏｓｃｉｌｌａ、またはＰａｒａｃｏｃｃｕｓが挙げられる。一実施態様では、グラム陰性細胞が使用される。一実施態様では、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）細胞が、本発明のために宿主として使用される。大腸菌株の例としては、Ｗ３１１０（Ｂａｃｈｍａｎｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９８７），ｐｐ．１１９０－１２１９；ＡＴＣＣ（登録商標）寄託番号２７，３２５）、および、その誘導体、例えば、遺伝型Ｗ３１１０ΔｆｈｕＡ（ΔｔｏｎＡ）ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ΔｏｍｐＴΔ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ｄｅｇＰ４１ ｋａｎＲ（米国特許第５，６３９，６３５号明細書）を有する３３Ｄ３株などが挙げられる。その他の株、およびその誘導体、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉＢ、Ｅ．ｃｏｌｉλ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）、およびＥ．ｃｏｌｉＲＶ３０８（ＡＴＣＣ３１，６０８）も適切である。これらの例は、限定的なものではなく、例示のためである。定められた遺伝型を有する、前述の細菌の内のいずれかについて、その誘導体を構築する方法は、当該分野で既知であり、例えば、Ｂａｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）に記載される。一般に、細菌細胞におけるレプリコンの複製性能を考慮に入れながら、適切な細菌を選ぶことが必要である。例えば、レプリコンを供給するのに、周知のプラスミド、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、またはｐＫＮ４１０が使用される場合、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、またはＳａｌｍｏｎｅｌｌａを好適に使用することが可能である。通常、宿主細胞は、最低量のタンパク分解酵素を分泌する必要があり、細胞培養体にはさらに新たにプロテアーゼ阻害剤を取り込ませることが好ましい。

ｉｉ 抗体生産

宿主細胞は、前述の発現ベクターによって形質転換させられ、プロモーターを誘導するように適宜改変された、通例の栄養培地において培養され、形質転換株が選択され、または、所望の配列をコードする遺伝子が増幅される。

【０２４１】

形質転換とは、原核宿主の中に、ＤＮＡを、該ＤＮＡが、染色体外要素として、または、染色体内組み込み体として複製可能となるように導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、その細胞に適切な標準技術を用いて実行される。一般に、しっかりした細胞壁障壁を含む細菌細胞に対しては、塩化カルシウムによるカルシウム処理が用いられる。形質転換のためのもう一つの方法は、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯを用いる。使用される、さらにもう一つの技術は、電気穿孔である。

【０２４２】

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核細胞は、当該分野で既知で、選ばれた宿主細胞の培養に好適な培地において育成される。好適な培地の例としては、例えば、必要栄養添加物を加えたルリアブロス（ＬＢ）が挙げられる。ある実施態様では、培地はさらに、発現ベクターを含む原核細胞の増殖を選択的に可能とするために、発現ベクターの構築に基づいて選ばれる選択剤を含む。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のために、培地にアンピシリンが加えられる。

【０２４３】
さらに、炭素、窒素、および無機リン酸供給源の外に、任意の必要添加物が、単独で、または、別の添加物との混合物として、または、窒素複合供給源などの媒体として、適切な濃度で含まれてもよい。培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール、およびジチオスレイトールから成る群から選ばれる一つ以上の還元剤を任意に含んでもよい。
【０２４４】
原核宿主細胞は、適切な温度で培養される。大腸菌増殖のためには、例えば、好ましい温度は、約２０℃から約３９℃の範囲、より好ましくは約２５℃から約３７℃の範囲、さらに好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に、宿主生物に依存して、約５から約９の範囲内の任意のｐＨであってもよい。大腸菌の場合、ｐＨは、好ましくは約６．８から約７．４、より好ましくは約７．０である。
【０２４５】
本発明の発現ベクターにおいて誘導性プロモーターが使用される場合、タンパク発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一局面では、ポリペプチドの転写調節のために、ＰｈｏＡプロモーターが使用される。したがって、形質転換される宿主細胞は、誘導のために、リン酸塩制限培地において培養される。リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地であることが好ましい（例えば、Ｓｉｍｍｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ(２００２)，２６３：１３３－１４７を参照）。当該分野で知られるように、用いられるベクター構築体にしたがって、外にも、種々の誘導因子を使用してよい。
【０２４６】
一実施態様では、本発明の発現ポリペプチドは、宿主細胞のペリプラズムに分泌され、ペリプラズムから回収される。タンパク回収は、微生物を、一般には、浸透圧ショック、超音波処理、または溶菌などの手段によって破壊することを含む。一旦細胞が破壊されたならば、細胞破片または全体細胞は、遠心またはろ過によって除去してもよい。タンパクはさらに、例えば、アフィニティー樹脂クロマトグラフィーニよって精製してもよい。それとは別に、タンパクは、培地に移し、その中で単離することも可能である。細胞を、培養物から取り出し、培養上清をろ過し、濃縮して、生産されたタンパクをさらに精製してもよい。さらに、この発現ポリペプチドを、周知の方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）、およびウェスタンブロットアッセイを用いて単離し、特定することも可能である。
【０２４７】
本発明の一局面では、抗体生産は、発酵プロセスによって大量に実行される。組み換えタンパクの生産のためには、種々の大規模流加発酵手順が利用可能である。大規模発酵は、少なくとも１０００リットル容量、好ましくは約１，０００から１００，０００リットル容量を有する。これらの発酵槽は、酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を拡散させるために攪拌インペラーを用いる。小規模発酵とは、一般に、容積が約１００リットル未満の発酵槽における発酵を指し、約１リットルから約１００リットルの範囲にあることが可能である。
【０２４８】
発酵プロセスでは、タンパク発現の誘導は、通常、細胞が、適切な条件下で所望の密度、例えば、ＯＤ５５０が約１８０－２２０となるまで育成された後、すなわち、細胞が初期の静止期に達した段階で、起動される。当該分野で既知のように、かつ、前述のように、使用されるベクター構築体に応じて、各種の誘起因子の使用が可能である。細胞は、誘導前に、より短い期間育成してもよい。細胞は、通常、約１２－５０時間誘導されるが、それよりも長いか、または短い誘導時間を使用してもよい。
【０２４９】
本発明のポリペプチドの生産収率および品質を上げるために、様々の発酵条件を改変することが可能である。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切な組立ておよびフォー

ルド形成を向上させるために、シャペロンタンパク、例えば、ＤｓｂタンパクＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｃＣ、ＤｓｂＤ、および／またはＤｓｂＧ）、またはＦｋｐＡ（シャペロン活性を有する、ペプチジルプロリル・シス、トランス－イソメラーゼ）を過剰発現する添加ベクターを用いて、宿主原核細胞を共時形質転換することが可能である。このシャペロンタンパクは、細菌宿主細胞において生産される異種タンパクの適切なフォールド形成および可溶性を促進することが示されている。Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１９６０１－１９６０５；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０８３，７１５号明細書；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０２７，８８８号明細書；Ｂｏｔｈｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１００－１７１０５；Ｒａｍｍ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１０６－１７１１３；Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３９：１９９－２１０。

【０２５０】

発現される異種タンパク（特に、タンパク分解に感受性を持つもの）の分解を最小にするために、タンパク分解酵素を欠乏する、いくつかの宿主株を本発明のために使用することが可能である。例えば、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ、およびそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子突然変異（単数または複数）を実現するように、宿主細胞株を修飾してもよい。いくつかの大腸菌のプロテアーゼ欠損株が市販されており、例えば、Ｊｏｌｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８）上記；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，２６４，３６５号明細書；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５０８，１９２号明細書；Ｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，２：６３－７２（１９９６）に記載される。

【０２５１】

一実施態様では、タンパク分解酵素を欠き、かつ、一つ以上のシャペロンタンパクを過剰発現するプラスミドによって形質転換される大腸菌株が、本発明の発現システムにおける宿主細胞として使用される。

ｉｉｉ．抗体精製

当該分野で既知の標準的タンパク精製法の使用が可能である。下記の手順は、適切な精製手順を示す例示的なものである：免疫アフィニティーまたはイオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、ＤＥＡＥなどの、シリカまたは陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、および、例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－７５使用のゲルろ過。

【０２５２】

一局面では、固相の上に固定されたプロテインＡが、本発明の、完全長抗体産物の免疫アフィニティー精製のために使用される。プロテインＡは、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅａｓから得られた、４１ｋＤの細胞壁タンパクであり、抗体のＦｃ領域に対して高い親和性をもって結合する。Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３。プロテインＡが固定される固相は、ガラスまたはシリカ表面を含むカラムであることが好ましく、より好ましくは孔調節ガラスカラム、またはケイ酸カラムである。ある応用では、カラムは、汚染物質の、非特異的結合を防止する試みとして、グリセロールなどの試薬によってコートされる。

【０２５３】

精製の第１段階として、前述のようにして細胞培養体から得た調製品を、プロテインＡが固定された固相に与え、対象抗体をプロテインＡに特異的に結合させる。次に、この固相を洗浄し、固相に非特異的に結合した汚染物質を除去する。最後に、対象抗体を、溶出によって固相から取り除く。

【０２５４】

ｂ．真核宿主細胞を用いて抗体を生成する

一般に、ベクター成分としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、下記：シグナル配列、複製起点、一つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列、の内の一つ以上が挙げられる。

【０２５５】

（ｉ）シグナル配列成分

真核宿主細胞に使用されるベクターはさらに、対象成熟タンパクまたはポリペプチドのＮ－末端に特異的切断部位を有する、シグナル配列または他のポリペプチドを含んでもよい。選ぶことが好ましい異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現では、哺乳動物シグナル配列のほか、ウィルスの分泌リーダー、例えば、ｈｅｒｐｅｓ ｓｉｍｐｌｅｘ ｇＤシグナルも利用可能である。

【０２５６】

この前駆領域のＤＮＡは、抗体をコードするＤＮＡに対し読み枠を一致させて連結される。

【０２５７】

（ｉｉ）複製起点

一般に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには不要である。例えば、ＳＶ４０起点は、通常、ただ、それが早期プロモーターを含むために使用される。

【０２５８】

（ｉｉｉ）選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる、選択遺伝子を含んでもよい。典型的選択遺伝子は、（ａ）抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク、（ｂ）栄養欠乏を補償するタンパク、関連して、または（ｃ）複合培地からは得られない必須栄養素を供給するタンパク、をコードする。

【０２５９】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止させる薬剤を利用する。異種遺伝子によって思い通りに形質転換された細胞は、薬剤耐性を付与するタンパクを生産し、選択処方を生き延びる。このような優勢選択の例は、薬剤のネオマイシン、マイコフェノール酸、およびハイグロマイシンを用いる。

【０２６０】

哺乳動物細胞のために好適な選択可能マーカーの、もう一つの例は、抗体核酸を取り込むことが可能な細胞の特定を可能とするもの、例えば、ＤＨＦＲ、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン－Ｉおよび－ＩＩ、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

【０２６１】

例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、全ての形質転換体を、ＤＨＦＲの競合的拮抗剤である、メトトレキセート（Ｍｔｘ）を含む培地において培養することによって特定される。野生型ＤＨＦＲを用いる場合、適切な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性を欠く、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞系列（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－９０９６）である。

【０２６２】

それとは別に、抗体、野生型ＤＨＦＲタンパク、および、もう一つの選択可能マーカー、例えば、アミノグリコシド３′－フォスフォトランスフェラーゼ（ＡＰＨ）をコードするＤＮＡ配列によって形質転換されるか、または同時形質転換される宿主細胞（特に、内因性ＤＨＦＲを含む野生型宿主細胞）は、選択可能マーカーのための選択剤、例えば、カナマイシン、またはＧ４１８を含む培地において細胞増殖することによって選択することが可能である。米国特許第４，９６５，１９９号明細書を参照されたい。

【０２６３】

（ｉｖ）プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗体ポリペプチド核酸に作動可能に連結されるプロモーターを含む。真核細胞のためのプロモーターは既知である。ほぼ全ての真核細胞は、転写が起動される部位から約２５から３０塩基上流にＡＴに富んだ領域を配置させる。多くの遺伝子の転写開始点から７０から８０塩基上流に見出されるもう一つの配列は、ＣＮＣＡＡＴ領域であり、この式において、Ｎは任意のヌクレオチドであってもよい（配列番号６０）。多くの真核細胞遺伝子の３′末端には、ＡＡＴＡＡＡ配列がある。これは、コード配列の３′末端（配列番号６１）に対するポリＡ付加のシグナルとなると考えられる。これらの配列は全て、真核細胞発現ベクターの中に適切に挿入される。

【０２６４】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターによる抗体ポリペプチドの転写は、そのプロモーターが宿主細胞システムと適合する限り、例えば、ウィルスのゲノム、例えば、ポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス、アデノウィルス（例えば、アデノウィルス２）、牛パピローマウィルス、鳥類肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス、およびシミアンウィルス４０（ＳＶ４０）のゲノムから得られるプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーター、または免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって調節される。

【０２６５】

ＳＶ４０ウィルスの早期および後期プロモーターは、好都合にも、さらにＳＶ４０ウィルスの複製起点を含む、ＳＶ４０制限断片として得られる。ヒトのサイトメガロウィルスの初期プロモーターは、好都合にも、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限断片として得られる。ベクターとして牛パピローマウィルスを用いる、哺乳動物宿主におけるＤＮＡ発現システムが、米国特許第４，４１９，４４６号明細書に開示される。このシステムの改変版が、米国特許第４，６０１，９７８号明細書に記載される。それとは別に、ラウス肉腫ウィルスの長い末端反復列も、プローモーターとして使用することが可能である。

【０２６６】

（ｖ）エンハンサー要素成分

比較的高度な真核細胞による、本発明の抗体ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増大することがよくある。現在では、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトタンパク、およびインスリン）について多くのエンハンサーが知られる。しかしながら、通常、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後期側（ｂｐ１００－２７０）のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウィルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウィルスエンハンサーが挙げられる。さらに、真核細胞プロモーター活性化のための促進要素について、Ｙａｎｉｖ，Ｎａｔｕｒｅ　２９７：１７－１８（１９８２）を参照されたい。エンハンサーはスプライスされて、抗体ポリペプチドコード配列に対して、５′または３′側の位置においてベクター中に挿入されてもよいが、プロモーターから５′側の部位に配置されることが好ましい。

【０２６７】

（ｖｉ）転写終結成分

真核宿主細胞において使用される発現ベクターは、通常、転写を終結させ、ｍＲＮＡを安定化するのに必要な配列をさらに含む。このような配列は、一般に、真核細胞またはウィルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの５′、および時には３′の未翻訳領域から得られる。これらの領域は、抗体をコードするｍＲＮＡの未翻訳部分中のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分は、牛成長ホルモンのポリアデニル化領域である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレット、およびそこに開示される発現ベクターを参照されたい。

【０２６８】

（ｖｉｉ）宿主細胞の選択および形質転換

本発明のベクターにおいてＤＮＡをクローニングし、発現するのに好適な宿主細胞としては、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書に記載される、比較的高度な真核細胞が挙げられる。培養において脊椎動物細胞を継代することは（組織培養）は、通例手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞の例として、ＳＶ４０で形質転換した、サル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１）；ヒト胚腎臓系統（２９３細胞、または、縣濁培養による育成のためにサブクローンされた２９３細胞、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；新生児ハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．７７：４２１６（１９８０））；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））；サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７０）；アフリカ緑猿腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒトのヘパトーム系統（Ｈｅｐ　Ｇ２）がある。

【０２６９】

宿主細胞は、抗体生産のために、前述の発現またはクローニングベクターによって形質転換され、プロモーターを誘導するために適宜に改変された通例の栄養培地において培養され、形質転換体が選択され、所望の配列をコードする遺伝子が増幅される。

【０２７０】

（ｖｉｉｉ）宿主細胞を培養する

本発明の抗体を生産するために使用される宿主細胞は、種々の培地において培養してよい。市販の培地、例えば、Ｈａｍ′ｓ　Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ））、およびＤｕｌｂｅｃｃｏの改変Ｅａｇｌｅ培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）は、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、Ｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９）、Ｂａｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０）、米国特許第４，７６７，７０４号明細書；同第４，６５７，８６６号明細書；同第４，９２７，７６２号明細書；同第４，５６０，６５５号明細書；または同第５，１２２，４６９号明細書；国際公開第９０／０３４３０号パンフレット；同第８７／００１９５号パンフレット；または米国再発行特許第Ｒｅ．３０，９８５号明細書に記載される培地の内のいずれかを、宿主細胞の培養培地として使用してもよい。これらの培地は、いずれも、ホルモンおよび／またはその他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または表皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、バッファー（例えば、ＨＥＰＥＳ）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬剤）、微量要素（通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、および、グルコース、または当量エネルギー供給源を、適宜、補給されてもよい。さらに、その他、当業者には知られると考えられる、必要添加物は、いずれのものでも適切な濃度において含めてよい。培養条件、例えば、温度、ｐＨなどは、発現のために選択された宿主について以前に使用されているものであり、当業者にとっては明白であろう。

【０２７１】

（ｉｘ）抗体の精製

組み換え技術を用いる場合、抗体は、細胞内に生産することが可能であるし、あるいは、培地中に直接分泌させることも可能である。抗体が細胞内で生産される場合、第１工程

として、宿主細胞または分解断片のものである粒状破片を、例えば、遠心またはろ過によって除去する。抗体が培地に分泌される場合は、一般的には先ず、その発現システムから得られた上清を、市販のタンパク濃縮フィルター、例えば、Ａｍｉｃｏｎ、またはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ（登録商標）限外ろ過ユニットを用いて濃縮する。前記工程のいずれかに、ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を含めてもよく、かつ、外来汚染菌の増殖を防止するため抗生物質を含めてもよい。

【０２７２】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することが可能であるが、アフィニティークロマトグラフィーが、好ましい精製技術である。アフィニティーリガンドとしてプロテインＡが好適であるかどうかは、抗体中に存在する免疫グロブリンＦｃドメインの種類およびアイソタイプに依存する。ヒトのγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するにはプロテインＡを用いることが可能である（Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３（１９８３））。マウスの全アイソタイプ、およびヒトのγ３に対してはプロテインＧが薦められる（Ｇｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．５：１５６７１５７５（１９８６））。アフィニティーリガンドが付着される基質は、多くの場合、アガロースであるが、他の基質も利用可能である。機械的に安定な基質、例えば、孔調節ガラス、またはポリ（スチレンジビニール）ベンゼンの場合、アガロースにおいて実現可能なものよりも、より速い流速、およびより短い処理時間が可能となる。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｉｐｓｂｕｒｇ，ＮＪ）が、精製のために有用である。タンパク精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）によるクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）によるクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈殿などの技術も、回収される抗体に応じて利用が可能である。

【０２７３】

いずれかの予備精製工程（単数または複数）の後、対象抗体および汚染物質を含む混合物に対し、約２．５－４．５のｐＨの溶出バッファーを用い、好ましくは低い塩濃度において（例えば、約０－０．２５Ｍの塩）、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーを実施してもよい。

免疫複合体

本発明はさらに、細胞傷害剤、例えば、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、トキシン（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の、酵素的に活性なトキシン、またはその断片）、または放射性同位元素に結合させた（すなわち、放射性複合体）、本明細書に記載される、いずれかの抗ＤＬＬ４抗体を含む免疫複合体（「抗体－薬剤複合体」または“ＡＤＣ”と相互交換的に使用される）を提供する。

【０２７４】

癌の処置において、細胞傷害性または細胞増殖抑制性薬剤、すなわち、腫瘍細胞を殺すか、増殖抑制する薬剤の局所的送達のために抗体－薬剤複合体を用いることは（Ｓｙｒｉｇｏｓ　ａｎｄ　Ｅｐｅｎｅｔｏｓ（１９９９）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１９：６０５－６１４；Ｎｉｃｕｌｅｓｃｕ－Ｄｕｖａｚ　ａｎｄ　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（１９９７）Ａｄｖ．Ｄｒｇ　Ｄｅｌ．Ｒｅｖ．２６：１５１－１７２；米国特許第４，９７５，２７８号明細書）、腫瘍に対する薬剤成分の標的指向性送達、および該腫瘍における細胞内蓄積を可能とする。一方、これらの薬剤が、結合されずに全身投与された場合、排除することを求める腫瘍細胞の外に、正常細胞にたいしても受け容れがたいほどのレベルの毒性をもたらす可能性がある（Ｂａｌｄｗｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８６）Ｌａｎｃｅｔ　ｐｐ．（Ｍａｒ．１５，１９８６）：６０３－０５；Ｔｈｏｒｐｅ，（１９８５）“Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃａｒｒｉｅｒｓ　Ｏｆ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ａｇｅｎｔ

ｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ '８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａ．Ｐｉｎｃｈｅｒａ ｅｔ ａｌ．（ｅｄ．ｓ），ｐｐ．４７５－５０６）。このようにして、毒性を最小にしながら最大の効力が求められる。この戦略では、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が有用であると報告されている（Ｒｏｗｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２１：１８３－８７）。この方法に使用される薬剤としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンデシンが挙げられる（Ｒｏｗｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）上記）。抗体－トキシン複合体において使用されるトキシンとしては、細菌トキシン、例えば、ジフテリアトキシン、植物トキシン、例えば、リシン、小型分子トキシン、例えば、ゲルダナマイシン（Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｊｏｕｒ．ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．９２（１９）：１５７３－１５８１；Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １０：１０２５－１０２８；Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３：７８６－７９１）、マイタンシノイド（欧州特許第１３９１２１３号明細書；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：８６１８－８６２３）、およびカリケアミシン（Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：２９２８；Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：３３３６－３３４２）が挙げられる。これらのトキシンは、チューブリン結合、ＤＮＡ結合、またはトポイソメラーゼ抑制を含む機構によって、その細胞毒性および細胞増殖抑制作用を実行すると考えられる。ある細胞毒性薬剤は、大きな抗体、またはタンパク受容体リガンドに結合されると、不活性になるか、より活性が低くなる傾向がある。

【０２７５】

ＺＥＶＡＬＩＮ（登録商標）（イブリツモマブチューキセタン、Ｂｉｏｇｅｎ／Ｉｄｅｃ）は、抗体－放射性同位元素複合体であって、正常および悪性Ｂリンパ球の表面に見られるＣＤ２０抗原に対して向けられる、マウスＩｇＧ１カッパモノクローナル抗体、および、^{111}Ｉｎまたは^{90}Ｙ放射性同位元素が、チオウレアリンカー－キレート剤によって結合されて構成される複合体である（Ｗｉｓｅｍａｎ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｅｕｒ．Ｊｏｕｒ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．２７（７）：７６７－７７；Ｗｉｓｅｍａｎ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｂｌｏｏｄ ９９（１２）：４３３６－４２；Ｗｉｔｚｉｇ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０（１０）：２４５３－６３；Ｗｉｔｚｉｇ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０（１５）：３２６２－６９）。ＺＥＶＡＬＩＮは、Ｂ細胞非ホジキン型リンパ腫（ＮＨＬ）に対しては活性を有するが、投与は、多くの患者において重篤な、長期の血球欠乏症をもたらす。ＭＹＬＯＴＡＲＧ（商標）（ゲムツズマブオゾガマイシン、Ｗｙｅｔｈ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）は、カリケアマイシンに連結させたヒトＣＤ３３抗体から構成される抗体薬剤複合体であるが、急性骨髄性白血病の注射処置として２０００年に承認された（Ｄｒｕｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ（２０００）２５（７）：６８６；米国特許第４９７０１９８号明細書；同第５０７９２３３号明細書；同第５５８５０８９号明細書；同第５６０６０４０号明細書；同第５６９３７６２号明細書；同第５７３９１１６号明細書；同第５７６７２８５号明細書；同第５７７３００１号明細書）。カンツズマブメルタンシン（Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ，Ｉｎｃ．）は、ジスルフィドリンカーＳＰＰを介してマイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１に連結させたｈｕＣ２４２抗体から構成される、抗体薬剤複合体であるが、これは、現在、ＣａｎＡｇを発現する癌、例えば、結腸、すい臓、胃癌などの処置用としてＩＩ相治験に進んでいる。ＭＬＮ－２７０４（Ｍｉｌｌｅｎｉｕｍ Ｐｈａｒｍ．，ＢＺＬ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ Ｉｎｃ．）は、マイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１に連結させた、抗前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）モノクローナル抗体であるが、これは、前立腺腫瘍処置の可能な薬剤として現在開発中である。ドラスタチンの合成類

縁体である、アウリスタチンペプチド、アウリスタチンＥ（ＡＥ）およびモノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）は、キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６（癌上のＬｅｗｉｓ Ｙに対して特異的）およびｃＡＣ１０（血清学的悪性腫瘍上のＣＤ３０に対して特異的）に対して結合され（Ｄｏｒｏｎｉｎａ ｅｔ ａｌ（２００３）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ２１（７）：７７８－７８４）、現在治療剤として開発中である。

【０２７６】

免疫複合体の生成において有用な化学療法剤が本明細書に（例えば、上記）記載される。酵素的に活性なトキシン、および、使用が可能な、その断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、エキソトキシンＡ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク、ジアンチンタンパク、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号パンフレットを参照されたい。放射性複合抗体の生産のために、各種の放射性核種の利用が可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、および^{186}Ｒｅが挙げられる。抗体および細胞傷害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製される。例えば、リシン免疫トキシンは、Ｖｉｔｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：１０９８（１９８７）に記載されるように調製することが可能である。炭素１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体に放射性核種を結合するための、例示のキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレットを参照されたい。

【０２７７】

抗体、および、一つ以上の小分子トキシン、例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコテセン、およびＣＣ１０６５、および、トキシン活性を有する、これらのトキシンの誘導体から成る複合体も、本発明の考慮の対象とされる。

【０２７８】

ｉ．マイタンシンおよびマイタンシノイド

ある実施態様では、免疫複合体は、一つ以上のマイタンシノイド分子に結合させた、本発明の抗体（完全長、または断片）を含む。

【０２７９】

マイタンシノイドは、チューブリンの重合を抑制することによって活動する細胞分裂阻害剤である。マイタンシンは、最初、東アフリカ産潅木Ｍａｙｔｅｎｕｓ ｓｃｒｒａｔａから単離された（米国特許第３，８９６，１１１号明細書）。次いで、ある種の微生物も、マイタンシノイド、例えば、マイタンシノール、およびＣ－３マイタンシノールエステルを生産することが発見された（米国特許第４，１５１，０４２号明細書）。合成マイタンシノール、およびその誘導体および類縁体が、例えば、米国特許第４，１３７，２３０号明細書；同第４，２４８，８７０号明細書；同第４，２５６，７４６号明細書；同第４，２６０，６０８号明細書；同第４，２６５，８１４号明細書；同第４，２９４，７５７号明細書；同第４，３０７，０１６号明細書；同第４，３０８，２６８号明細書；同第

４，３０８，２６９号明細書；同第４，３０９，４２８号明細書；同第４，３１３，９４６号明細書；同第４，３１５，９２９号明細書；同第４，３１７，８２１号明細書；同第４，３２２，３４８号明細書；同第４，３３１，５９８号明細書；同第４，３６１，６５０号明細書；同第４，３６４，８６６号明細書；同第４，４２４，２１９号明細書；同第４，４５０，２５４号明細書；同第４，３６２，６６３号明細書；および同第４，３７１，５３３号明細書に開示される。

【０２８０】

マイタンシノイド薬剤成分は、抗体薬剤複合体において魅力的な薬剤である。その理由は、これらの成分は、（ｉ）発酵、または化学的修飾、または、発酵産物の誘導体形成によって比較的入手し易いこと、（ｉｉ）抗体に対し非ジスルフィドリンカーを介して結合するのに好適な官能基による誘導体形成に受容的であること、（ｉｉｉ）血漿において安定であること、および（ｉｖ）各種腫瘍細胞系統に対して有効である、からである。

【０２８１】

マイタンシノイドを含む免疫複合体、その製法、およびその治療的使用は、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、同第５，４１６，０６４号明細書、および欧州特許第０　４２５　２３５Ｂ１明細書に開示される。なお、この開示を、引用により本明細書に含めることを明言する。Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３:８６１８－８６２３（１９９６）は、ヒトの結腸直腸癌に対して向けられたモノクローナル抗体Ｃ２４２に結合された、ＤＭ１と表示されるマイタンシノイドを含む免疫複合体を記載する。この複合体は、培養された結腸癌細胞に対し高度の細胞傷害性を持つことが見出され、かつ、インビボの腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：１２７－１３１（１９９２）は、免疫複合体であって、マイタンシノイドが、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞系統上の抗原に結合するマウス抗体Ａ７に連結されるか、または、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ癌遺伝子に結合する、別のマウスモノクローナル抗体ＴＡ．１に連結される免疫複合体を記載する。ＴＡ．１－マイタンシノイド複合体の細胞傷害性を、細胞当たり３×１０^{5}ＨＥＲ－２表面抗原を発現する、ヒト乳癌細胞系統ＳＫ－ＢＲ－３についてインビトロで試験した。この薬剤複合体は、遊離マイタンシノイド薬剤と同程度の細胞傷害性を実現したが、これは、抗体分子当たりのマイタンシノイド分子の数を増すことによってさらに上昇が可能であることが予想された。Ａ７－マイタンシノイド複合体は、マウスの全身に投与したが、低い細胞傷害性を示した。

【０２８２】

抗体－マイタンシノイド複合体は、抗体を、マイタンシノイド分子に対し、抗体またはマイタンシノイド分子の生物活性を著明に下げることなく、化学的に連結することによって調製される。例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書（この開示を、引用により本明細書に含めることを明言する）を参照されたい。抗体１分子当たり、マイタンシノイド平均３－４分子の結合が、抗体の機能または可溶性に対し否定的影響を及ぼすことなく、標的細胞に対する細胞傷害性の強化において効力を示した。ただし、抗体当たり１分子のトキシンであっても、抗体単独の使用よりも、細胞傷害性を強化することが予想されると考えられる。マイタンシノイドは、当該分野において周知であり、既知の技術によって合成するか、または、天然資源から単離することが可能である。適切なマイタンシノイドは、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、および、その他の、本明細書に引用される、特許および非特許公刊物において開示される。好ましいマイタンシノイドは、マイタンシノール、および、芳香環において、または、マイタンシノール分子の他の位置において修飾されるマイタンシノール類縁体、例えば、各種マイタンシノールエステルである。

【０２８３】

抗体－マイタンシノイド複合体を作製するために、従来技術においてたくさんの結合基があり、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、または欧州特許第０　４２５　２３５　Ｂ１号明細書、Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ

５２：１２７－１３１（１９９２）、および、２００４年１０月８日出願の米国特許出願第１０／９６０，６０２号明細書に開示されるものが挙げられる。なお、この開示を引用により本明細書に含めることを明言する。リンカー成分ＳＭＣＣを含む抗体－マイタンシノイドは、２００４年１０月８日出願の米国特許出願第１０／９６０，６０２号明細書に開示されるように調製してもよい。この結合基としては、例えば、上に引用した特許に開示されるように、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸感受基、光感受基、ペプチダーゼ感受基、またはエステラーゼ感受基が挙げられるが、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。さらに別の結合基が、本明細書において記述され、例示される。

【０２８４】

抗体およびマイタンシノイドの複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシニミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製してよい。特に好ましい結合剤としては、例えば、ジスルフィド結合を実現するために、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）（Ｃａｒｌｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１７３：７２３－７３７（１９７８））、および、Ｎ－スクシニミジル－４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）が挙げられる。

【０２８５】

リンカーは、結合の種類に応じて、マイタンシノイド分子の様々な位置に付着させてよい。例えば、通例の結合技術を用いて、ヒドロキシル基と反応させることによってエステル結合を形成してもよい。反応は、ヒドロキシル基を持つＣ－３位置、ヒドロキシメチルによって修飾されるＣ－１４位置、ヒドロキシル基によって修飾されるＣ－１５位置、およびヒドロキシル基を持つＣ－２０位置において行われてもよい。好ましい実施態様では、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類縁体のＣ－３位置に形成される。

【０２８６】

ｉｉ．アウリスタチンおよびドラスタチン

ある実施態様では、免疫複合体は、ドラスタチン、またはドラスタチンペプチド類縁体および誘導体、アウリスタチンに結合された、本発明の抗体を含む（米国特許第５６３５４８３号明細書；同第５７８０５８８号明細書）。ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解、および核分裂および細胞分裂に干渉（Ｗｏｙｋｅ　ｅｔ　ａｌ（２００１）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４５（１２）：３５８０－３５８４）し、抗癌活性（米国特許第５６６３１４９号明細書）、および抗真菌活性（Ｐｅｔｔｉｔ　ｅｔ　ａｌ（１９９８）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４２：２９６１－２９６５）を有することが示されている。ドラスタチンまたはアウロスタチン薬剤成分は、このペプチド様薬剤成分のＮ（アミノ）末端、またはＣ（カルボキシ）末端を介して抗体に付着させてもよい（国際公開第０２／０８８１７２号パンフレット）。

【０２８７】

例示のアウリスタチン実施態様は、２００４年１１月５日出願の米国特許出願第１０／９８３，３４０号明細書、“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　Ｃａｐａｂｌｅ　ｏｆ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ　ｔｏ　Ｌｉｇａｎｄｓ”に開示される、Ｎ－末端結合モノメチルアウリスタン薬剤成分ＤＥおよびＤＦを含む。なお、この開示の全体を、引用に本明細書に含めることを明言する。

【０２８８】

通常、ペプチド系薬剤成分は、二つ以上のアミノ酸および／またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって調製することが可能である。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知の、液相合成法（例えば、Ｅ．Ｓｈｒｏｅｄｅｒ ａｎｄ Ｋ．Ｌｕｂｋｅ，“Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，”ｖｏｌｕｍｅ １，ｐｐ ７６－１３６，１９６５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓを参照）にしたがって調製することが可能である。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、下記：米国特許第５６３５４８３号明細書；同第５７８０５８８号明細書；Ｐｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１１：５４６３－５４６５；Ｐｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ １３：２４３－２７７；Ｐｅｔｔｉｔ，Ｇ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，１９９６，７１９－７２５；およびＰｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９９６）Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１５：８５９－８６３の方法にしたがって調製してよい。さらに、Ｄｏｒｏｉｎａ（２００３）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２１（７）：７７８－７８４；“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｃａｐａｂｌｅ ｏｆ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｔｏ Ｌｉｇａｎｄｓ，”２００４年１１月５日出願米国特許出願１０／９８３，３４０号明細書を参照されたい。なお、この開示の全体を引用により本明細書に含める（リンカーに結合される、モノメチルバリン化合物、例えば、ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦを調製するリンカーおよび方法を開示）。

【０２８９】

ｉｉｉ．カリケアミシン

別の実施態様では、免疫複合体は、一つ以上のカリケアミシン分子に結合される、本発明の抗体を含む。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で２本鎖ＤＮＡの断点を生成することが可能である。カリケアマイシンファミリー複合体の調製については、米国特許第５，７１２，３７４号明細書、同第５，７１４，５８６号明細書、同第５，７３９，１１６号明細書、同第５，７６７，２８５号明細書、同第５，７７０，７０１号明細書、同第５，７７０，７１０号明細書、同第５，７７３，００１号明細書、同第５，８７７，２９６号明細書（全てＡｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄ Ｃｏｍｐａｎｙに付与されたもの）を参照されたい。使用してもよい、カリケアミシンの構造的類縁体としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、Ｎ－アセチル－γ_1^I、ＰＳＡＧ、およびθ^I_1（Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：３３３６－３３４２（１９９３），Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：２９２５－２９２８（１９９８）、および、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄに付与された前述の米国特許）が挙げられる。抗体を結合することが可能な、もう一つの抗腫瘍剤は、アンチフォレートであるＱＦＡである。カリケアマイシンおよびＱＦＡは、共に、細胞内活動部位を持つが、直ぐには原形質膜を横断しない。したがって、抗体仲介性内部進入によって、これらの薬剤の細胞内取り込みが起こるとその細胞傷害作用が大きく促進される。

【０２９０】

ｉｖ．その他の細胞傷害剤

本発明の抗体に対して結合することが可能な、他の抗腫瘍剤としては、ＢＣＮＵ、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン、および５－フルオロウラシルで、いずれも、米国特許第５，０５３，３９４号明細書、同第５，７７０，７１０号明細書に記載される、まとめてＬＬ－Ｅ３３２８８複合体と呼ばれる薬剤ファミリーの外、エスペラミシン（米国特許第５，８７７，２９６号明細書）が挙げられる。

【０２９１】

酵素的に活性なトキシン、および、使用が可能な、その断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、エキソトキシンＡ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク、ジアンチンタンパク、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ

）、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号パンフレットを参照されたい。

【０２９２】

本発明はさらに、抗体と、核分解性活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼなどのＤＮＡエンドヌクレアーゼ、ＤＮアーゼ）との間に形成される免疫複合体を考慮の対象とする。

【０２９３】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は、放射活性の高い原子を含んでもよい。例としては、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}、および、Ｌｕの放射性同位元素が挙げられる。複合体が検出のために使用される場合、該複合体は、シンチグラフィー実験用の放射性原子、例えば、tc^{99m}、またはI^{123}を含んでもよいし、または、核磁気共鳴（ＮＭＲ）画像法（磁気共鳴画像法、ｍｒｉとも呼ばれる）用のスピンラベル、例えば、ここでもヨウ素－１２３、ヨウ素－１３１、インジウム－１１１、フッ素－１９、炭素－１３、窒素－１５、酸素－１７、ガドリニウム、マンガン、または鉄を含んでもよい。

【０２９４】

放射性、または他のラベルは、既知の方法で複合体の中に組み込んでよい。例えば、ペプチドは生合成してもよいし、あるいは、水素の代わりにフッ素－１９を含む、適切なアミノ酸前駆体を用いる化学的アミノ酸合成によって合成してもよい。tc^{99m}またはI^{123}、Re^{186}、Re^{188}、およびIn^{111}などのラベルは、システイン残基を介してペプチドに付着させることが可能である。イットリウム－９０は、リジン残基を介して付着させることが可能である。ヨウ素－１２３を組み込むには、ＩＯＤＯＧＥＮ法（Ｆｒａｋｅｒ ｅｔ ａｌ（１９７８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．８０：４９－５７）を用いることが可能である。“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｓｃｉｎｔｉｇｒａｐｈｙ”（Ｃｈａｔａｌ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ １９８９）には他の方法が詳細に記載される。

【０２９５】

抗体および細胞傷害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシニミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製してよい。例えば、リシン免疫トキシンは、Ｖｉｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３８：１０９８（１９８７）に記載されるように調製することが可能である。炭素１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体に放射性核種を結合するための、例示のキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレットを参照されたい。リンカーは、細胞における細胞傷害剤の放出を促進する「切断性リンカー」であってもよい。例えば、酸感受性リンカー、光感受性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、または、ジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：１２７－１３１（１９９２）；米国特許第５，２０８，０２０号明細書）を使用してもよい。

【０２９６】

本発明の化合物は、明瞭に、例えば、ただしこれらに限定されないが、架橋リンカー試

薬：ＢＭＰＳ，ＥＭＣＳ，ＧＭＢＳ，ＨＢＶＳ，ＬＣ－ＳＭＣＣ，ＭＢＳ，ＭＰＢＨ，ＳＢＡＰ，ＳＩＡ，ＳＩＡＢ，ＳＭＣＣ，ＳＭＰＢ，ＳＭＰＨ，ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ，ｓｕｌｆｏ－ＧＭＢＳ，ｓｕｌｆｏ－ＫＭＵＳ，ｓｕｌｆｏ－ＭＢＳ，ｓｕｌｆｏ－ＳＩＡＢ，ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ，およびｓｕｌｆｏ－ＳＭＰＢ、およびＳＶＳＢ（スクシニミジル－（４－ビニールスルフォン）ベンゾエート）によって調製されるＡＤＣを考慮の対象とする。これらの架橋剤は、市販されている（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．）。Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ａｎｄ Ｃａｔａｌｏｇ，ページ４６７－４９８、２００３－２００４を参照されたい。

【０２９７】

ｖ．抗体薬剤複合体の調製

本発明の抗体薬剤複合体（ＡＤＣ）では、抗体（Ａｂ）は、リンカー（Ｌ）を介して、一つ以上の薬剤成分（Ｄ）に、例えば、１抗体当たり約１から約２０の薬剤成分に結合される。式ＩのＡＤＣは、当業者に既知の、有機化学反応、条件、および試薬を用い、いくつかのルート：（１）抗体の求核基を、共有結合を介して二価リンカー試薬と反応させてＡｂ－Ｌを形成し、次いで、薬剤成分Ｄを反応させること；および、（２）薬剤成分の求核基を、共有結合を介して二価リンカー試薬と反応させてＤ－Ｌを形成し、次いで、抗体の求核基と反応させることによって調製してもよい。ＡＤＣを調製するための、さらに別の方法が本明細書に記載される。

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

リンカーは、一つ以上のリンカー成分から構成されていてもよい。例示のリンカー成分としては、６－マレイミドカプロイル（“ＭＣ”），マレイミドプロパノイル（“ＭＰ”）、バリン－シトルリン（“ｖａｌ－ｃｉｔ”）、アラニン－フェニルアラニン（“ａｌａ－ｐｈｅ”）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（“ＰＡＢ”）、Ｎ－スクシニミジル－４－（２－ピリジルジチオ）カルボキシレート（“ＳＰＰ”）、Ｎ－スクシニミジル－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”）、およびＮ－スクシニミジル（４－イオド－アセチル）アミノベンゾエート（“ＳＩＡＢ”）が挙げられる。さらに別のリンカー成分が当該分野で既知であり、いくつかは本明細書に記載される。さらに、“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｃａｐａｂｌｅ ｏｆ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｔｏ Ｌｉｇａｎｄｓ，”２００４年１１月５日出願米国特許出願第１０／９８３，３４０号明細書を参照されたい。なお、この内容全体を参考として本明細書に援用する。

【０２９８】

ある実施態様では、リンカーは、アミノ酸残基を含む。例示のアミノ酸リンカー成分としては、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が挙げられる。例示のジペプチドとしては：バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）が挙げられる。例示のトリペプチドとしては：グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）、およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）が挙げられる。アミノ酸リンカー成分を構成するアミノ酸残基は、天然のものの外、非重要アミノ酸、および非天然のアミノ酸類縁体、例えば、シトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は、ある特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ、およびＤ、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に対し選択性を持つように、かつ、その感受性が最適となるように設計することが可能である。

【０２９９】

抗体上の求核基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが：（ｉ）Ｎ－末端アミノ基、（ｉｉ）側鎖アミノ基、例えば、リジン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えば、システイン、および（ｉｖ）抗体がグリコシル化される場所における、糖ヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられる。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー成分上の求電子基と反応して共有結合を形成することが可能であり、リンカー

試薬としては：（ｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロフォルメート、およびハロゲン化酸；（ｉｉ）ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えば、ハロアセタミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基が挙げられる。ある種の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわち、システイン架橋を有する。抗体は、ＤＴＴ（ジチオスレイトール）などの還元剤によって処理することによって結合のために反応性を持たせてもよい。したがって、各システイン架橋は、理論的には、二つの反応性チオール求核基を形成することになる。リジンを、２－イミノチオラン（Ｔｒａｕｔの試薬）と反応させることによって、さらに別の求核基を抗体の中に導入することが可能であり、これによってアミノ酸はチオールに変換される。反応性チオール基は、１、２、３、４個以上のシステイン残基を導入することによって（例えば、一つ以上の非天然の、システインアミノ酸残基を含む突然変異アミノ酸を調製することによって）、抗体（またはその断片）の中に導入してもよい。

【０３００】

本発明の抗体薬剤複合体はさらに、抗体を修飾して、リンカー試薬または薬剤の求核置換基と反応することが可能な、求電子成分を導入することによって生産することも可能である。グリコシル化抗体の糖類は、例えば、過ヨウ素酸酸化試薬によって酸化してアルデヒドまたはケトン基を形成し、これを、リンカー試薬または薬剤成分のアミノ基と反応させてもよい。得られたイミンＳｃｈｉｆｆ塩基性基が安定な結合を形成してもよいし、あるいは、例えば、水素化ホウ素試薬によって還元して安定なアミン結合を形成させてもよい。一実施態様では、グリコシル化抗体の炭水化物成分を、ガラクトースオキシダーゼ、または、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、該タンパク中にカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を生成させ、これを、薬剤上の適切な基と反応させてもよい（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）。別の実施態様では、Ｎ－末端セリンまたはトレオニン残基を含むタンパクは、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、第１アミノ酸の代わりにアルデヒドを生産させることも可能である（Ｇｅｏｇｈｅｇａｎ　＆　Ｓｔｒｏｈ，（１９９２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．３：１３８－１４６；米国特許第５３６２８５２号明細書）。このようなアルデヒドは、薬剤成分またはリンカーの求核基と反応させることが可能である。

【０３０１】

同様に、薬剤成分上の求核基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジド基が挙げられる。これらは、リンカー成分上の求電子基と反応して共有結合を形成することが可能であり、かつ、リンカー試薬としては：（ｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロフォルメート、およびハロゲン化酸；（ｉｉ）ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えば、ハロアセタミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基が挙げられる。

【０３０２】

それとは別に、抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパクは、例えば、組み換え技術またはペプチド合成によって作製してもよい。ＤＮＡの長さは、複合体の二つの部分をコードするそれぞれの領域を、互いに隣接させるか、または、複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域に隔てられて含んでもよい。

【０３０３】

さらに別の実施態様では、抗体を、腫瘍の先行標的照準に利用するために「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）に結合する。この場合、この抗体－受容体複合体は、患者に投与され、次いで、排泄剤を用いて未結合の複合体が循環から除去され、次に、細胞傷害剤（例えば、放射性核種）に結合された「リガンド」（例えば、アビジジン）が投与される。

製薬処方

本発明の抗体を含む製薬処方は、所望の純度を有する抗体を、任意の、生理的に受容可

能な担体、賦形剤、または安定化剤と、水溶液、凍結乾燥処方、またはその他の乾燥処方の形を取るように混ぜ合わせることによって（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０００））保存用に調製される。受容可能な担体、賦形剤、または安定化剤は、用いる用量および濃度においてレシピエントに対して無毒であり、バッファー、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、およびその他の有機酸；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメソニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼソニウムクロリド；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール）；低分子量（１０残基未満）ポリペプチド；タンパク、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニールピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、またはデキストランなど；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク複合体）；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、ＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む。

【０３０４】

本発明の処方はさらに、処置される特定の適応症に必要な、一つより多い活性化合物で、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を持つ活性化合物を含んでもよい。このような分子は、意図される目的に対して有効な量において適切に組み合わされて存在する。

【０３０５】

これらの活性成分はさらに、例えば、コアセルベーション技術、または界面重合によって調製される微小カプセルに、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－微小カプセルに、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、微粒子乳剤、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、または、マクロ粒子乳剤に捕捉されてもよい。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０００）に開示される。

【０３０６】

インビボ投与に使用される処方は無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜によるろ過によって簡単に実現される。

【０３０７】

持続放出調剤を調製してもよい。持続放出調剤の適切な例としては、本発明の免疫グロブリンを含む、成形品、例えば、フィルム、または微小カプセルの形状を取る、疎水性固相ポリマーの半透性基質を含む。持続放出基質の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリ（ビニールアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号明細書）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタミン酸塩のコポリマー、非分解性エチレンビニールアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えば、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびリュープロリドアセテートから構成される注入可能な微小球）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシルブチル酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニールおよび乳酸－グリコール酸などのポリマーは、１００日以上に亘る分子の放出を可能とするが、ある種のヒドロゲルはより短い期間タンパクを放出する。カプセル封入された免疫グロブリンは、生体内に長期間留まると、３７℃で湿気に暴露されるために分解または凝集する場合があり、このために、生物活性が消失したり、免疫原性が変化する可能性がある。関与する機序に応じて、安定化のために合理的戦略を工夫すること

ができる。例えば、凝集機序が、チオージスルフィド交換による、分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出されたならば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性液から凍結乾燥すること、水分含量を調節すること、および、特異的ポリマー基質組成物を開発することによって実現される場合がある。

使用

本発明の抗体は、例えば、試験管内（インビトロ）、体外（エクスビボ）、および体内（インビボ）治療法において使用してよい。

【０３０８】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性の上昇と関連する、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置または予防するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３０９】

一局面では、本発明は、腫瘍または癌の増殖を緩和、抑制、阻止、または予防するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１０】

一局面では、本発明は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１１】

一局面では、本発明は、血管形成を抑制するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１２】

一局面では、本発明は、血管形成に関連する病的状態を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。ある実施態様では、血管形成と関連する病的状態は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。ある実施態様では、病的状態は、眼内血管新生症である。

【０３１３】

さらに、本発明の抗体の少なくともあるものは、他の動物種由来の抗原に結合することが可能である。したがって、本発明の抗体は、例えば、抗原を含む細胞培養物において、ヒトの被験者において、または、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の動物種（例えば、チンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよびアカゲザル、ブタ、またはマウス）において特異的抗原活性に結合させるために使用することが可能である。一実施態様では、本発明の抗体は、抗原に抗体を、抗原活性が抑制されるように接触させることによって、抗原活性を抑制するために使用することが可能である。抗原は、ヒトのタンパク分子であることが好ましい。

【０３１４】

一実施態様では、本発明の抗体は、抗原発現および／または活性の上昇と関連する障害に罹患した被験体において抗原に結合させるための方法において使用することが可能である。該方法は、被験体に対し、本発明の抗体を、被験体の抗原に結合されるように投与することを含む。好ましくは、抗原は、ヒトのタンパク分子であり、被験体はヒトの被験者である。それとは別に、被験体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現する哺乳動物であることも可能である。さらにまた、被験体は、抗原が導入された（例えば、抗原の投与、または抗原トランスジーンの発現によって）哺乳動物であることも可能である。本発明の抗体は、獣医学的目的、または、ヒト疾患の動物モデルとして、該免疫グロブリンが交差反応する抗原を発現する、非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、またはマウス）に投与することが可能である。後者に関しては、そのような動物モデルは、本発明の抗体の治療効果（例えば、投与の用量および時間経過の試験）を評価するのに有用である場合がある。

【０３１５】
本発明の抗体は、一つ以上の抗原分子の発現および／または活性に関連する疾病、障害、または病態を処置、抑制、その進行を遅延させる、その再発を予防／遅延、緩和、または予防するために使用することが可能である。
【０３１６】
例示の障害としては、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられる。このような癌のさらに詳細な例としては、例えば、扁平上皮癌（例えば、表皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌を含む胃癌、すい臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、メラノーマ、多発性骨髄腫およびＢ細胞リンパ腫、脳および頭部および頸部癌、および関連する転移腫瘍が挙げられる。ある実施態様では、この癌は、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、および肝細胞癌から成る群から選ばれる。ある実施態様では、癌は、小細胞肺癌、結腸直腸癌、および乳癌で、これらの癌の転移形を含む癌から成る群から選ばれる。
【０３１７】
ある実施態様では、一つ以上の細胞傷害剤（単数または複数）に結合させた抗体を含む免疫複合体が患者に投与される。ある実施態様では、免疫複合体、および／または、その結合する抗原は、細胞によって内部に取り込まれ、そのため、免疫複合体の、その結合する標的細胞に対する殺作用において治療効果の上昇がもたらされる。一実施態様では、細胞傷害剤は、標的細胞中の核酸を標的とするか、または干渉する。一実施態様では、細胞傷害剤は、微小管重合を標的とするか、または干渉する。このような細胞傷害剤の例として、本明細書に注記される化学療法剤のいずれか（例えば、マイタンシノイド、アウリスタチン、ドルスタチン、またはカリケアミシン）、放射性同位元素、またはリボヌクレアーゼ、またはＤＮＡエンドヌクレアーゼが挙げられる。
【０３１８】
本発明の抗体は、治療において、単独で使用することも可能であるし、または、他の組成物と組み合わせて使用することも可能である。例えば、本発明の抗体は、別の抗体、化学療法剤（単数または複数）（複数の化学療法剤のカクテルを含む）、他の細胞傷害剤（単数または複数）、抗血管形成剤（単数または複数）、サイトカイン、および／または増殖阻害剤（単数または複数）と同時投与してもよい。本発明の抗体が、腫瘍増殖を抑制する場合、それを、やはり腫瘍増殖を抑制する、一つ以上の、他の化学療法剤（単数または複数）、例えば、ＶＥＧＦに対する抗体などの抗ＶＥＧＦ剤と組み合わせることは特に望ましいと考えられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、患者には、併用の放射線治療（例えば、外部からの放射線被爆、または、抗体などの放射性標識剤による治療）を与えてもよい。上記のような併用療法として、併用投与（二つ以上の薬剤が、同じ、または別々の処方に含まれる場合）、および個別投与が挙げられる。後者の場合、本発明の抗体の投与は、一つのまたは複数の補助治療剤の投与前、および／または投与後に行うことが可能である。
【０３１９】
併用療法
上述のように、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体が、別の治療剤と共に投与される併用療法を提供する。例えば、抗ＤＬＬ４抗体は、各種新生または非新生病態を処置するために、抗癌治療剤、または抗血管形成治療剤と組み合わせて使用される。一実施態様では、新生または非新生病態は、異常な、または有害な血管形成と関連する病的障害によって特徴づけられる。抗ＤＬＬ４抗体は、上記目的のために有効な別の薬剤と、同じ組成物において、または、別々の組成物において、連続的に、または併用的に投与することが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、ＤＬＬ４の複数の阻害剤を投与することも可能である。

【０３２０】
抗ＤＬＬ４抗体の投与は、同時に、例えば、単一組成物として、または、二つ以上の、別々の組成物として、同じまたは異なる投与ルートを用いて行うことが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、投与は、継時的に、任意の順序で行うことが可能である。ある実施態様では、二つ以上の組成物の投与の間には、数分から数日、数週から数ヶ月に亘る間隔が存在することが可能である。例えば、抗癌剤が先ず投与され、次いで、ＤＬＬ４阻害剤が投与されてもよい。しかしながら、同時投与、または、最初に抗ＤＬＬ４抗体を投与することも考慮の対象とされる。
【０３２１】
抗ＤＬＬ４抗体と組み合わせて投与される治療剤の有効量は、医師または獣医の裁量に委ねられる。用量投与および調整は、処置される病態について最大の管理を実現するように行われる。さらに、用量は、使用される治療剤の種類、および、処置される特定の患者などの要因に依存する。抗癌剤の適切な用量は、現在使用されるものであるが、抗癌剤および抗ＤＬＬ４抗体の併合作用（協働作用）にしたがって下げることも可能である。ある実施態様では、複数の阻害剤の併用は、単一阻害剤の効力を増強する。「増強する」という用語は、その一般的、または承認用量における治療剤効力の向上を指す。さらに、本明細書の「製薬組成物」という表題のついたセクションを参照されたい。
【０３２２】
通常、抗ＤＬＬ４抗体および抗癌剤は、同じまたは同様の病気に対して好適であって、腫瘍増殖、または癌細胞の増殖などの病的障害を阻止または緩和する。一実施態様では、抗癌剤は、抗血管形成剤である。
【０３２３】
癌と関連する抗血管形成治療は、腫瘍増殖を支える栄養素の補給に必要な腫瘍血管の発達の抑制を目標とした、癌処置戦略である。血管形成は、一次的腫瘍増殖および転移の両方に関与するのであるから、本発明によって提供される血管形成処置は、原発部位における腫瘍の新生増殖を抑制するばかりでなく、二次部位における腫瘍の転移をも阻止することが可能であり、したがって、他の治療剤による腫瘍の攻撃が可能とされる。
【０３２４】
多くの抗癌剤が特定され、当該分野で知られており、例えば、本明細書において列挙されるもの、例えば、「定義」において列挙されるもの、例えば、Ｃａｒｍｅｌｉｅｔ ａｎｄ Ｊａｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ ４０７：２４９－２５７（２０００）；Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ：Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，３：３９１－４００（２００４）；およびＳａｔｏ Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，８：２００－２０６（２００３）に列挙されるものが挙げられる。さらに、米国特許出願公開第２００３００５５００６号明細書を参照されたい。一実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、抗ＶＥＧＦ中和抗体（または断片）、および／または、別のＶＥＧＦ拮抗剤、ＶＥＧＦ受容体拮抗剤、例えば、ただしこれらに限定されないが、可溶性ＶＥＧＦ受容体（ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ニューロピリン（例えば、ＮＲＰ１、ＮＲＰ２））断片、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲを阻止することが可能なアプタマー、中和性抗ＶＥＧＦＲ抗体、ＶＥＧＦＲチロシンキナーゼの低分子量阻害剤（ＲＴＫ）、ＶＥＧＦに対するアンチセンス戦略、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦ受容体に対するリボザイム、ＶＥＧＦの拮抗変異種など；および、それらの任意の組み合わせと組み合わせて使用される。それとは別に、またはそれに加えてさらに、ＶＥＧＦ拮抗剤および他の薬剤の外に、二つ以上の血管形成阻害剤が、患者に対し任意に同時投与されてよい。ある実施態様では、さらに別の、一つ以上の治療剤、例えば、抗癌剤を、抗ＤＬＬ４抗体、ＶＥＧＦ拮抗剤、および抗血管形成剤と組み合わせて投与することが可能である。
【０３２５】
本発明のある局面では、抗ＤＬＬ４抗体との併用腫瘍治療に有用な、その他の治療剤としては、他の癌治療法（例えば、手術、放射線処置（例えば、放射性物質による被爆、または放射性物質の投与）、化学療法、本明細書に列挙され、当該分野で既知の抗癌剤によ

る処置、またはそれらの組み合わせ）が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、本明細書に開示される、同じ、または二つ以上の異なる抗原に結合する、二つ以上の抗体を、患者に同時投与することも可能である。場合によって、患者に対し一つ以上のサイトカインを投与することが有利であることがある。

【０３２６】

化学療法剤

ある局面では、本発明は、有効量の、ＤＬＬ４の拮抗剤および／または血管形成抑制剤（単数または複数）および一つ以上の化学療法剤を、癌に対して感受性を持つか、または癌と診断された患者に対し投与することによって、腫瘍増殖または癌細胞の増殖を阻止するか、または抑える方法を提供する。本発明の併用処置法では、種々の化学療法剤を用いてよい。考慮の対象とされる、例示の、非限定的化学療法剤が、本明細書の「定義」に掲載される。

【０３２７】

当業者には理解されるように、化学療法剤の適切な用量は、一般に、該化学療法剤が、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて投与される、臨床治療で既に用いられている用量にほぼ等しい。処置される病態に応じて、用量に変動が起こる可能性がある。処置を担当する医師は、個々の対象患者のために適切な用量を決定することが可能である。

【０３２８】

本発明はさらに、腫瘍増殖または癌細胞増殖の再発を抑制、または阻止するための方法および組成物を提供する。腫瘍増殖の再発、または癌細胞増殖の再発とは、患者は、１種以上の現在利用が可能な処置（例えば、癌治療、例えば、化学療法、放射線治療、手術、ホルモン療法、および／または生物学的療法／免疫療法、抗ＶＥＧＦ療法、特に、特定の癌に対する標準的治療処方）を現在受けているか、またはそれによって治療されるが、治療は、患者を治療するには臨床的には十分でないか、あるいは、患者は、その治療からもはや十分な治療作用を受容することがなく、さらに別の効果的治療を必要とする状態を記述するために使用される。本明細書で用いる場合、この語句はまた、「非反応性／難治性」患者の病態、例えば、治療には反応するが、副作用に苦しむ患者、耐性を発達させる患者、治療に反応しない患者、治療に十分反応しない患者を記述する状態を指すことも可能である。種々の実施態様において、癌は、癌細胞の数が顕著に減少しないか、増加するか、または、大きさ、または癌細胞数においてそれ以上の減少を見せることがなくなった、再発腫瘍増殖、または再発癌細胞増殖である。癌細胞が、再発腫瘍増殖か、または再発癌細胞増殖であるかを決める判断は、上記背景における「再発」または「難治」または「非反応性」に関する、当該分野において認知済みの意味に基づいて、癌細胞に対する処置効果を定量するための、当該分野で既知の任意の方法によってインビボ、またはインビトロで行うことが可能である。抗ＶＥＧＦ処置に対して耐性を持つ腫瘍は、再発腫瘍増殖の一例である。

【０３２９】

本発明は、対象における再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑制する方法であって、対象に再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑制する、一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を投与することによってそれを行う方法を提供する。ある実施態様では、癌治療に次いで拮抗剤を投与することが可能である。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、癌治療と同時に投与される。それとは別に、またはそれに加えてさらに、抗ＤＬＬ４抗体治療は、別の癌治療と交互に行われるが、この治療は、任意の順序で行うことが可能である。本発明はさらに、癌に罹りやすい患者において癌の発症または再発を防ぐために、一つ以上の抑制性抗体を投与する方法を包含する。一般に、対象は、以前に癌治療を受けたことがあるか、または同時に癌治療を受ける。一実施態様では、癌治療は、抗血管形成剤、例えば、ＶＥＧＦ拮抗剤による処置である。抗血管形成剤としては、当該分野で既知のもの、および本明細書の「定義」に見られるものが挙げられる。一実施態様では、抗血管形成剤は、抗ＶＥＧＦ中和性抗体、または断片（例えば、ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、またはＬ

ＵＣＥＮＴＩＳ（登録商標）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ））、Ｙ０３１７、Ｍ４、Ｇ６、Ｂ２０、２Ｃ３など）である。例えば、米国特許第６，５８２，９５９号明細書、同第６，８８４，８７９号明細書、同第６，７０３，０２０号明細書；国際公開第９８／４５３３２号パンフレット；国際公開第９６／３００４６号パンフレット；国際公開第９４／１０２０２号パンフレット；欧州特許第０６６８６８Ｂ１号明細書；米国特許出願公開第２００３０２０６８９９号明細書、同第２００３０１９０３１７号明細書、同第２００３０２０３４０９号明細書、および同第２００５０１１２１２６号明細書；Ｐｏｐｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８８：１４９－１６４（２００４）；および国際公開第２００５０１２３５９号パンフレットを参照されたい。再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑えるために、ＶＥＧＦ拮抗剤および抗ＤＬＬ４抗体と組み合わせて、さらに別の薬剤を投与することが可能である。本明細書の「併用療法」という表題のセクションを参照されたい。

【０３３０】

本発明の抗体（および補助治療剤）は、任意の適切な手段によって、例えば、非経口的、皮下、腹腔内、肺内、および鼻腔内など、および、局所処置が望みであるなら、病巣内、または硝子体内投与によって投与される。非経口的注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。さらに、抗体は、パルス状注入、特に、抗体用量を漸減させることによって好適に投与される。投与は、任意の適切なルートによって、例えば、注入によって、例えば、一部は、投与が一過性かまたは慢性であるかに応じて、静脈内または皮下注入によって行うことが可能である。

【０３３１】

本発明の抗体組成物は、医療実施基準と合致するやり方で処方、用量設定、および投与される。この背景において考慮される要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個別患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与法、投与スケジュール、および開業医には既知の、その他の要因が挙げられる。抗体は、対象とする障害の予防または処置のために現今使用される一つ以上の薬剤と共に任意に処方される。このような、その他の薬剤の有効量は、、処方中に存在する本発明の抗体の量、障害または処置の種類、および、上に述べたその他の要因に依存する。これらは、一般に同じ用量で、かつ、前述の投与ルートを通じて、これまでに使用された用量の約１から９９％として使用される。

【０３３２】

病気の予防または処置のためには、本発明の抗体の適切用量は（単独で使用される場合、または、化学療法剤などの他の薬剤と組み合わせて使用される場合）、処置される病気の種類、病気の重症度および経過、抗体が、予防目的または治療目的のために投与されるのか、以前の治療、患者の臨床歴および抗体に対する反応、および主治医の判断に依存する。抗体は、一時に、または一連の処置時点に亘って患者に適切に投与される。病気の種類および重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇから１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ）の抗体は、例えば、１回以上の個別投与であれ、または連続輸液であれ、患者に対する投与のための、初回候補用量である。一つの典型的な１日当たり用量は、前述の要因に応じて約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲に亘ると考えられる。数日以上に亘る反復投与の場合は、処置は、症状の望みの抑制が起こるまで持続される。抗体の、一つの例示の用量は、約０．０５ｍｇ／ｋｇから約１０ｍｇ／ｋｇの範囲にあると考えられる。したがって、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ、または１０ｍｇ／ｋｇ（または、それらの任意の組み合わせ）の、一つ以上の用量を患者に投与してよい。この用量は、断続的に、例えば、週に１回、または３週間に１回（例えば、患者が、約２回から約２０回、例えば、約６回の抗体投与を受け取るように）投与されてもよい。初回に比較的高い負荷用量、次いで、１回以上の比較的低用量を投与してもよい。例示の投与スケジュールは、約４ｍｇ／ｋｇの初回負荷用量、次いで、約２ｍｇ／ｋｇの抗体から成る週１回の維持投与を含む。しかしながら、他の投与スケジュ

ールが有用な場合もある。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって簡単に監視される。

【０３３３】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、特異的細胞または組織におけるＤＬＬ４発現を検出するアッセイ（例えば、診断または予後判定アッセイ）において有用である。その際、抗体は、下記のように標識され、不溶の基質に固定される。

【０３３４】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４を検出するための方法であって、サンプルにおいてＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。本明細書で用いる「検出」という用語は、コントロールを参照するか、または参照することのない、定性的および／または定量的（濃度の測定）検出を含む。

【０３３５】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４発現および／または活性に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有する、または有することが疑われる患者から得られた生物サンプルにおいてＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、ＤＬＬ４発現は、発現上昇、または異常（有害）な発現である。ある実施態様では、障害は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。

【０３３６】

別の局面では、本発明は、検出可能ラベルを含む、本明細書に記載される抗ＤＬＬ４抗体のいずれか一つを提供する。

【０３３７】

別の局面では、本発明は、本明細書に記載される抗ＤＬＬ４抗体のいずれかと、ＤＬＬ４との複合体を提供する。ある実施態様では、複合体は、インビボまたはインビトロに存在する。ある実施態様では、複合体は、癌細胞である。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、検出可能に標識される。

【０３３８】

いくつかの周知の検出アッセイ法のいずれか一法においてＤＬＬ４を検出するために、抗ＤＬＬ４抗体を使用することが可能である。例えば、ある生物サンプルについて、ＤＬＬ４をアッセイするのに、サンプルを所望の供給源から得ること、サンプルを抗ＤＬＬ４抗体と混ぜ合わせ、抗体に、混合物中に存在するＤＬＬ４と、抗体／ＤＬＬ４複合体を形成させること、および、混合物中に存在する抗体／ＤＬＬ４複合体を検出することによって行う。生物サンプルは、その特定のサンプルのために好適な、当該分野で既知の方法によってアッセイのために調製されてもよい。サンプルを抗体と混ぜ合わせる方法、および、抗体／ＤＬＬ４複合体を検出する方法は、使用されるアッセイの種類にしたがって選ばれる。そのようなアッセイとして、免疫組織化学、競合的およびサンドイッチアッセイ、および立体阻害アッセイが挙げられる。

【０３３９】

ＤＬＬ４の分析法は皆、下記の試薬の一つ以上を使用する：標識ＤＬＬ４類縁体、固定ＤＬＬ４類縁体、標的抗ＤＬＬ４抗体、固定抗ＤＬＬ４抗体、および立体複合体。標識試薬はまた、「トレーサー」とも呼ばれる。

【０３４０】

使用されるラベルは、ＤＬＬ４および抗ＤＬＬ４抗体の結合を妨げないものである限り、いずれの検出可能な官能基であってもよい。イムノアッセイにおける使用のために多くのラベルが知られるが、例えば、直接検出可能な成分、例えば、蛍光色素、化学発光、および放射性ラベルのほか、検出のために反応または誘導体形成しなければならない酵素などの成分が挙げられる。このようなラベルの例としては：

使用されるラベルは、ＤＬＬ４および抗ＤＬＬ４抗体の結合を妨げないものである限り、いずれの検出可能な官能基であってもよい。イムノアッセイにおける使用のために多くのラベルが知られるが、例えば、直接検出してもよい成分、例えば、蛍光色素、化学発光、および放射性ラベルの外、検出のために反応、または誘導体形成しなければならない酵

素などの成分が挙げられる。このようなラベルの例として、例えば、放射性同位元素、^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、および^{131}Ｉ、蛍光発色団、例えば、希土類キレート剤、または、フルオレセインおよびその誘導体、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、蛍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号明細書）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリフォスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロ環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ、およびキサンチンオキシダーゼ、これらを、過酸化水素を用いて、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の染料前駆体を酸化する酵素と結合させて使用し、ビオチン／アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定なフリーラジカルなどが挙げられる。

【０３４１】

これらのラベルをタンパクまたはポリペプチドに共有的に結合するためには、従来法が利用可能である。前述の蛍光、化学発光、および酵素ラベルによって抗体を標識するためには、例えば、結合剤、例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス－イミデート、ビス－ジアゾチゼドベンジジンなどを使用してよい。例えば、米国特許第３，９４０，４７５号明細書（蛍光定量法）、および同第３，６４５，０９０号明細書（酵素）；Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１４４：９４５（１９６２）；Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４－１０２１（１９７４）；Ｐａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，４０：２１９－２３０（１９８１）；Ｎｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７－４１２（１９８２）を参照されたい。本発明において好ましいラベルは、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびアルカリフォスファターゼである。酵素を含む、このようなラベルの、抗体に対する結合は、イムノアッセイ技術に熟練した当業者にとっては標準的操作手順である。例えば、Ｏ'Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ－ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ Ｕｓｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，”，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｅｄ．Ｊ．Ｊ．Ｌａｎｇｏｎｅ ａｎｄ Ｈ．Ｖａｎ Ｖｕｎａｋｉｓ，Ｖｏｌ．７３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８１），ｐｐ．１４７－１６６を参照されたい。

【０３４２】

ある種のアッセイ法にとっては試薬の固定が必要である。固定は、液中に遊離して存在するＤＬＬ４からの抗ＤＬＬ４抗体の分離をもたらす。これは、通常、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＬＬ４類縁体を、例えば、水に不溶の基質また表面に対し吸着させることによって（Ｂｅｎｎｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，米国特許第３，７２０，７６０号明細書）、または、共有結合によって（例えば、グルタルアルデヒド架橋結合を用いて）、または、後で、例えば、免疫沈降によって抗ＤＬＬ４抗体またはＤＬＬ４類縁体を不溶化することによって、実現される。

【０３４３】

サンプルにおけるタンパクの発現は、免疫組織化学および染色プロトコールによって調べてもよい。組織切片の免疫組織化学的染色は、サンプルにおけるタンパクの存在を評価または検出するための信頼性の高い方法であることが示されている。免疫組織化学（“ＩＨＣ”）技術は、一般的には、発色団または蛍光法によってインシトゥーにおいて細胞抗原を探り、可視化するために抗体を利用する。サンプル調製には、哺乳動物（通常は、ヒトの患者）から得られた組織または細胞サンプルを用いてよい。サンプルの例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、癌細胞、例えば、結腸、乳房、前立腺、卵巣、肺、胃、すい臓、リンパ腫、および白血病癌細胞が挙げられる。細胞は、当該分野で既知

の種々の手法によって、例えば、ただしこれらに限定されないが、手術による摘出、吸引、またはバイオプシーによって獲得することが可能である。組織は、新鮮なままでもよいし、凍結させてもよい。一実施態様では、サンプルは固定され、パラフィンなどに包埋される。組織サンプルは、通例法によって固定（すなわち、保存）されてもよい。当業者であれば、固定剤の選択は、そのサンプルが組織学的に染色されるか、または他のやり方で分析されるその目的によって決められることを理解するであろう。さらに、当業者であれば、固定の期間は、組織サンプルのサイズ、および使用される固定剤に依存することを理解するであろう。

【０３４４】

ＩＨＣは、さらに別の技術、例えば、形態学的染色および／または蛍光インシトゥハイブリダイゼーションと組み合わせて行ってもよい。ＩＨＣについては、二つの一般的方法：直接および間接アッセイが利用可能である。第１のアッセイによれば、標的抗原（例えば、ＤＬＬ４）に対する抗体の結合は直接定量される。この直接アッセイは、それ以上抗体相互作用を要することなく可視化することが可能な、標識試薬、例えば、蛍光タグ、または、酵素標識一次抗体を使用する。典型的な間接アッセイでは、未結合一次抗体が抗原に結合し、次に、標識二次抗体が、この一次抗体に結合する。二次抗体が酵素ラベルに結合される場合、発色性または蛍光性基質が加えられ、抗原の可視化を実現する。いくつかの二次抗体は、一次抗体上の異なるエピトープと反応するために信号増幅が起こる。

【０３４５】

免疫組織化学に使用される一次および／または二次抗体は、通常、検出可能な成分によって標識される。数多くのラベルの利用が可能であるが、それらは、一般に、下記の範疇に分類される：

前述の、サンプル調製手順を除外すると、ＩＨＣの前、最中、または後に組織切片についてさらに処理することが望ましい場合がある。例えば、エピトープ回収法では、例えば、クエン酸バッファー中で組織サンプルの加熱を実行してもよい（例えば、Ｌｅｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ａｐｐｌ．Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．４（３）：２０１（１９９６））。

【０３４６】

任意に実行してよいブロッキング工程の後、一次抗体が組織サンプル中の標的タンパク抗原に結合するように、十分な時間、好適な条件下に、組織切片を一次抗体に暴露する。これを実行するための適切な条件は、通例の実験によって決定することが可能である。サンプルに対する抗体の結合の程度は、前述の検出可能なラベルの内のいずれかを用いて定量される。ラベルは、３，３'－ジアミノベンジミド発色団などの発色性基質の化学的変化を触媒する、酵素ラベル（例えば、ＨＲＰＯ）であることが好ましい。酵素ラベルは、一次抗体に特異的に結合する抗体に結合される（例えば、一次抗体は、ウサギポリクローナル抗体で、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である）ことが好ましい。

【０３４７】

このようにして調製されるサンプルは、スライドマウントされ、ガラス被覆される。次に、例えば、顕微鏡を用いてスライド評価を判定するが、当該分野で通例として使用される染色強度基準を用いてもよい。染色強度基準は、下記のように評価してもよい。

【０３４８】

【表２】

染色パターン	スコア
細胞に染色が観察されない。	0
１０%より多い細胞に微かな／かろうじて認識可能な染色が検出される。	1+
１０%より多い細胞に弱から中等の染色が観察される。	2+
１０%より多い細胞に中等から強度の染色が観察される。	3+

通常、ＩＨＣアッセイにおいて染色パターンスコアが約２＋以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。ある実施態様では、染色パターンスコアが約１＋以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。別の実施態様では、染色パターンスコアが約３以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。腫瘍または結腸腺癌からの細胞および／または組織をＩＨＣを用いて調べる場合、染色は、一般に、腫瘍細胞および／または組織において（サンプル中に存在する可能性のある支質または周辺組織ではなく）定量または評価される。

【０３４９】

競合またはサンドイッチアッセイと呼ばれる他のアッセイ法も確立されており、診断産業界において広く使用されている。

【０３５０】

競合アッセイは、トレーサーＤＬＬ４類縁体が、少数の抗ＤＬＬ４抗体の抗原結合部位を求めて試験サンプルのＤＬＬ４と競合する能力に依存する。抗ＤＬＬ４抗体は、一般に、競合の前または後に不溶とされ、この抗ＤＬＬ４抗体に結合したトレーサーとＤＬＬ４が、未結合トレーサーおよびＤＬＬ４から分離される。この分離は、傾斜分離（結合パートナーを、事前に不溶とした場合）か、または、遠心（結合パートナーを、競合反応後に沈殿させた場合）によって行う。試験サンプルのＤＬＬ４の量は、マーカー物質の量で測定した結合トレーサーの量に逆比例する。既知量のＤＬＬ４による用量－反応曲線が準備され、試験結果と比較されて、試験サンプル中に存在するＤＬＬ４の量を定量的に決定する。これらのアッセイは、酵素が検出可能マーカーとして使用される場合、ＥＬＩＳＡシステムと呼ばれる。

【０３５１】

「均質」アッセイと呼ばれる、もう一種類の競合アッセイは、相分離を必要としない。このアッセイでは、酵素とＤＬＬ４の複合体が調製され、この複合体は、抗ＤＬＬ４抗体がこのＤＬＬ４に結合すると、抗ＤＬＬ４抗体の存在が、酵素活性を修飾するように使用される。この場合、ＤＬＬ４、または免疫学的に活性なその断片は、二官能性有機架橋によってペルオキシダーゼなどの酵素に結合される。複合体は、抗ＤＬＬ４抗体との使用において、抗ＤＬＬ４抗体の結合が、ラベルの酵素活性を抑制するか、または増強するように選ばれる。この方法自体は、ＥＭＩＴの名の下に広く行われている。

【０３５２】

均質アッセイのための立体障害法では立体複合体が使用される。これらの複合体は、低分子量ハプテンを、小型のＤＬＬ４断片に共有的に連結することによって合成されるが、その連結は、ハプテンに対する抗体が、抗ＤＬＬ４抗体と同時には複合体に事実上結合できないように行われる。このアッセイ手法では、試験サンプル中に存在するＤＬＬ４は、抗ＤＬＬ４抗体に結合し、そうすることによって抗ハプテンが複合体に結合することを可能とする。これは、複合体ハプテンの特徴に変化を、例えば、ハプテンが蛍光発色団の場合、蛍光に変化をもたらす。

【０３５３】

サンドイッチアッセイは、ＤＬＬ４、または抗ＤＬＬ４抗体の定量に特に有用である。継時的サンドイッチアッセイでは、試験サンプルのＤＬＬ４を吸着するために、抗ＤＬＬ４抗体が使用され、試験サンプルは、洗浄などで除去され、第２の、標識抗ＤＬＬ４抗体を吸着するために、結合ＤＬＬ４が使用され、次に、標識抗ＤＬＬ４抗体および結合物質が、残余のトレーサーから分離される。結合トレーサーの量は、試験サンプルのＤＬＬ４に直接比例する。「同時」サンドイッチアッセイでは、試験サンプルは、標識抗ＤＬＬ４を加える前に分離されない。一方の抗体として抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を、他方の抗体として抗ＤＬＬ４ポリクローナル抗体を用いる、継時的サンドイッチアッセイは、ＤＬＬ４に関してサンプルを試験するのに有用である。

【０３５４】

前記は、ＤＬＬ４のための、単に例示の検出アッセイであるにすぎない。ＤＬＬ４の定量のために抗ＤＬＬ４抗体を使用する、現在開発中の、また今後開発されるその他の方法も、本明細書に含まれるバイオアッセイを含め、本発明の範囲内に含まれる。

製造品

本発明のもう一つの局面では、前述の障害の処置、予防、および／または診断に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は、容器、および、該容器の上、またはそれと関連させて、ラベルまたは同封挿入体を含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、病態の処置、予防、および／または診断にそれ自体で有効であるか、または、別の組成物（単数または複数）と組み合わされると有効な組成物を保持するが、無菌のアクセスポート（例えば、容器は、静注液バッグであってもよいし、あるいは、皮下注射針によって貫通することが可能なストッパー付きバイアルであってもよい）を有し得る。組成物における少なくとも一つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベルまたは包装挿入体は、組成物が、癌などの選択病態を処置するために使用されることを示す。さらに、本製造品は、（ａ）その中に、本発明の抗体を含む組成物を有する第１容器；および、（ｂ）さらに別の治療剤を含む組成物をその中に擁する第２容器を含んでもよい。前記さらに別の治療剤は、例えば、化学療法剤、または、抗血管形成剤、例えば、抗ＶＥＧＦ抗体（例えば、ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）などを含んでもよい。本発明のこの実施態様における製造品は、さらに、第１および第２抗体組成物が、癌などの特定の病態を処置するために使用することが可能であることを示す包装挿入体を含んでもよい。それとは別に、またはそれに加えてさらに、製造品はさらに、薬理学的に受容可能なバッファー、例えば、注入用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸バッファー生理的食塩水、リンゲル液、およびデキストロース液を含む、第２（または第３）容器を含んでもよい。該製造品はさらに、商業的およびユーザーの観点から望ましい他の物質、例えば、他のバッファー、希釈液、フィルター、針、およびシリンジなどを含んでもよい。

【０３５５】

下記は、本発明の方法および組成物の実施例である。一般的記述が上に与えられたのであるから、外にも種々の実施態様が実施可能であることが理解されよう。

【実施例】

【０３５６】

実施例

実施例に言及される市販の試薬は、別様に指示しない限り、メーカーの指示にしたがって使用した。下記の実施例、および本明細書全体に亘って、ＡＴＣＣ（登録商標）アクセス番号によって特定される、細胞供給源は、米国基準菌株保存機関、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ２０１０８である。実施例に引用される参考文献は、例にしたがって列挙する。本明細書に引用される参考文献は全て、参照により本明細書に含む。

（実施例１）

材料および方法

本実施例では、下記の材料および方法を使用した。

【０３５７】

ＨＵＶＥＣフィブリンゲルビーズアッセイ。ＨＵＶＥＣフィブリンゲルビーズアッセイの詳細は、既に記載されている（Ｎａｋａｔｓｕ，Ｍ．Ｎ．　ｅｔ　ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ　６６，１０２－１２（２００３））。簡単に言うと、Ｃｙｔｏｄｅｘ（商標）３ビーズ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を、ビーズ当たり３５０－４００　ＨＵＶＥＣでコートした。約２００個のＨＵＶＥＣコート済みビーズを、１２－ウェル組織培養プレートの１ウェルにおいてフィブリンクロット中に埋設した。8×10^{4}ＳＦ細胞を、クロットの上にプレートした。アッセイは、７日目と９日目の間で停止し、免疫染色および画像撮影に備えた。ある実施態様では、ＨＵＶＥＣ新芽を、ビオチン抗ＣＤ３１（クローンＷＭ５９、ｃＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）およびストレプトアビジン－Ｃｙ３で染色することによって可視化した。ＨＵＶＥＣ核染色のために、フィブリンゲルを、２％パラフォルムアルデヒド（ＰＦＡ）中で一晩固定し、４′，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ、Ｓｉｇｍａ）で染色した。Ｋｉ６７染色のために、フィブリンゲルを、１０Ｘトリプシン－ＥＤＴＡで５分間処理し、最上層ＳＦを除去し、ＰＢＳに溶解した１０％ＦＢＳで中和し、４％ＰＦＡ中で一晩固定した。次に、フィブリンゲルを、ＰＢＳＴに溶解した１０％ヤギ血清、４時間でブロックし、ウサギ抗マウスＫｉ６７（直ちに使用が可能な調製品、クローンＳｐ６、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ）と一晩インキュベートし、次いで、抗ウサギＩｇＧ－Ｃｙ３（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）による二次検出を行った。一晩経過インキュベーションは全て４℃で行った。

【０３５８】

マウスの新生児網膜実験。同腹のＣＤ１マウス新生児に、Ｐ１およびＰ３において、ＰＢＳ、またはＹＷ２６．８２（１０ｍｇ／ｋｇ）をｉ．ｐ．注入した。眼球をＰ５に収集し、ＰＢＳに溶解した４％ＰＦＡで一晩固定した。摘出網膜を、ＰＢＳＴに溶解した１０％ヤギ血清で３時間ブロックし、次いで、一次抗体と一晩インキュベートした。一次カクテルは、ビオチニル化イソレクチンＢ４（２５μｇ／ｍｌ、Ｂａｎｄｅｉｒａｅａ　ｓｉｍｐｌｉｃｉｆｏｌｉａ；Ｓｉｇｍａ）、および、下記：ウサギ抗マウスＫｉ６７（１：１、即時使用可能調製品、クローンＳｐ６、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ）、または、マウスＣｙ３－結合抗アルファＳＭＡ（１：２０００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の内の一つを、ＰＢＬＥＣ（１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、０．１ｍＭ　$CaCl_2$、０．１ｍＭ　$MgCl_2$、０．１ｍＭ　$MnCl_2$、ＰＢＳ溶液として、ｐＨ６．８）に溶解した１０％血清と共に含む。次に、網膜をＰＢＳＴにて洗浄し、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ストレプトアビジン（１：２００；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）、およびＣｙ３－抗ウサギＩｇＧ（１：２００；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）から成る、二次抗体併用剤と一晩インキュベートした。染色完了後、網膜を、ＰＢＳに溶解した４％ＰＦＡにて染色後固定した。一晩経過インキュベーションは全て４℃で行った。平坦に登載した網膜の画像を、共焦点蛍光顕微鏡によって捕捉した。

【０３５９】

腫瘍モデル。８から１０週齢のベージュ色雌ヌードマウスを用いた。皮下腫瘍を得るため、マウスに、５０％マトリゲル（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を含む、０．１ｍｌ細胞懸濁液を、右後方横腹に注入した。5×10^{6}ヒト結腸癌ＨＭ７細胞、10×10^{6}結腸癌Ｃｏｌｏ２０５細胞、10×10^{6}ヒト肺癌Ｃａｌｕ６細胞、10×10^{6}ヒト肺癌ＭＶ－５２２細胞、10×10^{6}マウス白血病ＷＥＨＩ－３細胞、10×10^{6}マウスリンパ腫ＥＬ４細胞、10×10^{6}ヒト卵巣癌ＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１細胞、10×10^{6}マウス肺癌ＬＬ２細胞、10×10^{6}白血病／リンパ腫ＥＬ４細胞、または10×10^{6}非小細胞肺癌Ｈ１２２９細胞を、各マウスに注入した。ヒトメラノーマＭＤＡ－ＭＢ－４３５モデルについては、マウスの乳腺脂肪パッドに、５０％マトリゲルを含む、０．１ｍｌの細胞懸濁液（5×10^{6}）を注入した。抗ＤＬＬ４抗体ＹＷ２６．８２をｉ．ｐ．を通じて投与した（１０ｍｇ／ｋｇ体重、週２回）。下記の腫瘍モデルについては、各試験マウスの右横腹の皮下に、腫瘍断片（$1mm^3$）を移植した：非小細胞肺癌ＳＫＭＥＳ－１、ヒト乳癌ＭＸ－１、ヒト結腸直腸癌ＳＷ６２０、およびヒト腺癌ＬＳ１７４Ｔ。腫瘍成長

は、キャリパ測定によって定量した。腫瘍体積（mm^3）は、長さ（ｌ）および幅（ｗ）を測定し、体積（Ｖ＝ｌｗ２／２）を計算することによって決定した。各群には１０から１５匹の動物を含めた。処理群の統計学的比較は、スチューデントの両側ｔ－検定を用いて行った。

【０３６０】

腫瘍の血管標識および免疫組織化学。マウスを、イソフルランによって麻酔した。ＦＩＴＣ－標識Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍレクチン（１５０μｇを１５０μｌの０．９％ＮａＣｌに溶解；Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）をｉ．ｖ．注入し５分間循環させた後、全身還流を行った。血管系を、ＰＢＳに溶解した１％ＰＦＡによって３分間経心臓的に還流した。腫瘍を取り出し、同じ固定液に２時間浸して固定し、次いで、３０％スクロースに一晩インキュベートし、冷却保護に備え、次いで、ＯＣＴに包埋した。切片（４μｍ厚）を、抗マウスＣＤ３１（１：５０、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で染色し、次いで、Ａｌｅｘａ ５９４ヤギ抗ラットＩｇＧ（１：８００、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）で処理した。

【０３６１】

マウス小腸の組織学および免疫組織化学検査。フォルマリン固定およびパラフィン包埋マウス小腸組織を、３μｍ厚に薄切した。小腸の細胞タイプの組織化学的特定は、メーカー（ＰｏｌｙＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の推薦にしたがってアルシアンブルーによって実行した。抗Ｋｉ６７染色のために、切片をあらかじめＴａｒｇｅｔ Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ液（Ｓ１７００、ＤＡＫＯ）で処理し、ウサギ抗Ｋｉ６７（１：２００、クローンＳＰ６、Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ）と共にインキュベートした。ヤギ抗ウサギ二次抗体、７．５ｇ／ｍｌ（Ｖｅｃｔｏｒ ｌａｂｓ）は、Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ ＡＢＣ Ｅｌｉｔｅキット（Ｖｅｃｔｏｒ ｌａｂｓ）によって検出した。Ｋｉ６７染色切片は全て、Ｍａｙｅｒのヘマトキシリンによってカウンターステインした。ＨＥＳ－１染色のため、抗ラットＨＥＳ－１（クローンＮＭ１、ＭＢＬ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）、次いでＴＳＡ－ＨＲＰを用いた。

【０３６２】

ＲＮＡ干渉。ヒトＤＬＬ４を標的とする、ＳＭＡＲＴ ｐｏｏｌ小型干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）２本鎖、およびＳｉコントロール非標的ｓｉＲＮＡ＃２は、Ｄｈａｒｍａｃｏｎから購入した。ｓｉＲＮＲ２本鎖（５０ｎＭ）のトランスフェクションは、ＯｐｔｉＭＥＭ－１（登録商標）およびＬｉｐｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用い、４０％集密度のＨＵＶＥＣに対して行った。ＦＡＣＳ分析は、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間後に行った。４種の抗ＤＬＬ４ ＳＭＡＲＴ ｐｏｏｌ ｓｉＲＮＡの配列は下記の通りである：

【０３６３】

【化６】

CAACTGCCCTTATGGCTTTTT（配列番号６２）（オリゴ１、センス），

AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT（配列番号６３）（オリゴ１、アンチセンス），

CAACTGCCCTTCAATTTCATT（配列番号６４）（オリゴ２、センス），

TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT（配列番号６５）（オリゴ２、アンチセンス），

【０３６４】

【化７】

TGACCAAGATCTCAACTACTT（配列番号６６）（オリゴ３、センス），

GTAGTTGAGATCTTGGTCATT（配列番号６７）（オリゴ３、アンチセンス），

GGCCAACTATGCTTGTGAATT（配列番号６８）（オリゴ４、センス），

TTCACAAGCATAGTTGGCCTT（配列番号６９）（オリゴ４、アンチセンス）．

Ｎｏｔｃｈリガンド：Ｎｏｔｃｈ阻止ＥＬＩＳＡ。９６－ウェルマイクロタイタープレートを、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、０．５μｇ／ｍｌでコートした。このアッセイでは、ＤＬＬ４－ＡＰ（ＤＬＬ４のアミノ酸１－４０４を、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼに融合させたもの）を含む調整媒体を用いた。調整媒体を準備するために、ＤＬＬ４－ＡＰを発現するプラスミドをＦｕｇｅｎ６試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を用いて、２９３細胞に一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションの５日後、調整媒体を収集し、ろ過し、４℃で保存した。０．１５から２５μｇ／ｍｌの力価測定精製抗体を、コートされたｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃに対し、最大達成結合度の５０％結合を付与する希釈度において、ＤＬＬ４－ＡＰ調整媒体とあらかじめ室温で１時間インキュベートした。次に、この抗体／ＤＬＬ４－ＡＰ混合物を、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃコートプレートに加え、室温で１時間置き、その後、プレートを、ＰＢＳ中で数回洗浄した。結合ＤＬＬ４－ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。同じアッセイを、ＤＬＬ１－ＡＰ（ヒトＤＬＬ１、アミノ酸１－４４５）について行った。同様のアッセイを、精製ＤＬＬ４－Ｈｉｓ（Ｃ－末端Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４、アミノ酸１－４０４）、およびＪａｇ１－Ｈｉｓ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）についても行った。結合Ｈｉｓ－標識リガンドを、マウス抗Ｈｉｓ　ｍＡｂ（１μｇ／ｍｌ、Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、ビオチニル化ヤギ抗マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）、およびストレプトアビジン－ＡＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）によって検出した。

【０３６５】

ＲＮＡ抽出およびリアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲ。２－Ｄ培養におけるＨＵＶＥＣからの全ＲＮＡの抽出は、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）をメーカーの指示にしたがって用いて行った。フィブリンゲルにおいて増殖するＨＵＶＥＣから全ＲＮＡを抽出するため、フィブリンゲルを、１０Ｘトリプシン－ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ）で５分間処理し、最上層の線維芽細胞を除去し、次いで、ＰＢＳに溶解した１０％ＦＢＳで中和した。次に、ゲル塊を、組織培養ウェルから取り出し、微小試験管において遠心（１０Ｋ、５分）し、余分の液体を除去した。得られたゲル「ペレット」を、溶解バッファー（ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット）で溶解し、さらに、２－Ｄ培養におけるＨＵＶＥＣと同様に処理した。ＲＮＡの量を、ＲＮＡ６０００ナノチップ、およびＡｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて評価した。７５００　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲ反応を三回実行した。正規化のために、ヒトのＧＡＰＤＨを参照遺伝子として用いた。発現レベルは、３回の別々の定量値から、コントロールに対する、ｍＲＮＡ変化の平均（±ＳＥＭ）倍数として表した。ＶＥＧＦＲ２、ＴＧＦβ２、およびＧＡＰＤＨのための、順行および逆行プライマーおよびプローブ配列は、下記の通り。

【０３６６】

【化８】

TGFb2

順行： GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (配列番号 70)

逆行： CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (配列番号 71)

プローブ:AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (配列番号 72)

VEGFR2

順行： CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (配列番号 73)

逆行： TGC AGT CCG AGG TCC TTT (配列番号 74)

プローブ:CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (配列番号 75)

GAPDH

順行： GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (配列番号 76)

逆行： GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (配列番号 77)

プローブ:CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (配列番号 78)

（実施例２）

ファージ抗ＤＬＬ４抗体の生成

重鎖および軽鎖の相補性決定域（ＣＤＲ）内部に多様性を導入することによって、単一骨組構造（ヒト化抗ＥｒｂＢ２抗体、４Ｄ５）の上に、合成ファージ抗体ライブラリーを構築した（Ｌｅｅ，Ｃ．Ｖ．　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３４０，１０７３－９３（２００４）；Ｌｉａｎｇ，Ｗ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２８１，９５１－６１（２００６））。天然ライブラリーを用いたプレートパンニングを、ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）イムノプレート上に固定したＨｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）に対して行った。４ラウンドの濃縮後、クローンをランダムに取り出し、ファージＥＬＩＳＡを用いて特異的結合因子を特定した。得られたｈＤＬＬ４結合クローンを、Ｈｉｓ標識マウスＤＬＬ４タンパクでさらにスクリーニングして、種間交差クローンを特定した。各陽性ファージクローンについて、重鎖および軽鎖の可変領域を、完全長ＩｇＧ鎖を発現するように修飾されたｐＲＫ発現ベクターにサブクローンした。重鎖および軽鎖構築物を、２９３またはＣＨＯ細胞に同時にトランスフェクションし、その発現抗体を、プロテインＡアフィニティーカラムを用いて血清無添加培地から精製した。精製抗体を、ＤＬＬ４とラットのＮｏｔｃｈ１－Ｆｃの間の相互作用を阻止するかどうかについてＥＬＩＳＡで調べ、完全長ヒトＤＬＬ４、またはマウスＤＬＬ４を発現する安定な細胞系統に対する結合について、ＦＡＣＳによって調べた。アフィニティー熟成については、最初の対象クローンから得られたＣＤＲループ（ＣＤＲ－Ｌ３、－Ｈ１、および－Ｈ２）の、三つの異なる組み合わせを有するファージライブラリーを、ソフトランダム化戦略によって、各選択位置が、約５０：５０の頻度で、非野生型残基に突然変異するか、または野生型として維持されるように構築した（Ｌｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００６，上記）。次に、ヒトおよびマウスのＨｉｓ標識ＤＬＬ４タンパクに対し、厳密性を次第に上昇させながら、４ラウンドの溶液相パンニングを行って高親和性クローンを特定した。

（実施例３）

抗ＤＬＬ４抗体の特徴

抗ＤＬＬ４　Ｍａｂの結合親和性を決めるために、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００による表面プラズモン共鳴（ＳＲＰ）計測を用いた（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）。簡単に言うと、供給業者の指示にしたがって、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）によって活性化した。抗ＤＬＬ４抗体を、１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ４．８によって５μｇ／ｍｌに希釈し、次いで、５μｌ／分の流速

で注入して約５００反応単位（ＲＵ）の結合抗体を実現した。次に、未反応基をブロックするために１Ｍエタノールアミンを注入した。速度論的測定のために、ヒトまたはマウスのＤＬＬ４－Ｈｉｓ分子の、連続２倍希釈液（０．７ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳにおいて、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（商標）２０と共に、２５℃で、２５μｌ／分の流速で注入した。会合速度（ｋｏｎ）および解離速度（ｋｏｆｆ）は、単純な１対１ Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計算した。平衡解離定数（Ｋｄ）は、ｋｏｆｆ／ｋｏｎとして計算した。この実験結果を表３に示す。抗体ＹＷ２６．８１は、ヒトおよびマウスＤＬＬ４に対して近似のＫｄ値を示し（Ｋｄ値は、それぞれ、０．１ｎＭ５および０．０９ｎＭ）、そのマウスモデルにおける評価を可能にした。

【０３６７】

表３：ヒトおよびマウスＤＬＬ４に対する抗ＤＬＬ４抗体の結合親和性および反応速度変化。“ＮＡ”は、測定が行われなかったことを示す。

【０３６８】

【表３】

クローン	マウスデルタ４ (ECD5.5)			ヒトデルタ４ (ECD5.5)		
	kon/10^5	koff10^{-4}	Kd(nM)	kon/10^5	koff/10^{-4}	Kd(nM)
YW26	0.57	16	28	0.3	7.4	25
YW26.6	4.1	0.61	0.15	2	0.49	0.25
YW26.14	3.3	0.73	0.22	1.8	0.66	0.37
YW26.20	3.3	1	0.3	1.7	0.79	0.46
YW26.34	3.6	0.65	0.18	1.9	0.67	0.35
YW26.82	5.4	0.46	0.09	2.4	0.37	0.15

（実施例４）

抗ＤＬＬ４抗体のさらに詳細な特徴

抗ＤＬＬ４Ｍａｂ ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング：抗ＤＬＬ４Ｍａｂ２６．８２は、ヒトＤＬＬ４細胞外ドメイン（ＥＣＤ）の、ＥＧＦ様反復列番号２（ＥＧＬ２）中に存在する結合決定基を認識する。ＥＧＬ２は、ヒトＤＬＬ４ ＥＣＤのアミノ酸２５２－２８２を含む。簡単に言うと、ＤＬＬ４ ＥＣＤ突然変異は、アルカリフォスファターゼ融合タンパクとして発現され、抗体に結合する状態で評価される。図１１ａは、Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異の模式図を示す。括弧は、融合タンパク内に含まれるＤＬＬ４配列を示す。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４ Ｍａｂ（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ ４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。Ｍａｂ ＹＷ２６．８２は、ＤＬＬ４ ＥＧＬ２ドメインを含む構築物には結合したが、ＤＬＬ４ ＥＧＬ２ドメインを欠く構築物には結合しなかった。このことは、抗ＤＬＬ４ Ｍａｂ ＹＷ２６．８２は、ヒトＤＬＬ４ ＥＣＤのＥＧＬ２ドメイン中のエピトープを認識することを明らかにした。

【０３６９】

Ｍａｂ ＹＷ２６．８２は、マウスおよびヒトのＤＬＬ４に対し選択的に結合する。９６－ウェルのＮｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐプレートを、表示（１μｇ／ｍｌ）の精製組み換えタンパクでコートした。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ ４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒ

ｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（図１１ｂ）。この実験の結果を図１１ｂに示す。Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ヒトおよびマウスのＤＬＬ４には結合したが、ヒトのＤＬＬ１およびヒトのＪＡＧ１には検出可能となるほどには結合しなかった。これらの結果は、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２が、ＤＬＬ４に選択的に結合することを示す。

【０３７０】

さらに、ベクター、完全長ＤＬＬ４、Ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析も、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２がＤＬＬ４に選択的に結合することを示した。図１１ｃに示すように、ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。著明な結合は、ＤＬＬ１またはＪａｇ１トランスフェクション細胞には検出されなかった。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた。

【０３７１】

競合実験は、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２が、ＮｏｔｃｈとＤＬＬ４との相互作用を効果的に、かつ選択的に阻止するが、他のＮｏｔｃｈリガンドに対してはそうしないことを示した。図１１ｄに示すように、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）。

【０３７２】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）において内因的に発現されたＤＬＬ４に対する、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４特異的ｓｉＲＮＡでトランスフェクションしたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ解析。２μｇ／ｍｌのＹＷ２６．８２を用い、その後、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００，Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｅＲｅｓｅａｒｃｈ）で処理した。この実験の結果を図１１ｅに示す。結合は、トランスフェクションされないＨＵＶＥＣ（コントロール）および、コントロールｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣに観察された。対照的に、ＤＬＬ４　ｓｉＲＮＡでトランスフェクションされたＨＵＶＥＣでは、結合が著明に低下した。これらの実験は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ＨＵＶＥＣにおいて内因的に発現されたＤＬＬ４に特異的に結合することを示す。

（実施例５）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビトロにおいて内皮細胞の増殖を増した

同時培養されるヒトの皮膚芽（ＳＦ）細胞の存在下に、フィブリンゲルにおいて増殖するヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）は、明瞭な腔様構造を持つ新芽を生成する（Ｎａｋａｔｓｕ，Ｍ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ　６６，１０２－１２（２００３））。抗ＤＤＬ４抗体ＹＷ２６．８２の添加は、新芽の長さおよび数を著明に増した（図７ａ）。タンパク複合体のγ－セクレターゼ活性によって触媒される、Ｎｏｔｃｈのタンパク分解処理は、Ｎｏｔｃｈ活性化時の必須の工程である（Ｂａｒｏｎ，Ｍ．Ｓｅｍｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　１４，１１３－９（２００３））。興味深いことに、γ－セクレターゼ阻害剤ジベンザゼピン（ＤＢＺ）（ｖａｎ　Ｅｓ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９５９－６３（２００５）；Ｍｉｌａｎｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ　Ｓｃｉ　８２，３４１－５８（２００４））は、ＨＵＶＥＣの発芽に対し同じ作用を及ぼした。これらの二つの処理の機序ははっきりと異なるのであるから、発芽増強は、明らかにＮｏｔｃｈシグナル伝達が原因である。Ｋｉ６７染色は、ＥＣ発芽の増強は、細胞増殖の上昇によることを明らかにした（図７ｂ）。元のフィブリンア

ッセイでは、ＨＵＶＥＣ発芽、および、それに続く腔形成は、同時培養されたＳＦ細胞によって支持された。ＳＦ細胞を、調整した培地で置換しても、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂおよびデルタ-1のいずれも、ＨＵＶＥＣ発芽を依然として強化することが可能であった（図１ｃ）。これは、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達におけるＥＣの自律的役割を支持する。逆の実験において、固定ＤＬＬ４タンパクによってＮｏｔｃｈを活性化すると、著明な増殖抑制がもたらされた（図７ｅ）。これらの所見は、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の活性化状態は、ＥＣ増殖と密接な関連のあることを示唆する。

（実施例６）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビボにおいて内皮細胞増殖を増した

生後間もないマウスの網膜は、明瞭に定められる一連の事象としてステレオタイプな血管パターンを発達させる（Ｓｔｏｎｅ，　Ｊ．＆　Ｄｒｅｈｅｒ，Ｚ．Ｊ　Ｃｏｍｐ　Ｎｅｕｒｏｌ　２５５，３５－４９（１９８７）；Ｇｅｒｈａｒｄｔ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　１６１，１１６３－７７（２００３）；Ｆｒｕｔｔｉｇｅｒ，Ｍ．Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ　４３，５２２－７（２００２））。新生児網膜の増殖ＥＣにおけるＤＬＬ４の、顕著で、ダイナミックな発現は、網膜の血管発達の制御におけるＤＬＬ４の可能な役割を示唆する（Ｃｌａｘｔｏｎ，Ｓ．＆　Ｆｒｕｔｔｉｇｅｒ，Ｍ．Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒ　Ｐａｔｔｅｒｎｓ　５，１２３－７（２００４））。ＹＷ２６．８２の全身輸送によって、網膜血管に深刻な変化が引き起こされた。網膜にＥＣの大量の蓄積が起こり、原始的な血管形態を持つシート様構造が生成された（図７ｄ）。ＥＣにおけるＫｉ６７標識の著明な増加が観察された。これは、ＥＣ増殖の上昇を示す（図７ｈ）。したがって、マウス新生児においてＤＬＬ４遮断によって網膜ＥＣがこのように過剰増殖表現型を取ることは、インビトロ所見を確実なものとする。

（実施例７）

上皮細胞増殖の制御におけるＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈの必須の役割

ＶＥＧＦは、ＥＣの、いくつかの基本的面を調節する（Ｆｅｒｒａｒａ，Ｎ．Ｅｘｓ、２０９－３１（２００５）；Ｃｏｕｌｔａｓ，Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３８，９３７－４５（２００５））。しかしながら、ＶＥＧＦシグナル伝達が、どのようにして複雑な血管形成過程、例えば、動静脈（ＡＶ）分化および階層的血管組織、明らかに、別の高度に統制されたシグナル伝達経路を必要とする事象たちに組み込まれるかは、比較的理解されていない。ゼブラフィッシュにおける遺伝学的実験から、ＶＥＧＦは、動脈内皮の分化の際、Ｎｏｔｃｈ経路の上流で活動することが示唆されている（Ｌａｗｓｏｎ，Ｎ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２８，３６７５－８３（２００１））。我々は、ＶＥＧＦの、ＨＵＶＥＣ刺激は、ＤＬＬ４の表面発現の増加をもたらす（データ示さず）ことを見出した。これは、ＶＥＧＦ刺激によってＤＬＬ４　ｍＲＮＡが上方調整されることを報ずる最近の報告と一致する（Ｐａｔｅｌ，Ｎ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６５，８６９０－７（２００５））。興味深いことに、ＤＬＬ４それ自体は、Ｎｏｔｃｈ活性化後上方調整された（図１２）。これは、ＤＬＬ４が、それによってＶＥＧＦシグナル伝達をＮｏｔｃｈ経路に効果的に中継するポジティブフィードバック機構のあることを示唆する。簡単に言うと、ＤＢＺ（０．０８μＭ）の非存在下、または存在下に、Ｃ－末端固定Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）によって、ＨＵＶＥＣを刺激した。刺激３６時間後、内因性ＤＬＬ４発現を、抗ＤＬＬ４抗体によるＦＡＣＳ分析によって調べた。

【０３７３】

注目すべきことに、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を阻止することによって得られる、ＥＣの過剰増殖は、依然としてＶＥＧＦ依存性であった。３－Ｄフィブリンゲル培養において、ＶＥＧＦ　Ｍａｂによる処理は、ＤＢＺの存在下、非存在下のいずれにおいても、ＥＣ発芽の大部分を中絶した（図７ｆ）。これは、過剰増殖行動の一部は、ＶＥＧＦシグナル伝達の強化によるとする可能性を示唆する。実際、ＮｏｔｃｈをＹＷ２６．８２またはＤＢＺによって遮断すると、ＶＥＧＦＲ２の上方調整がもたらされる（図７ｇ）。したがって、ＶＥＧＦは、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ経路の上流で作用するが、一方、ＤＬＬ４／Ｎｏｔ

ｃｈは、ＶＥＧＦＲ２発現をネガティブに調整することによってその反応を微調整することが可能である。

（実施例８）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、内皮細胞分化を阻止し、動脈の発達を阻止した

ＥＣ増殖の上昇の外に、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈへの拮抗作用は、フィブリンゲルにおいてＥＣ新芽の急激な形態的変化をもたらした。多細胞の腔様構造の多くが消失した（図８ａ）。これは、欠陥性のＥＣ分化を示唆する。Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２処理網膜では、放射状に交互に分枝する動脈および静脈の特徴的パターンが大きく破壊された。網膜動脈と関連する、抗α平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）染色は完全に消失した（図８ｃ）。この所見は、ＤＬＬ４＋／－胚における、動脈の欠陥性発達と驚くほど近似していた。これらの所見は、異なる角度からではあるが、ＥＣ分化制御におけるＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈの必須の役割に照明を当てる。

（実施例９）

ＴＦＧβ発現は、Ｎｏｔｃｈの活性化状態とリンクされる

Ｎｏｔｃｈ経路同様、ＴＧＦβシグナル伝達も、状況依存性であり、細胞の分化、増殖、および成長抑制に対し、多様な、しばしば反対の作用を及ぼす。さらに、ＴＧＦβ経路は、従来から、血管過程への関与が示されている（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００）；Ｏｓｈｉｍａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　１７９，２９７－３０２（１９９６）；Ｌａｒｓｓｏｎ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｅｍｂｏ　Ｊ　２０，１６６３－７３（２００１））。例えば、アクチビン受容体様キナーゼ１（ＡＬＫ１）、ＥＣ特異的Ｉ型ＴＧＦβ受容体の欠乏によって、卵黄嚢における原始的ＥＣネットワーク、および動静脈の機能不全（ＡＶＭ）がもたらされるが、これは、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達欠損を有するマウスによって共有される表現型である（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００）；Ｉｓｏ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｖａｓｃ　Ｂｉｏｌ　２３，５４３－５３（２００３））。これがきっかけとなって、我々は、これら二つの経路の間の、可能な接続の研究に導かれた。我々は、ＴＦＧβ２の発現が、Ｎｏｔｃｈの活性化状態と緊密にリンクすることを見出した（図８ｂ）。これは、ＴＧＦβ経路は、Ｎｏｔｃｈ経路の下流で活動する可能性のあることを示唆する。以上まとめると、我々の所見は、「シグナル伝達ルーター」として活動するＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ軸が、ＤＬＬ４発現を制御することによってＶＥＧＦシグナル伝達を組み込み、ＴＧＦβ経路と連結してＥＣ分化を増強するとするモデルを支持する。

（実施例１０）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビボにおいて腫瘍増殖を抑制した

腫瘍の血管形成時の、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の可能な役割に直接取り組むために、我々は、前臨床腫瘍モデルにおいて、ＤＬＬ４遮断の腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた（図９ａ－ｄ）。ＨＭ７、Ｃｏｌｏ２０５、およびＣａｌｕ６異種移植腫瘍モデルにおいて（図９ａ－ｃ）、ＹＷ２６．８２処理は、腫瘍定着（腫瘍サイズが≧２５０ｍｍ^3）後に開始した。３種のモデル全てにおいて、コントロールと処理群の間の増殖速度における解離が、投与の３日後には明白となった。処理群の腫瘍体積は、２週間の処理に亘って静止したままであった。皮下の腫瘍ばかりでなく、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、マウスの乳腺脂肪パッドにおいて増殖する腫瘍も抑制した。ＭＤＡ－ＭＢ－４３５腫瘍モデルでは、処理は、腫瘍細胞注入の１４日後に開始した。コントロールと処理群の間の腫瘍増殖曲線の差は、投与後６日以内に明白となり、処理が続くにつれて次第に顕著になった（図９ｄ）。

【０３７４】

我々はさらに、前臨床腫瘍モデルにおいて、ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦ遮断の、種々の腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた（図９ｅ－ｆ；ｉ－ｐ）。ＭＶ－５２２およびＷＥＨＩ３異種移植腫瘍モデルでは、ＹＷ２６．８２処理および／または抗ＶＥＧＦ処理を、腫瘍定着後に開始した（腫瘍サイズが≧２５０ｍｍ^3）。ＭＶ－５２２モデルでは、ＹＷ

２６．８２および抗ＶＥＧＦ処理のいずれも、それぞれ腫瘍増殖を抑制したが、二つの処理の組み合わせがもっとも効果的であった。ＷＥＨＩ３モデルでは、抗ＶＥＧＦ処理は、腫瘍増殖にまったく作用を示さなかったが、一方、ＹＷ２６．８２は、腫瘍増殖の有意な抑制を示した。ＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１、ＬＬ２、ＥＬ４、Ｈ１２９９、ＳＫＭＥＳ－１、ＭＸ－１、ＳＷ６２０、およびＬＳ１７４Ｔモデルでは、ＹＷ２６．８２処理（５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ、週２回）、および／または抗ＶＥＧＦ処理（５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ、週２回）を、腫瘍定着後に行った。これらのモデルそれぞれにおいて、ＹＷ２６．８２処理は、単独で、腫瘍増殖を抑制した。さらに、併用処理を試験した、これらのモデル全てにおいて、ＹＷ２６．８２は、抗ＶＥＧＦと組み合わされると効力の増強を示した。

（実施例１１）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、腫瘍内皮細胞の増殖を増した

腫瘍増殖抑制に鑑み、我々は、血管組織学実験のために、ＥＬ４マウスリンパ腫腫瘍モデルを用いた。我々は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理が、内皮細胞密度において目覚しい増加をもたらすことを見出した（図９ｇ）。逆に、抗ＶＥＧＦは、正反対の作用を及ぼした（図９ｇ）。ただし、両処理は、このモデルにおいて同様の効力を示した。

（実施例１２）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、腫瘍血管の還流を阻害した

ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ経路のインビトロにおける遮断は、ＥＣによる腔様構造の形成を阻害するので（図８ａ）、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂによる処理が、腫瘍血管において同様の作用をもたらし、効率的血流に影響を及ぼすかを調べた。Ｍａｂ処置により腫瘍血管のレクチン標識の著しい減少が生じることが、ＦＩＴＣ－レクチンを用いた全身灌流により示された（図９ｈ）。注目すべきことに、ＡＬＫ－１欠損マウスにおける動静脈機能不全が、異常な血液循環を引き起こすことが示された（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００））。胚網膜、および早期新生児網膜のいずれにおいても、ＡＶ分化においてＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達が決定的役割を担っているとすれば、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、腫瘍ＥＣの細胞の運命を決する特殊化に影響を及ぼし、方向性に欠陥を持つ血流を引き起こすことが可能と考えられる。実際、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理Ｃｏｌｏ２０５腫瘍では、ＥＣの高密度が、生存可能な腫瘍細胞の低含量と相関する領域があった。これは、低劣な血管機能を意味する。この血管の欠陥に関して理解を深めるには、血管画像技術を利用した今後の実験が必要とされる。

（実施例１３）

マウス小腸のホメオスタシスにおいてＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である

Ｎｏｔｃｈの包括的阻害に関する大きな不安は、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達が、生後の自己更新システムのホメオスタシスの制御において広範な役割を担っているのであるから、Ｎｏｔｃｈの阻害は有害である可能性のあることである。例えば、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、小腸における、未分化の、腺窩前駆細胞の維持に必要とされる（ｖａｎ　Ｅｓ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９５９－６３（２００５）；Ｆｒｅ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９６４－８（２００５））。実際、全てのＮｏｔｃｈ活性を無差別に阻止すると考えられるγ－セクレターゼ阻害剤は、腺窩区画内部における杯細胞の大量増加のためにげっ歯類では有害な副作用をもたらす（Ｍｉｌａｎｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ　Ｓｃｉ　８２，３４１－５８（２００４）；Ｗｏｎｇ，Ｇ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７９，１２８７６－８２（２００４））。我々は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂで処理したマウスの小腸を、免疫組織化学的分析によって調べた。ＤＢＺ処理とは対照的に、６週間の処理後、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理群と、コントロール群の間には、上皮性腺窩細胞の分化、または増殖プロフィールにおいて差は特定されなかった（図１０）。さらに、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、急激に分裂する転移増幅（ＴＡ）集団において、Ｎｏｔｃｈ標的遺伝子ＨＥＳ－１の発現を変えなかった（図１０）。これらの結果は、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、大部分、血管系に限局されるとする考えを支持する。

（実施例１４）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、成体の網膜の血管には影響しない

ＤＬＬ４の阻止は、新生マウスにおける網膜血管の発達に対しては深刻な影響を及ぼすが、抗ＤＤＬ４抗体の投与は、成体の網膜血管に対し目に見える影響を与えない（図８ｄ）。したがって、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、活発な血管形成中には決定的重要性を有するが、正常な血管維持における役割の重要性はより低い。この予想に一致して、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理の進行時、１０ｍｇ／ｋｇを週に２回最大８週間投与した場合、腫瘍負荷マウスにおいて、外見上体重減少または死亡例は観察されなかった。腫瘍モデルでは、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂと抗ＶＥＧＦは、腫瘍血管に対し正反対の作用を示す。これは、活動機序の非重複性を示唆する。

【０３７５】

前記において、本発明が、例示に基づき、理解の明確性のためにやや詳細に説明されたわけであるが、これらの記述および実施例が、本発明の範囲限定するものと考えてはならない。

【図１Ａ】

クローン番号	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
152.26	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.6	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.14	G	F	S	F	R	D	N	W	I	S
152.26.20	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.34	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.40	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.82	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S

クローン番号	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
152.26	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.6	G	L	I	N	P	Q	S	G	S	S	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.14	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.20	G	V	I	N	P	N	S	G	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.34	G	L	I	N	P	T	S	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.40	G	V	I	N	S	I	S	G	A	T	A	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.82	G	Y	I	S	P	N	S	G	F	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

クローン番号	H3														
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	M	101	102
152.26	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.6	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.14	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.20	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.34	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.40	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y
152.26.82	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y

クローン番号	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
152.26	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.14	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.20	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.34	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.40	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.82	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

FIG. 1a

【図１Ｂ】

クローン番号	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
152.26	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.6	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.14	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.20	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.34	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.40	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.82	S	A	S	F	L	Y	S

クローン番号	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
152.26	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
152.26.6	Q	Q	S	Y	T	G	Q	S	T
152.26.14	Q	Q	S	V	N	G	P	A	T
152.26.20	Q	Q	S	Y	N	G	P	S	T
152.26.34	Q	Q	S	Y	T	G	P	S	T
152.26.40	Q	Q	W	F	S	T	A	P	T
152.26.82	Q	Q	S	Y	T	G	T	V	T

FIG. 1b

【図２Ａ】

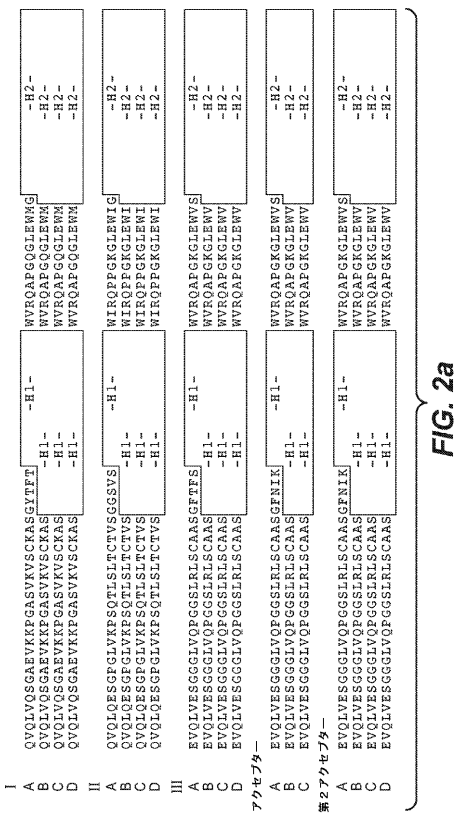


FIG. 2a

【図２Ｂ】

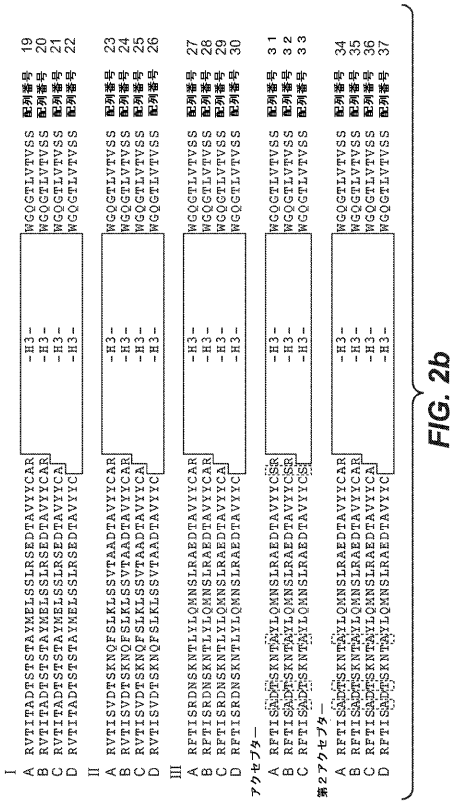


FIG. 2b

【図３】

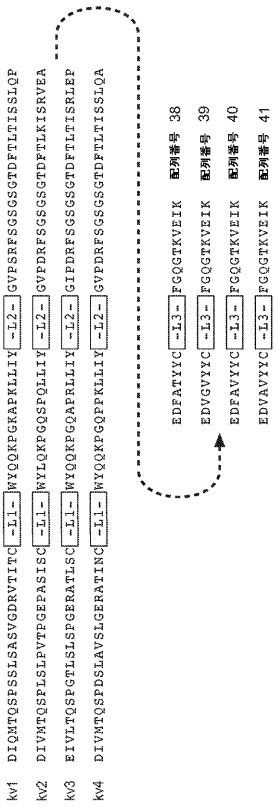


FIG. 3

【図４】

ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８軽鎖の枠組み構造配列

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} （ **配列番号** 42）

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} （ **配列番号** 43）

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} （ **配列番号** 44）

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} （ **配列番号** 45）

ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８重鎖の枠組み構造配列

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} （ **配列番号** 46）

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} （ **配列番号** 47）

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn^{83} Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} （ **配列番号** 48）

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} （**配列番号** 49）

FIG. 4

【図５】

位置６６（下線部）において修飾された、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８軽鎖の枠組み構造配列

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} （ **配列番号** 42）

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} （ **配列番号** 43）

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} （ **配列番号** 50）

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} （ **配列番号** 45）

位置７１、７３、および７８（下線部）において修飾された、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８重鎖の枠組み構造配列

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} （ **配列番号** 46）

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} （ **配列番号** 47）

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn83 Ser83a Leu83b Arg83c Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} （ **配列番号** 51）

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} （**配列番号** 49）

FIG. 5

【図６】

クローン 26.20

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGATEYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (配列番号 54)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYNGPSTFGQGTKVEIKR (配列番号 55)

クローン 26.14

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFRDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGSTDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (配列番号 56)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVNGPATFGQGTKVEIKR (配列番号 57)

クローン 26.82

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (配列番号 58)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (配列番号 59)

FIG. 6

【図７Ａ】

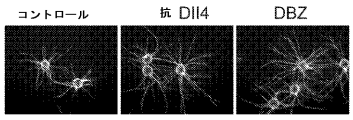


FIG. 7a

【図７Ｂ】

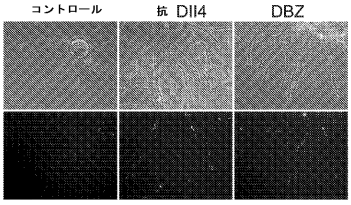


FIG. 7b

【図７Ｃ】

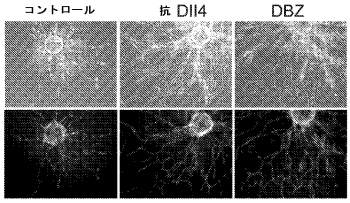


FIG. 7c

【図７Ｄ】

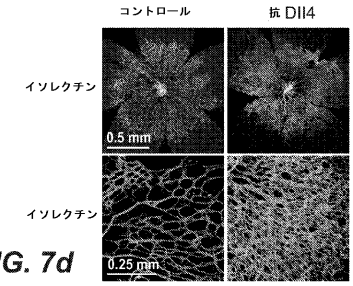


FIG. 7d

【図７Ｅ】

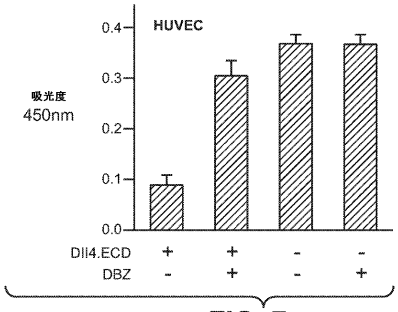


FIG. 7e

【図７Ｆ】

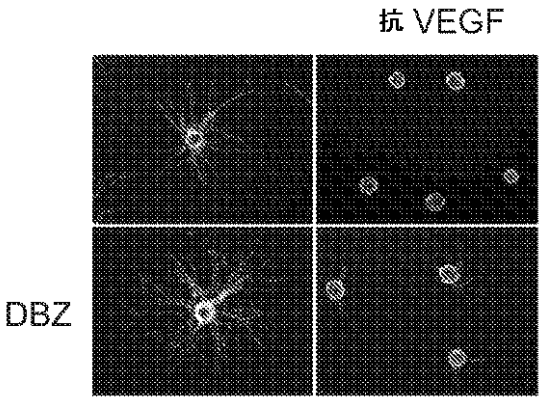


FIG. 7f

【図７Ｇ】

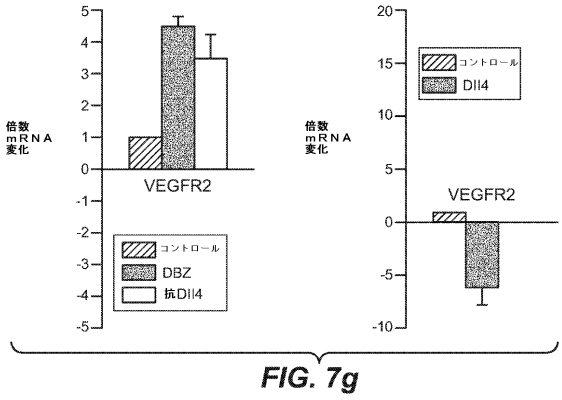


FIG. 7g

【図７Ｈ】

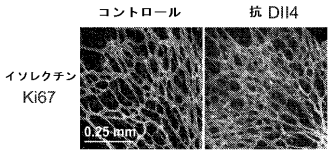


FIG. 7h

【図８Ａ】

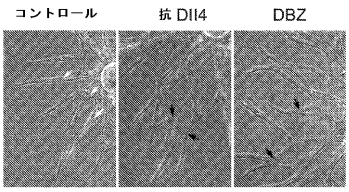


FIG. 8a

【図８Ｂ】

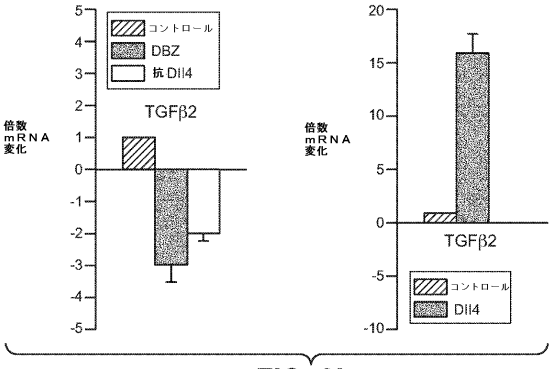


FIG. 8b

【図８Ｃ】

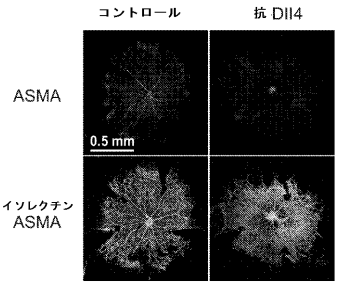


FIG. 8c

【図８Ｄ】

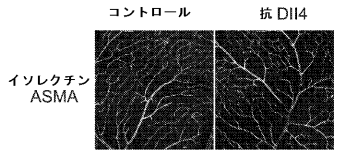


FIG. 8d

【図９Ａ】

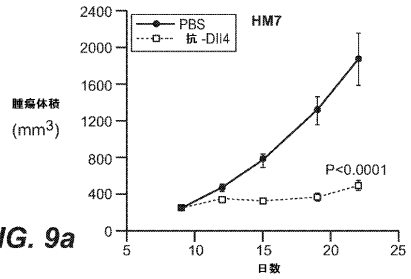


FIG. 9a

【図９Ｂ】

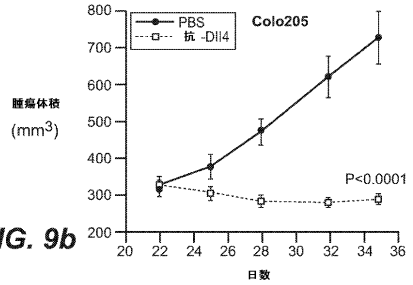


FIG. 9b

【図９Ｃ】

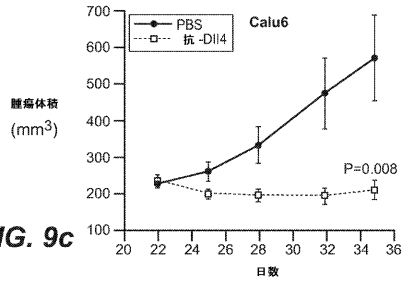


FIG. 9c

【図９Ｄ】

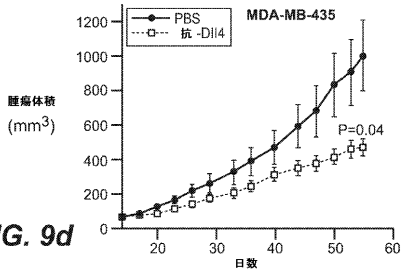


FIG. 9d

【図９Ｅ】

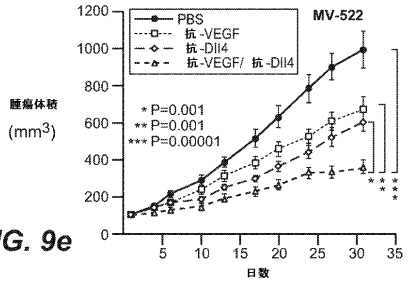


FIG. 9e

【図９Ｆ】

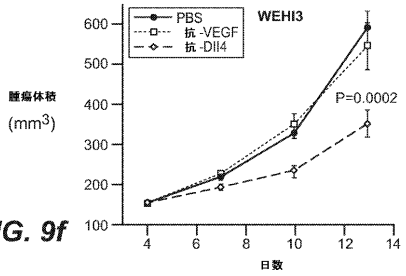


FIG. 9f

【図９Ｇ】

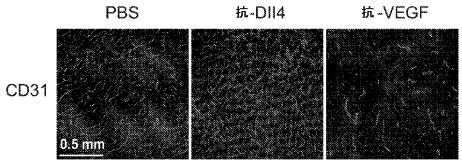


FIG. 9g

【図９Ｈ】

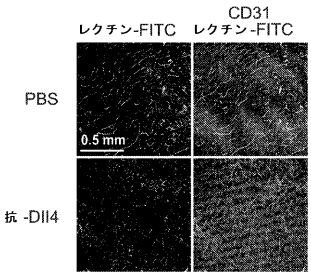


FIG. 9h

【図９Ｉ】

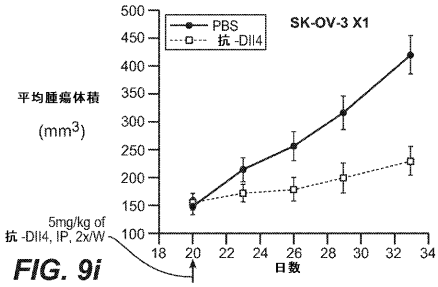


FIG. 9i

【図９Ｊ】

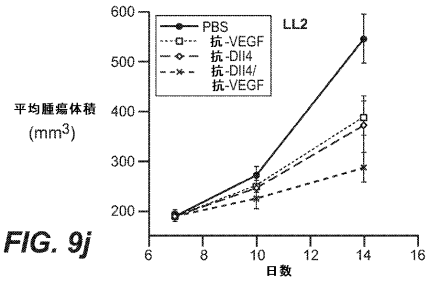


FIG. 9j

【図９Ｋ】

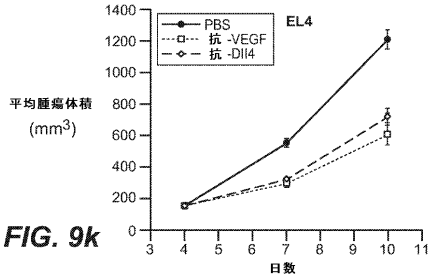


FIG. 9k

【図９Ｌ】

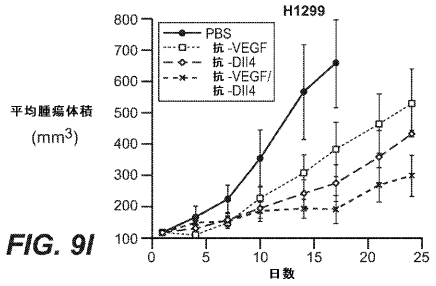


FIG. 9l

【図９Ｍ】

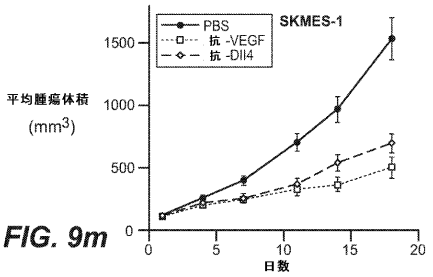


FIG. 9m

【図９Ｎ】

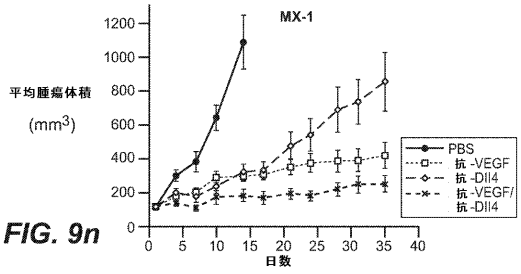


FIG. 9n

【図９Ｏ】

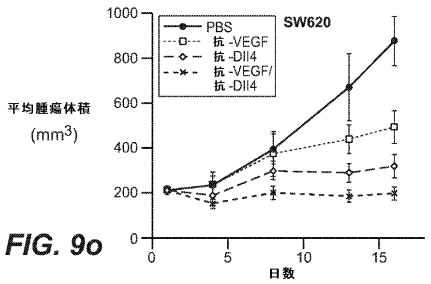


FIG. 9o

【図９Ｐ】

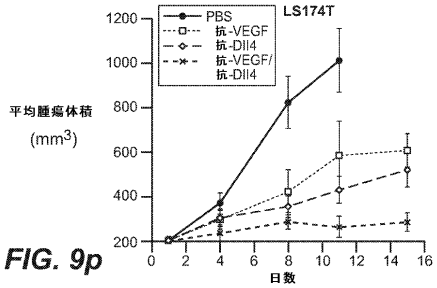
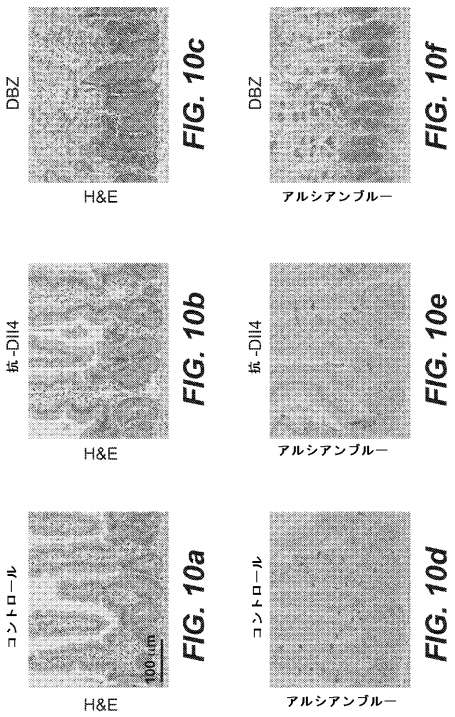
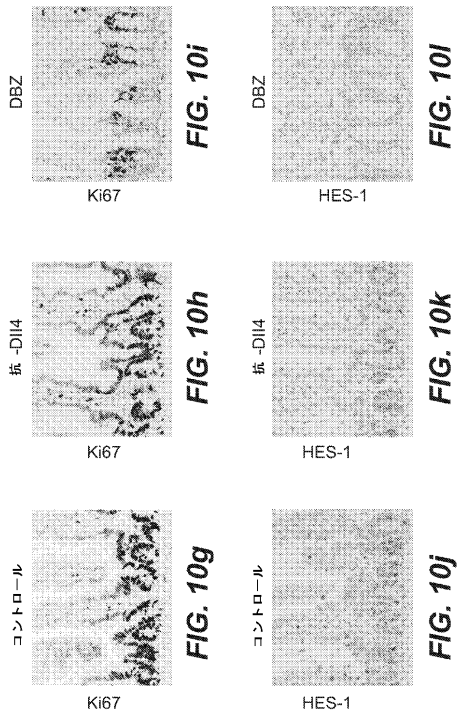


FIG. 9p

【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【図１１Ａ】

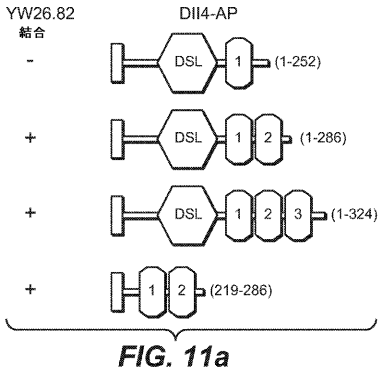


FIG. 11a

【図１１Ｂ】

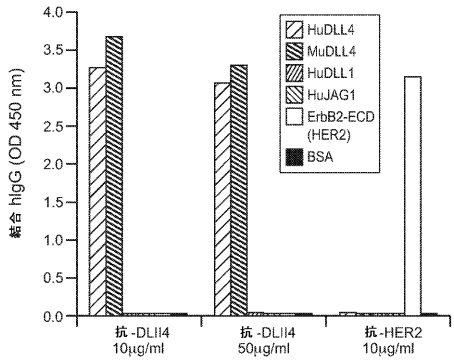


FIG. 11b

【図１１Ｃ】

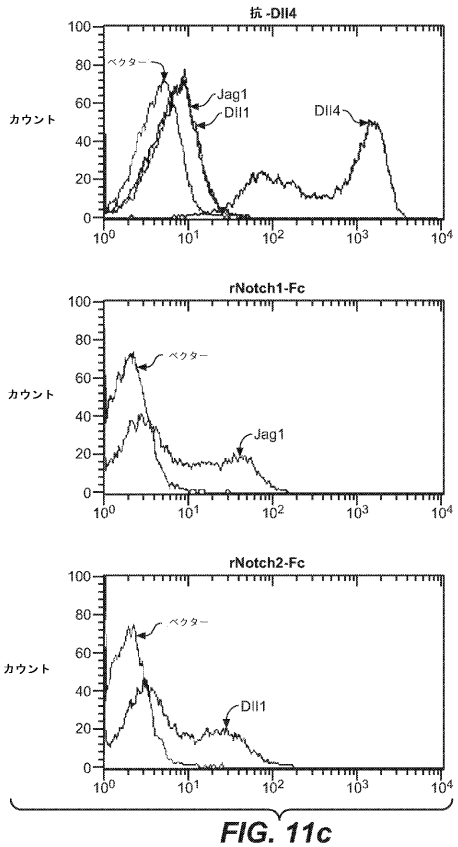


FIG. 11c

【図１１Ｄ】

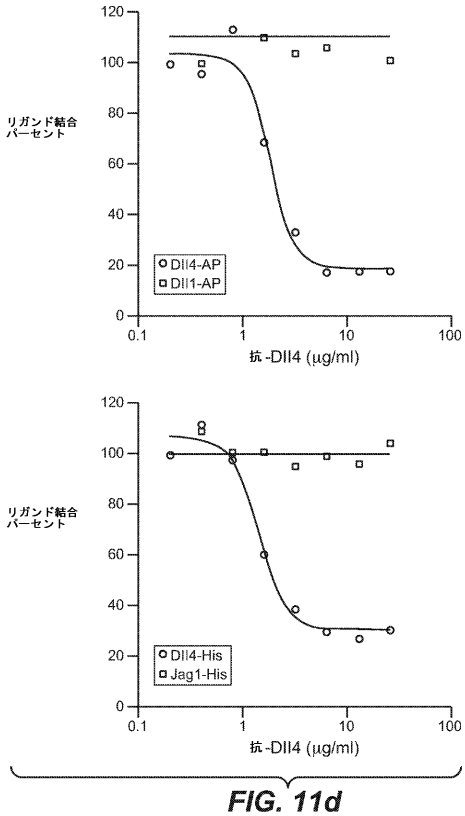


FIG. 11d

【図１１Ｅ】

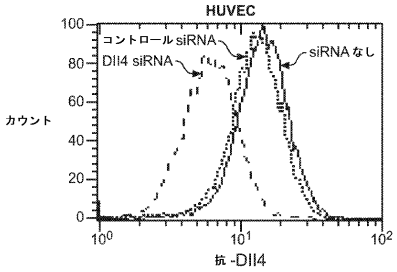


FIG. 11e

【図１２】

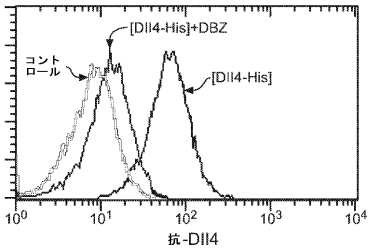


FIG. 12

【配列表】
2009539384000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成21年1月16日(2009.1.16)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に、分子生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体、およびその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
血管補給の発達は、多くの生理学的および病理学的過程にとって基本的要件である。胚および腫瘍などの活発に増殖する組織は、十分な血液補給を必要とする。これらの組織は、血管形成と呼ばれる過程を通じて、新規血管の形成を増進するプロ血管増殖因子を生産することによってこの要求を満たす。血管形成は、下記のステップの全て、または多くを含む、複雑ではあるが、整然とした生物事象である。ａ）内皮細胞（ＥＣ）が、既存のＥＣから増殖するか、または前駆細胞から分化する；ｂ）ＥＣが移動し合体してコード状構造を形成する；ｃ）次に、血管コードは、管形成を経過し、中心腔を持つ血管を形成する；ｄ）既存コードまたは血管が、芽を出し二次血管を形成する；ｅ）原始血管網は、さらに再編成および再形成を経過する；およびｆ）辺縁内皮細胞が招集されて、内皮管を包囲

し、この血管に対し維持および修飾機能を付与する。このような細胞として、小血管のための辺縁細胞、比較的大型の血管のための平滑筋細胞、および心臓における心筋細胞が挙げられる（非特許文献１；非特許文献２；非特許文献３）。

【０００３】

血管形成が、種々の障害の病因に関与することは、現在では十分に知られている。そのような障害として、固形腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後線維増殖、血管腫、慢性的炎症、眼内血管新生病、例えば、増殖性網膜症、例えば、糖尿病網膜症、加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）、血管新生緑内障、移植角膜組織およびその他の移植組織の免疫拒絶反応、慢性関節リューマチ、および乾癬が挙げられる（非特許文献４；非特許文献５；および非特許文献６）。

【０００４】

腫瘍増殖の場合、血管形成は、過形成から新形成への移行の決定、および、腫瘍の増殖および転移のための栄養補給のために必須であるようである（非特許文献７）。血管新生によって、腫瘍細胞は、正常細胞に比べて、成長への有利な手がかりおよび増殖自律性を獲得することが可能となる。腫瘍は、通常、単一異常細胞として始まるが、これは、利用可能な毛細管網からの距離のために、たかだか数立方ミリメートルの大きさにしか成長することができず、それ以上成長、拡散することなく長期間「休眠状態」のまま留まることがあり得る。次に、いくつかの腫瘍細胞が、血管形成表現型にスイッチされて内皮細胞を活性化し、内皮細胞は増殖し、成熟して新規毛細血管となる。これらの新たに形成された血管は、一次腫瘍の継続的成長を可能とするばかりでなく、転移腫瘍細胞の拡散および転移増殖を可能とする。したがって、乳癌ばかりでなく、他のいくつかの腫瘍においても、腫瘍切片における微小血管密度と、患者の生存率との間には相関が観察されている。Ｗｅｉｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２４：１－６（１９９１）；Ｈｏｒａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３４０：１１２０－２４（１９９２）；Ｍａｃｃｈｉａｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３４０：１４５－４６（１９９２）。この血管形成スイッチを調節する正確な機序は十分には理解されていないが、腫瘍塊の新規血管形成は、多数の、血管形成刺激因子と阻害因子との間の差し引きバランスから得られると考えられている（Ｆｏｌｋｍａｎ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１（１）：２７－３１（１９９５））。

【０００５】

血管発達の過程は緊密に調整されている。これまで、相当量の分子が、これらの多くは、周辺細胞によって生産される分泌因子であるが、ＥＣ分化、増殖、移動、および、合体によるコード様構造の形成を調節することが示されている。例えば、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）は、血管形成の刺激、および血管透過性の誘導に関与する最重要因子として特定されている。Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１８：４－２５（１９９７）。一つのＶＥＧＦ対立遺伝子の欠失ですら胎児の死を招くという所見は、血管系の発達と分化においてこの因子の果たす役割が何ものにも替えがたいことを指し示す。さらに、ＶＥＧＦは、腫瘍および眼球障害に関連する血管新生の最重要介在因子であることが示されている。Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．上記。ＶＥＧＦ ｍＲＮＡは、調べた、大多数のヒト腫瘍によって過剰発現されていた。Ｂｅｒｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９１：１５３－５９（１９９３）；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｐａｔｈｏｌ．２６：８６－９１（１９９５）；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：４７２７－３５（１９９３）；Ｍａｔｔｅｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７３：９３１－３４（１９９６）；Ｄｖｏｒａｋ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１４６：１０２９－３９（１９９５）。

【０００６】

さらに、糖尿病性、およびその他の虚血関連性網膜症患者では、眼房水におけるＶＥＧＦの濃度レベルは、血管の活発な増殖と高い相関を持つ。Ａｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３１：１４８０－８７（１９９４）。さらに、ＡＭＤに冒

される患者では、新生血管の網状膜においてＶＥＧＦが局在することが実験によって示されている。Ｌｏｐｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．３７：８５５－６８（１９９６）。

【０００７】

抗ＶＥＧＦ中和抗体は、ヌードマウスにおいて、ヒトの各種腫瘍細胞系統の増殖を抑え（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６２：８４１－４４（１９９３）；Ｗａｒｒｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９５：１７８９－９７（１９９５）；Ｂｏｒｇｓｔｒｏｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：４０３２－３９（１９９６）；Ｍｅｌｎｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：９２１－２４（１９９６））、かつ、さらに、虚血性網膜障害モデルにおいて眼内血管形成を抑制する（Ａｄａｍｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．１１４：６６－７１（１９９６））。したがって、抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体、またはその他のＶＥＧＦ活動の抑制因子は、腫瘍および各種眼内新生血管障害の処置のための、有望な候補となる。このような抗体は、例えば、１９９８年１月１４日公開の特許文献１、共に１９９８年１０月１５日公開の特許文献２および特許文献３に記載される。抗ＶＥＧＦ抗体の一つである、ベバシズマブは、特定癌の処置のために化学治療処方と組み合わせた使用についてＦＤＡによって承認され、抗ＶＥＧＦ抗体断片である、ラニビズマブは、加齢性（ウェット）黄斑変性の処置についてＦＤＡによって承認されている。

【０００８】

治療薬剤としての開発に最適な臨床属性を有する介在因子が依然として求められていることは明らかである。本明細書に記載される発明は、この要求に応えるもので、かつ、その他の利益をも提供する。

【０００９】

本明細書に引用される文献は、特許出願および公開を含め全て、その全体を、引用により本明細書に含める。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】欧州特許第８１７，６４８号明細書

【特許文献２】国際公開第９８／４５３３１号パンフレット

【特許文献３】国際公開第９８／４５３３２号パンフレット

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｈａｎａｈａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７７：４８－５０（１９９７）

【非特許文献２】Ｈｏｇａｎ ＆ Ｋｏｌｏｄｚｉｅｊ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．３：５１３－２３（２００２）

【非特許文献３】Ｌｕｂａｒｓｋｙ ＆ Ｋｒａｓｎｏｗ，Ｃｅｌｌ １１２：１９－２８（２００３）

【非特許文献４】Ｆｏｌｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１０９３１－３４（１９９２）

【非特許文献５】Ｋｌａｇｓｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．５３：２１７－３９（１９９１）

【非特許文献６】Ｇａｒｎｅｒ Ａ．，“Ｖａｓｃｕｌａｒ ｄｉｓｅａｓｅｓ，”Ｉｎ：Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｏｃｕｌａｒ Ｄｉｓｅａｓｅ．Ａ Ｄｙｎａｍｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｇａｒｎｅｒ Ａ．，Ｋｌｉｎｔｗｏｒｔｈ ＧＫ，ｅｄｓ．，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ(Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ，１９９４)，ｐｐ１６２５－１７１０

【非特許文献７】Ｆｏｌｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３９：５８（１９８９）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】
【００１２】
本発明は、一部は、各種のＤＬＬ４結合因子（例えば、免疫複合体、抗体、およびその断片）の特定に基づく。ＤＬＬ４は、重要かつ有利な治療標的として存在するが、本発明は、結合性ＤＬＬ４に基づく組成物および方法を提供する。本明細書に記載するように、本発明のＤＬＬ４結合因子は、ＤＬＬ４－Ｎｏｔｃｈ受容体経路の発現および／または活性に関連する病的状態を標的として使用するための、重要な治療および診断因子となる。したがって、本発明は、ＤＬＬ４結合に関連する、方法、組成物、キット、および製造用品を提供する。
【００１３】
本発明は、ＤＬＬ４に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体を提供する。
【００１４】
一局面では、本発明は、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。その場合、該抗体の完全長ＩｇＧ形は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上の結合親和性においてヒトのＤＬＬ４に特異的に結合する。当該分野において十分に知られるように、その受容体に対するリガンドの結合親和性は、種々のアッセイの内のいずれかによって定量することが可能であり、種々の定量値として表される。したがって、一実施態様では、結合親和性は、Ｋｄ値として表され、内在的結合親和性を反映する（例えば、アビディティー効果を最小とした）。一般に、結合親和性は、細胞無添加状況であれ、または細胞関連状況であれ、インビトロで測定することが好ましい。本明細書に記載されるものを含め、当該分野で既知のいくつかのアッセイ、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、およびＥＬＩＳＡなど、いずれも結合親和性測定値を得るために使用することが可能である。ある実施態様では、単離抗ＤＬＬ４抗体は、同様の親和性においてヒトおよびマウスのＤＬＬ４に結合する、すなわち、ヒトのＤＬＬ４に対する結合親和性が、マウスのＤＬＬ４に対する結合親和性に比べて、１００倍を超えて大きくもないし、小さくもない。ある実施態様では、ヒトのＤＬＬ４に対する結合親和性は、マウスのＤＬＬ４に対する結合親和性よりも、１０倍を超えて大きくも小さくもない。ある実施態様では、抗体は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上の結合親和性において、マウスのＤＬＬ４に特異的に結合する。
【００１５】
一局面では、本発明は、単離抗ＤＤＬ４抗体であって、該抗体の完全長ＩｇＧ形が、ヒトのＤＤＬ４に対し、約2×10^{5}以上、または約1×10^{5}以上のk_{on}において結合する、抗体を提供する。当該分野において十分知られるように、リガンドの、その受容体に対する結合のk_{on}は、いくつかのアッセイの内のいずれかを用いて定量し、かつ、種々の定量値において表すことが可能である。
【００１６】
一局面では、本発明は、ＤＬＬ４のリガンド結合領域に結合する、単離抗体を提供する。ある実施態様では、単離抗体は、ＤＬＬ４細胞外ドメインを含むか、該ドメインから成るか、または、該ドメインから事実上成るポリペプチドに結合する。ある実施態様では、単離抗体は、ヒトのＤＬＬ４のアミノ酸２５２－２８２、１－２５２、１－２８６、１－３２４、および／または２１９－２８６を含むか、これらから成るか、またはこれらから事実上成るポリペプチドに結合する。
【００１７】
一局面では、本発明は、ＤＬＬ４結合について、Ｎｏｔｃｈ受容体と競合する、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。
【００１８】
一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の生物活性を抑制し、下げ、および／または阻止する、単離抗ＤＬＬ４抗体を提供する。
【００１９】
一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、５、または６個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＹＮＧＰＳＴ（配列番号１５）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＡＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、
を含む。
【００２０】
一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：
（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＶＮＧＰＡＴ（配列番号１４）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＳＦＲＤＮＷＩＳ（配列番号２）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号３）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、
を含む。
【００２１】
一局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は：
（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
（ｉ）Ａ１－Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１－Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）Ｂ１－Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１－Ｂ１７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
（ｉｉｉ）Ｃ１－Ｃ９が、ＱＱＳＹＴＧＴＶＴ（配列番号１８）である、配列Ｃ１－Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
（ｉｖ）Ｄ１－Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１－Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｖ）Ｅ１－Ｅ１８が、ＧＹＩＳＰＮＳＧＦＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８）である、配列Ｅ１－Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｖｉ）Ｆ１－Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１－Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１－１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む変異ＨＶＲ配列、
を含む。

【００２２】

一局面では、本発明は、１、２、３、４、５、または６個のＨＶＲを含む抗体を提供する。各ＨＶＲは、配列番号１－１８から成る群から選ばれる配列を含むか、該配列から成るか、または該配列から事実上成り、配列番号１０はＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号１１はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８は、ＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号１または２は、ＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３、４、５、６、７、または８は、ＨＶＲ－Ｈ２に対応し、かつ、配列番号９は、ＨＶＲ－Ｈ３に対応する。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１２、１、３、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１３、１、４、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１４、２、３、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１５、１、５、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１６、１、６、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１７、１、７、９を含む。一実施態様では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１８、１、８、９を含む。

【００２３】

本発明の抗体における変異ＨＶＲは、ＨＶＲにおいて一つ以上（例えば、２、３、４、５個、またはそれ以上）の修飾を有することが可能である。

【００２４】

一実施態様では、ＨＶＲ－Ｌ３変異種は、下記の位置：９１（ＳまたはＷ）、９２（ＹまたはＦ）、９３（Ｔ、Ｎ、またはＳ）、９４（ＴまたはＧ）、９５（Ｐ、Ｑ、Ａ、またはＴ）、および／または９６（Ｐ、Ｓ、Ａ、またはＶ）の、任意の組み合わせにおいて、１－６個（１、２、３、４、５、または６個）の置換を含む。

【００２５】

一実施態様では、ＨＶＲ－Ｈ２変異種は、下記の位置：５０（Ｖ、Ｌ、またはＹ）、５２（ＮまたはＳ）、５２ａ（ＰまたはＳ）、または５３（Ｎ、Ｑ、Ｔ、またはＩ）の、任意の組み合わせにおいて、１－４個（１、２、３、または４個）の置換を含む。

【００２６】

各位置に続く括弧の中の文字（単数または複数）は、例示の置換（すなわち、代替）アミノ酸を示す。当業者には明らかなように、本明細書に記載される背景における置換アミノ酸としての、他のアミノ酸の適性は、当該分野で既知であるか、および／または本明細書に記載される技術を用い通例のやり方で評価することが可能である。

【００２７】

一局面において、本発明は、配列番号１または２の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号３、４、５、６、７、または８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番

号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２領域を含む抗体を提供する。一局面において、本発明は、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３領域を含む抗体を提供する。

【００２８】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１配列；

（ｉｉ）配列番号５の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。

【００２９】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１配列；

（ｉｉ）配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｌ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号１５の配列を含むＨＶＲ－Ｌ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。

【００３０】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１の配列を含むＨＶＲ－Ｈ１配列；

（ｉｉ）配列番号８の配列を含むＨＶＲ－Ｈ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号９の配列を含むＨＶＲ－Ｈ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。

【００３１】

一局面において、本発明は、下記：

（ｉ）配列番号１０の配列を含むＨＶＲ－Ｌ１配列；

（ｉｉ）配列番号１１の配列を含むＨＶＲ－Ｌ２配列；

（ｉｉｉ）配列番号１８の配列を含むＨＶＲ－Ｌ３配列

の内の少なくとも一つ、少なくとも二つ、または三つ全てを含む抗体を提供する。

【００３２】

配列番号１－１８のアミノ酸配列は、図１ａおよび１ｂに示すように、個々のＨＶＲ（すなわち、Ｈ１、Ｈ２、またはＨ３）に関して番号付けする。番号付けは、後述するように、Ｋａｂａｔの番号付けシステムに一致する。

【００３３】

一局面では、本発明は、図１ａおよび１ｂに示す重鎖ＨＶＲ配列を含む抗体を提供する。

【００３４】

一局面では、本発明は、図１ａおよび１ｂに示す軽鎖ＨＶＲ配列を含む抗体を提供する。

【００３５】

本発明の抗体のいくつかの実施態様は、下記：

【００３６】

【化１】

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Asn*** Thr Ala

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Ser ***Arg*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***His*** Tyr Thr Thr Pro Pro

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 **（配列番号５２）**

（ＨＶＲ残基には下線を施す）

の配列番号５２に示される、ヒト化４Ｄ５抗体（ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８）（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の軽鎖可変ドメインを含む。

【００３７】

一実施態様では、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８軽鎖可変ドメイン配列は、位置３０、６６、および９１（それぞれ、上にボールド／イタリック体で示されるＡｓｎ、Ａｒｇ、およびＨｉｓ）の内の一つ以上において修飾される。一実施態様では、修飾されたｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８配列は、位置３０にＳｅｒ、位置６６にＧｌｙ、および／または、位置９１にＳｅｒを含む。したがって、一実施態様では、本発明の抗体は、下記：

【００３８】

【化２】

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Ser*** Thr Ala

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Ser ***Gly*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***Ser*** Tyr Thr Thr Pro Pro

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 **（配列番号５３）**

（ＨＶＲ残基には下線を施す）

の配列番号５２に示される、配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【００３９】

ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８に関する置換残基は、上にボールド／イタリック体で示す。

【００４０】

本発明の抗体は、ＤＬＬ４に対する結合が事実上保持される限り、適切であれば、任意の骨組可変ドメインを含むことが可能である。例えば、ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトのサブグループＩＩＩ重鎖骨組共通配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、骨組共通配列は、位置７１、７３、および／または７８において置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施態様では、位置７１はＡであり、７３はＴであり、および／または、７８はＡである。一実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、および同第５，８２１，３３７号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の重鎖可変ドメイン

骨組構造配列を含む。一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトのκＩ軽鎖骨組共通配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、米国特許第６，４０７，２１３号明細書および同第５，８２１，３３７号明細書に記載されるように、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖ＨＶＲ配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）（さらに、米国特許第６，４０７，２１３号明細書、および同第５，８２１，３３７号明細書、およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００４），３４０（５）：１０７３－９３にも参照される）の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【００４１】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、５、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１５である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４２】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号２、３、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１４である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４３】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、および／または３７の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、８、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号３８、３９、４０、および／または４１の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１８である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４４】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、５、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１５である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４５】

一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号２、３、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１４である、軽鎖可変ドメインを含む。

【００４６】
一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４６、４７、４８、および／または４９の配列を含み、ＨＶＲ　Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３配列が、それぞれ、配列番号１、８、および／または９である、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、その中において、骨組構造配列が、配列番号４２、４３、４４、および／または４５の配列を含み、ＨＶＲ　Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３配列が、それぞれ、配列番号１０、１１、および／または１８である、軽鎖可変ドメインを含む。
【００４７】
一実施態様では、本発明の抗体は、所望の標的結合親和性を獲得するために親和性熟成される。一例において、本発明の親和性熟成された抗体は、アミノ酸位置Ｈ２８、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４、Ｌ９５、および／またはＬ９６の内の一つ以上において置換を含む。一例において、本発明の親和性熟成された抗体は、下記の置換：（ａ）重鎖において、Ｖ５０Ｌ、Ｖ５０Ｙ、Ｎ５２Ｓ、Ｐ５２ａＳ、Ｎ５３Ｑ、Ｎ５３Ｔ、Ｎ５３Ｉ、Ｓ５６Ａ、Ｓ５６Ｆ、Ｔ５７Ｓ、Ｄ５８Ｅ、Ｄ５８Ｉ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｙ、または（ｂ）軽鎖において、Ｓ９１Ｗ、Ｙ９２Ｆ、Ｔ９３Ｎ、Ｔ９３Ｓ、Ｔ９４Ｇ、Ｐ９５Ｑ、Ｐ９５Ａ、Ｐ９５Ｔ、Ｐ９６Ｓ、Ｐ９６Ａ、Ｐ９６Ｖの内の一つ以上を含む。
【００４８】
一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５４の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５５の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５４の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５５の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。
【００４９】
一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５６の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５７の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５６の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５７の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。
【００５０】
一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５８の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５９の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は、配列番号５８の配列を含む、重鎖可変ドメイン、および、配列番号５９の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。
【００５１】
一局面では、本発明は、ＤＬＬ４に対する結合に関して、前述の抗体のいずれかと競合する抗体を提供する。一局面では、本発明は、前述の抗体のいずれかと、ＤＬＬ４上の同じエピトープに結合する抗体を提供する。
【００５２】
当該分野で知られ、本明細書で下記にさらに詳細に記載されるように、抗体の超可変領域を区画するアミノ酸位置／境界は、観点、および当該分野で既知の各種定義（下記に記載）に応じて変動する可能性がある。可変ドメイン内のいくつかの位置は、その位置が、ある一組の基準の下では超可変領域の中に含めることが可能である一方で、別の一組の基準の下では超可変領域から外されるという点で、ハイブリッド超可変位置と見なしてもよい。一つ以上の、このような位置が、拡張超可変領域（下記にさらに詳細に定義する）の中に見出される可能性がある。
【００５３】
ある実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。ある実施態様では、抗体は、キメラ抗体、親和性熟成抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体から成る群から選ばれる。ある実施態様では、抗体は、抗体断片である。ある実施態様では、抗体は、Ｆａｂ、Ｆａｂ′、Ｆａｂ′－ＳＨ、Ｆ（ａｂ′）$_2$、またはｓｃＦｖである。
【００５４】

一実施態様では、抗体は、キメラ抗体、例えば、異種の、非ヒト、ヒト、またはヒト化配列（例えば、骨組構造および／または定常ドメイン配列）に移植された、非ヒトドナー由来の、抗原結合配列を含む抗体である。一実施態様では、非ヒトドナーはマウスである。一実施態様では、抗原結合配列は、合成的であり、例えば、突然変異誘発（例えば、ファージディスプレイなど）によって獲得される。一実施態様では、本発明のキメラ抗体は、マウスのＶ領域、およびヒトのＣ領域を持つ。一実施態様では、マウスの軽鎖Ｖ領域が、ヒトのカッパ軽鎖に融合される。一実施態様では、マウス重鎖Ｖ領域が、ヒトのＩｇＧ１　Ｃ領域に融合される。

【００５５】

本発明のヒト化抗体は、ＦＲにアミノ酸置換を持つもの、および、移植ＣＤＲの中に変化を持つ親和性熟成変異種を含む。ＣＤＲまたはＦＲにおける置換アミノ酸は、ドナーまたはレシピエント抗体の中に存在するものに限定されない。別の実施態様では、本発明の抗体はさらに、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ機能、およびＢ－細胞殺作用の強化をもたらす、Ｆｃ領域のアミノ酸残基の変化を含む。本発明の他の抗体として、安定性を向上させる特異的変化を持つものが挙げられる。別の実施態様では、本発明の抗体は、エフェクター機能の低下、例えば、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ機能の低下、および／またはＢ－細胞殺作用の低下をもたらす、Ｆｃ領域のアミノ酸残基の変化を含む。ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトの補体因子Ｃ１ｑ、および／または、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞におけるヒトのＦｃ受容体に対する結合低下（例えば、結合欠如）によって特徴づけられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトのＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ、および／またはＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合低下（例えば、結合欠如）によって特徴づけられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ＩｇＧクラス（例えば、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）であり、Ｅ２３３、Ｌ２３４、Ｇ２３６、Ｄ２６５、Ｄ２７０、Ｎ２９７、Ｅ３１８、Ｋ３２０、Ｋ３２２、Ａ３２７、Ａ３３０、Ｐ３３１、および／またはＰ３２９（番号はＥＵ指数による）において少なくとも一つの突然変異を含む。ある実施態様では、抗体は、突然変異Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ、またはＤ２６５Ａ／Ｎ２９７Ａを含む。

【００５６】

一局面では、本発明は、本明細書に示される抗原結合配列の内のいずれかを含み、ＤＬＬ４に特異的に結合する、抗ＤＬＬ４ポリペプチドを提供する。

【００５７】

本発明の抗体は、ＤＬＬ４に（例えば、特異的に）結合し、ある実施態様では、ＤＬＬ４関連作用の内の一つ以上の局面を修飾する場合がある。そのような作用としては、例えば、ただしそれらに限定されないが、Ｎｏｔｃｈ受容体活性化の低下または阻止、Ｎｏｔｃｈ受容体下流方向への分子シグナル伝達の低下または阻止、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合の遮断または阻止、および／または、内皮細胞増殖の増進、および／または内皮細胞分化の抑制、および／または、動脈分化の抑制、および／または、腫瘍血管還流の抑制、および／または、腫瘍、細胞増殖性障害、または癌の処置および／または予防、ＤＬＬ４発現および／または活性と関連する障害の処置または予防、および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体の発現および／または活性と関連する障害の処置または予防の内の、任意の一つ以上が挙げられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、ＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、該抗体は、ＤＬＬ４の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に特異的に結合する。ある実施態様では、該抗体は、ＤＬＬ４細胞外ドメインから成るか、または事実上成るポリペプチドに特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、約１ｎＭ以上、または約５００ｐＭ以上のＫＤにおいてＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、約2×10^{5}以上、または約1×10^{5}以上のk_{on}においてヒトのＤＬＬ４に特異的に結合する。ある実施態様では、抗体は、ＤＬＬ４－リガンドと結合について競合する（ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合を下げるか、および／または阻止する）。

【００５８】

一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の抗体、および担体を含む組成物を提供す

る。一実施態様では、担体は、製薬学的に受容可能である。
【００５９】
一局面では、本発明は、本発明の抗ＤＬＬ４抗体をコードする核酸を提供する。
【００６０】
一局面では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。
【００６１】
一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の核酸、および担体を含む組成物を提供する。一実施態様では、担体は、製薬学的に受容可能である。
【００６２】
一局面では、本発明は、本発明の核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターは、任意のタイプであってよく、例えば、発現ベクターなどの組み換えベクターであってもよい。種々の宿主細胞の内いずれのものを使用することも可能である。一実施態様では、宿主細胞は、原核細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である。一実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞などの哺乳動物細胞である。
【００６３】
一局面では、本発明は、本発明の抗体の作製法を提供する。例えば、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体（本明細書において定義するように、その完全長および断片を含む）、または免疫複合体の作製法であって、前記抗体（またはその断片）をコードする、本発明の組み換えベクターを、適切な宿主において発現させること、および、前記抗体を回収することを含む方法を提供する。
【００６４】
一局面では、本発明は、容器、および該容器の中に含まれる、本発明の一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を含む、組成物を含む製品を提供する。一実施態様では、組成物はさらに、抗血管形成因子を含む。一実施態様では、抗血管形成因子は、抗ＶＥＧＦ抗体、例えば、ベバシズマブである。一実施態様では、該組成物は、本発明の核酸を含む。一実施態様では、抗体を含む組成物はさらに、ある実施態様では、製薬学的に受容可能な担体を含む。一実施態様では、抗血管形成因子を含む、第２の組成物が、容器の中に含まれる。一実施態様では、抗血管形成因子は、抗ＶＥＧＦ抗体、例えば、ベバシズマブである。一実施態様では、本発明の製品はさらに、対象に対して組成物（単数または複数）（例えば、抗体）を投与するための指示（例えば、本明細書に記載される方法の内のいずれかに関する指示）を含む。
【００６５】
一局面では、本発明は、本発明の、一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を含む組成物を含む第１容器、およびバッファーを含む第２容器を含むキットを提供する。一実施態様では、バッファーは、製薬学的に受容可能である。一実施態様では、抗体を含む組成物はさらに、担体を含み、担体は、ある実施態様では、製薬学的に受容可能である。一実施態様では、キットはさらに、対象に、組成物（例えば、抗体）を投与するための指示を含む。
【００６６】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の抗ＤＬＬ４抗体の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００６７】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の核酸の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００６８】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の発現ベクタ

ーの使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００６９】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の宿主細胞の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００７０】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明の製品の使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００７１】
一局面では、本発明は、障害、例えば、癌、腫瘍、および／または細胞増殖性障害などの障害の処置および／または予防処置のための薬剤の調製における、本発明のキットの使用を提供する。ある実施態様では、障害は、血管形成に関連する病的状態である。
【００７２】
本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性、例えば、発現および／または活性の上昇または低下、または、有害な発現および／または活性と関連する病的状態を修飾するために有用な方法および組成物を提供する。
【００７３】
一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性の上昇と関連する腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置または予防するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。
【００７４】
一局面では、本発明は、腫瘍または癌の増殖を緩和、抑制、阻止、または予防するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。
【００７５】
一局面では、本発明は、腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。
【００７６】
一局面では、本発明は、血管形成を抑制するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。
【００７７】
一局面では、本発明は、血管形成に関連する病的状態を処置するための方法であって、そのような処置を要する対象に対し、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。ある実施態様では、血管形成に関連する病的状態は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。ある実施態様では、血管形成に関連する病的状態は、眼内血管新生症である。
【００７８】
適切なものであれば、いずれの病的状態であっても、それに作用を及ぼすために本発明の方法を使用することが可能である。例示の障害は本明細書に記載されるが、例えば、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、および肝細胞癌、および、上記癌の転移形から成る群から選ばれる癌が挙げられる。
【００７９】
本発明の方法はさらに、追加の処置ステップを含むことが可能である。例えば、一実施態様では、方法は、標的細胞および／または組織（例えば、癌細胞）が、放射線処置、または化学療法剤または抗血管形成剤に暴露されるステップを含む。
【００８０】
別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４の検出法であって、サンプルにおいて、ＤＬＬ４－

抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。本明細書で用いる「検出」という用語は、コントロールの参照下、または参照無しにおける定性的および／または定量的検出（濃度測定）を含む。

【００８１】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４発現および／または活性に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有するか、疑われる患者から得た生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、ＤＬＬ４発現は、発現上昇、または異常発現である。ある実施態様では、障害は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。

【００８２】

別の局面では、本発明は、本発明に記載される、抗ＤＬＬ４抗体であって、検出ラベルを含む抗体を提供する。

【００８３】

別局面では、本発明は、本発明に記載される抗ＤＬＬ４抗体の内のいずれかと、ＤＬＬ４との複合体を提供する。ある実施態様では、複合体は、インビボ、またはインビトロに存在する。ある実施態様では、複合体は、癌細胞を含む。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、検出可能に標識される。

【００８４】

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目１）

単離抗ＤＬＬ４抗体であって：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：

（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＴＧＴＶＴ（配列番号１８）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＹＩＳＰＮＳＧＦＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、

（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、

を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。

（項目２）

単離抗ＤＬＬ４抗体であって：

（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：

（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＮＧＰＳＴ（配列番号１５）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、

（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＡＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、
を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。
（項目３）
ＨＶＲ－Ｌ３変異種が、下記の位置：９１（ＳまたはW）、９２（ＹまたはＦ）、９３（Ｔ、Ｎ、またはＳ）、９４（ＴまたはＧ）、９５（Ｐ、Ｑ、Ａ、またはＴ）、および／または９６（Ｐ、Ｓ、Ａ、またはＶ）の、任意の組み合わせにおいて、１～６個（１、２、３、４、５、または６個）の置換を含む、項目１または２に記載の抗体。
（項目４）
ＨＶＲ－Ｈ２変異種が、下記の位置：５０（Ｖ、Ｌ、またはＹ）、５２（ＮまたはＳ）、５２ａ（ＰまたはＳ）、または５３（Ｎ、Ｑ、Ｔ、またはＩ）の、任意の組み合わせにおいて、１～４個（１、２、３、または４個）の置換を含む、項目１または２に記載の抗体。
（項目５）
１、２、３、４、５、または６個のＨＶＲを含む単離ＤＬＬ４抗体であって、各ＨＶＲは、配列番号１～１８から成る群から選ばれる配列を含むか、該配列から成るか、または該配列から事実上成り、配列番号１０はＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号１１はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８は、ＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号１または２は、ＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３、４、５、６、７、または８は、ＨＶＲ－Ｈ２に対応し、配列番号９は、ＨＶＲ－Ｈ３に対応する、単離ＤＬＬ４抗体。
（項目６）
項目５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１４、２、３、および９を含む、抗体。
（項目７）
項目５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１５、１、５、および９を含む、抗体。
（項目８）
項目５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１６、１、６、および９を含む、抗体。
（項目９）
項目５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１７、１、７、および９を含む、抗体。
（項目１０）
項目５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１８、１、８、および９を含む、抗体。
（項目１１）
骨組構造配列の少なくとも一部が、ヒトの共通骨組構造配列である、項目１～１０のいずれかに記載の抗体。
（項目１２）
項目１または２に記載の抗体であって、前記修飾が、置換、挿入、または欠失である、

抗体。
（項目１３）
項目１～１２のいずれか１項に記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのκサブグループ共通骨組構造配列を含む、抗体。
（項目１４）
項目１～１２のいずれかに記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのサブグループＩＩＩ重鎖共通骨組構造配列を含む、抗体。
（項目１５）
項目１４に記載の抗体であって、該抗体が、位置７１、７３、または７８の一つ以上において置換を含む、抗体。
（項目１６）
項目１５に記載の抗体であって、前記置換が、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、または、Ｎ７８Ａの内の一つ以上である、抗体。
（項目１７）
項目１～１６のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
（項目１８）
項目１７に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
（項目１９）
前記ベクターが発現ベクターである、項目１８に記載のベクター。
（項目２０）
項目１８または１９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
（項目２１）
前記宿主細胞が原核細胞である、項目２０に記載の宿主細胞。
（項目２２）
前記宿主細胞が真核細胞である、項目２０に記載の宿主細胞。
（項目２３）
前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、項目２０に記載の宿主細胞。
（項目２４）
抗ＤＬＬ４抗体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）項目１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）該抗体を回収すること、を含む方法。
（項目２５）
抗ＤＬＬ４免疫複合体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）項目１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）前記抗体を回収すること、を含む方法。
（項目２６）
前記宿主細胞が原核細胞である、項目２４または２５に記載の方法。
（項目２７）
前記宿主細胞が真核細胞である、項目２４または２５に記載の方法。
（項目２８）
ＤＬＬ４の検出のための方法であって、該方法が、生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
（項目２９）
ＤＬＬ４発現に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有するか、または有することが疑われる患者から得た生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
（項目３０）
前記抗ＤＬＬ４抗体が、検出可能に標識される、項目２８～２９のいずれかに記載の方法。
（項目３１）

項目１～１６のいずれかに記載の抗ＤＬＬ４抗体を含む組成物。
（項目３２）
項目１７～１９のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組成物。
（項目３３）
前記組成物が担体をさらに含む、項目３１または３２に記載の組成物。
（項目３４）
腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を要する被験体に対し、項目１～１６のいずれかに記載の抗体の有効量を投与し、それによって、該腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置することを含む、方法。
（項目３５）
前記腫瘍、癌、または細胞増殖性障害が、結腸癌、肺癌、または乳癌である、項目３４に記載の方法。
（項目３６）
有効量の抗血管形成剤を投与することをさらに含む、項目３４または３５に記載の方法。
（項目３７）
前記抗血管形成剤が、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）の拮抗剤である、項目３６に記載の方法。
（項目３８）
前記ＶＥＧＦ拮抗剤が、抗ＶＥＧＦ抗体である、項目３７に記載の方法。
（項目３９）
前記抗ＶＥＧＦ抗体が、ベバシズマブである、項目３８に記載の方法。
（項目４０）
有効量の化学療法剤を投与することをさらに含む、項目３４～３９のいずれかに記載の方法。
（項目４１）
血管形成に関連する病的状態を有する被験体において抗血管形成剤の効力を強化する方法であって、該抗血管形成剤に加えて、項目１～１６のいずれかに記載の抗体の有効量を該被験体に投与して、それによって、該抗血管形成剤の効力を強化することを含む、方法。
（項目４２）
血管形成に関連する前記病的状態が、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である、項目４１に記載の方法。
（項目４３）
血管形成に関連する前記病的状態が、眼内血管新生症である、項目４１に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【００８５】
【図１Ａ】図１ａおよび１ｂは、抗ＤＬＬ４抗体の重鎖および軽鎖ＨＶＲループの配列である。数字は、重鎖ＨＶＲ配列Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３、および軽鎖ＨＶＲ配列Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３を示す。配列の番号付けは下記の通り。クローン１５２．２６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１２である）；クローン１５２．２６．６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号４である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１３である）；クローン１５２．２６．１４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号２である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１４である）；クローン１５２．２６．２０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号５である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０であ

る；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１５である）；クローン１５２．２６．３４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号６である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１６である）；クローン１５２．２６．４０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号７である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１７である）；クローン１５２．２６．８２（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号８である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１８である）。

【００８６】

アミノ酸位置は、後述するように、Ｋａｂａｔ番号付けシステムにしたがって番号付けを行った。

【図１Ｂ】図１ａおよび１ｂは、抗ＤＬＬ４抗体の重鎖および軽鎖ＨＶＲループの配列である。数字は、重鎖ＨＶＲ配列Ｈ１、Ｈ２、およびＨ３、および軽鎖ＨＶＲ配列Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３を示す。配列の番号付けは下記の通り。クローン１５２．２６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１２である）；クローン１５２．２６．６（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号４である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１３である）；クローン１５２．２６．１４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号２である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号３である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１４である）；クローン１５２．２６．２０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号５である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１５である）；クローン１５２．２６．３４（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号６である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１６である）；クローン１５２．２６．４０（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号７である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１７である）；クローン１５２．２６．８２（ＨＶＲ－Ｈ１は配列番号１である；ＨＶＲ－Ｈ２は配列番号８である；ＨＶＲ－Ｈ３は配列番号９である；ＨＶＲ－Ｌ１は配列番号１０である；ＨＶＲ－Ｌ２は配列番号１１である；ＨＶＲ－Ｌ３は配列番号１８である）。

【００８７】

アミノ酸位置は、後述するように、Ｋａｂａｔ番号付けシステムにしたがって番号付けを行った。

【図２Ａ】図２は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：重鎖可変領域（ＶＨ）共通骨組構造（図２ａ、２ｂ）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号１９）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２０－２２）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号２３）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２４－２６）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造拡張ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号２７）ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２８－３０）ヒトＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３１）ヒトのＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３２－３３）ヒトＶ

Ｈアクセプター２骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３４）ヒトのＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３５－３７）
【図２Ｂ】図２は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：重鎖可変領域（ＶＨ）共通骨組構造（図２ａ、２ｂ）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号１９）ヒトのＶＨサブグループＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２０－２２）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号２３）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２４－２６）ヒトのＶＨサブグループＩＩ共通骨組構造拡張ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ（配列番号２７）ヒトのＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号２８－３０）ヒトＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３１）ヒトのＶＨアクセプター骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３２－３３）ヒトＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・ＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号３４）ヒトのＶＨアクセプター２骨組構造・マイナス・拡張超可変領域（配列番号３５－３７）
【図３】図３は、本発明の実行時に使用される、例示のアクセプターヒト共通骨組構造配列を示し、配列特定因子は下記の通りである：軽鎖可変領域（ＶＬ）共通骨組構造（図３）ヒトのＶＬカッパサブグループＩ共通骨組構造（配列番号３８）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＩ共通骨組構造（配列番号３９）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＩＩ共通骨組構造（配列番号４０）ヒトのＶＬカッパサブグループＩＶ共通骨組構造（配列番号４１）
【図４】図４は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖および重鎖の骨組領域配列を示す。上付き／ボールド体の数字は、Ｋａｂａｔによるアミノ酸位置を示す。
【図５】図５は、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８の軽鎖および重鎖の、修飾／変異骨組領域配列を示す。上付き／ボールド体の数字は、Ｋａｂａｔによるアミノ酸位置を示す。
【図６】図６は、抗体クローン２６．２０、２６．１４、および２６．８２の、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を示す。
【図７Ａ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒトの発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。
【図７Ｂ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒトの発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を

示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｃ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－ＤフィブリンゲルにおけるＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｄ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－ＤフィブリンゲルにおけるＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。

【図７Ｅ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－ＤフィブリンゲルにおけるＨＵＶＥＣ発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化

に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。
【図７Ｆ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。
【図７Ｇ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。
【図７Ｈ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、ＥＣ増殖を制御した。ａ－ｃ，ｆ，３－Ｄフィブリンゲルにおけるヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）発芽アッセイ。抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２）またはＤＢＺは、ＨＵＶＥＣの発芽を増進した（ａ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺが、ＨＵＶＥＣの過剰増殖を招くことを示した（ｂ）。抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺは、ＳＦ調整媒体の存在下にＨＵＶＥＣの発芽を増した（ｃ）。ｄ，ｈ，抗ＤＬＬ４抗体の全身的輸送は、新生児網膜においてＥＣの大量の蓄積を招いた。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍（上段）および高倍（下段）の共焦点画像（ｄ）。Ｋｉ６７染色は、抗ＤＬＬ４抗体によって処理した新生児網膜における増強されたＥＣ増殖を示す（ｈ）。ｅ，固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化は、ＨＵＶＥＣ増殖を抑制した。ｆ，抗ＶＥＧＦ抗体は、ＤＢＺの存在下または不在下に、ＨＵＶＥＣ発芽を抑制した。ｇ，ＮｏｔｃｈによるＶＥＧＦＲ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７ｄ）における抗ＤＬＬ４抗体、またはＤＢＺ（左）によるＮｏｔｃｈ遮断、あるいは、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４（右）によるＮｏｔｃｈ活性化に反応する、ＶＥＧＦＲ２発現の定量的ＰＣＲ分析。抗ＤＬＬ４抗体およびＤＢＺは、それぞれ、５μｇ／ｍｌおよび０．０８μＭで用いた（ａ－ｃ、ｅ－ｇ）。
【図８Ａ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢

印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｂ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｃ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図８Ｄ】ＤＬＬ４－仲介性Ｎｏｔｃｈシグナル伝達はＥＣ分化を制御した。フィブリンゲル中で成長するＨＵＶＥＣによって形成される腔様構造（白矢印）は、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺの存在下に消失した。代わりに、新芽が、細胞で高密度に詰められる（黒矢印）。ｂ，ＮｏｔｃｈによるＴＧＦβ２の制御。ＨＵＶＥＣの３－Ｄフィブリンゲル培養（７日）における、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＢＺによるＮｏｔｃｈ遮断（左）、または、ＨＵＶＥＣの２－Ｄ培養（３６時間）における、固定ＤＬＬ４によるＮｏｔｃｈ活性化（右）に対するＴＧＦβ２発現の定量的ＰＣＲ分析。ｃ，抗ＤＤＬ４抗体は、動脈の発達を阻止する。アルファ平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）およびイソレクチンで染色した、新生児マウス網膜の共焦点画像。新生児マウスは、図１ｄに記載するように処理した。ｄ，ＡＳＭＡおよびイソレクチンで染色した、成獣マウス網膜の共焦点画像。８週齢のマウスを、ＰＢＳまたは抗ＤＬＬ４抗体（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回）によって２週間処理した。

【図９Ａ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｂ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｃ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｄ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｅ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｆ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｇ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片に

おける抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｈ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｉ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｊ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｋ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｌ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｍ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、

腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｎ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｏ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図９Ｐ】ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦの選択的遮断は、腫瘍の血管形成を中絶し、腫瘍増殖を抑制する。ａ－ｆ，腫瘍モデル：ＨＭ７（ａ）、Ｃｏｌｏ２０５（ｂ）、Ｃａｌｕ６（ｃ）、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５（ｄ）、ＭＶ－５２２（ｅ）、およびＷＥＨＩ３（ｆ）の結果。平均腫瘍体積が、ＳＥと共に示される。ｇ－ｈ，腫瘍血管の組織学的実験。コントロール、抗ＤＬＬ４抗体、および抗ＶＥＧＦ処理マウスから得たＥＬ４腫瘍切片における抗ＣＤ３１の免疫組織化学（ｇ）。ＥＬ４腫瘍切片におけるレクチン還流および抗ＣＤ３１染色（ｈ）。ｉ－ｐ．腫瘍モデルＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１（ｉ），ＬＬ２（ｊ），ＥＬ４（ｋ），Ｈ１２９９（ｌ），ＳＫＭＥＳ－１（ｍ），ＭＸ－１（ｎ），ＳＷ６２０（ｏ），およびＬＳ１７４Ｔ（ｐ）の結果である。

【図１０Ａ】マウス小腸のホメオスタシスにおいて、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である。コントロール（ａ，ｄ，ｇ，ｊ）、抗ＤＬＬ４抗体処理（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、６週間）（ｂ，ｅ，ｈ，ｋ）、およびＤＢＺ処理（３０μモル／ｋｇ、毎日、５日間）（ｃ，ｆ，ｉ，ｌ）マウスから得られた小腸の免疫組織化学的実験。Ｈ＆Ｅ（ａ，ｂ，ｃ）、およびアルシアンブルー染色（ｄ，ｅ，ｆ）に示されるように、ＤＢＺは、ＴＡ集団の、杯細胞による置換を引き起こした。この変化は、抗ＤＬＬ４抗体処理ではまったく見られなかった。Ｋｉ６７（ｇ，ｈ，ｉ）およびＨＥＳ－１（ｊ，ｋ，ｌ）染色は、抗ＤＬＬ４抗体が、ＤＢＺの作用を模倣しないことをさらに確認した。

【図１０Ｂ】マウス小腸のホメオスタシスにおいて、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である。コントロール（ａ，ｄ，ｇ，ｊ）、抗ＤＬＬ４抗体処理（１０ｍｇ／ｋｇ、週２回、６週間）（ｂ，ｅ，ｈ，ｋ）、およびＤＢＺ処理（３０μモル／ｋｇ、毎日、５日間）（ｃ，ｆ，ｉ，ｌ）マウスから得られた小腸の免疫組織化学的実験。Ｈ＆Ｅ（ａ，ｂ，ｃ）、およびアルシアンブルー染色（ｄ，ｅ，ｆ）に示されるように、ＤＢＺは、ＴＡ集団の、杯細胞による置換を引き起こした。この変化は、抗ＤＬＬ４抗体処理ではまったく見られなかった。Ｋｉ６７（ｇ，ｈ，ｉ）およびＨＥＳ－１（ｊ，ｋ，ｌ）染色は、抗ＤＬ

Ｌ４抗体が、ＤＢＺの作用を模倣しないことをさらに確認した。
【図１１Ａ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。
【図１１Ｂ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗Ｄ

ＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｃ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｄ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全

長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１１Ｅ】抗ＤＬＬ４抗体の特徴。ａ，抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング。Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異体の模式図。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４抗体（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。ｂ－ｄ，表示（１μｇ／ｍｌ）のように精製組み換えタンパクでコートした９６－ウェルのＮｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）プレートに対する、ＹＷ２６．８２の選択的結合。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（ｂ）。ベクター、完全長ＤＬＬ４、ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｃ）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４抗体は、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）（ｄ）。内因的に発現されたＤＬＬ４に対するＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４－特異的ｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ分析。ＹＷ２６．８２は２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた（ｅ）。

【図１２】Ｎｏｔｃｈ活性化によるＤＬＬ４の上方調整。ＤＢＺ（０．０８μＭ）の非存在下、または存在下に、Ｃ－末端固定Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）によってＨＵＶＥＣを刺激した。刺激３６時間後、内因性ＤＬＬ４発現を、抗ＤＬＬ４抗体によるＦＡＣＳ分析によって調べた。

【発明を実施するための形態】
【００８８】
本発明は、本明細書において、ＤＬＬ４発現および／または活性、例えば、発現および／または活性の上昇、または、有害な発現および／または活性と関連する病的状態の、例えば、処置または予防に有用な抗ＤＬＬ４抗体を提供する。ある実施態様では、本発明の抗体は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置するために使用される。ある実施態様では、本発明の抗体は、血管形成に関連する病的状態を処置するために使用される。
【００８９】
別局面では、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、ＤＬＬ４の検出および／または単離、例えば、各種組織および細胞型におけるＤＬＬ４の検出用の試薬として有用性を見出す。
【００９０】
本発明はさらに、抗ＤＬＬ４抗体、および、抗ＤＬＬ４抗体をコードするポリヌクレオチドの作製法を提供する。
一般的技術
本明細書に記載されるか、または参照される技術および処置は、広く十分に理解されていて、当業者によって通例法にしたがって一般的に採用されるもので、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ３ｒｄ．ｅｄｔｉｏｎ（２００１）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．（２００３））；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．（１９９５）），Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．（１９８８）ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，ａｎｄ ＡＮＩＭＡＬ ＣＥＬＬ ＣＵＬＴＵＲＥ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．（１９８７））に記載される、広く利用される方法である。
定義
「単離」抗体とは、特定され、その天然の環境の成分から分離および／または回収された抗体である。その天然環境の汚染成分とは、該抗体の診断的または治療的使用を妨げると考えられる物質であって、酵素、ホルモン、およびその他の、タンパク様または非タンパク様溶質を含んでもよい。好ましい実施態様では、抗体は、（１）Ｌｏｗｒｙ法で定量した場合、抗体重量の９５％を超えるレベルまで精製され、そして最も好ましくは重量の９９％を超えるレベルまで精製されるか、（２）スピンカップ分離器によってＮ－末端、または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を獲得するのに十分な程度にまで精製されるか、または（３）Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ（商標）ブルー、または好ましくは銀染色使用の還元的、または非還元的状態におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均一とされるまで精製される。単離抗体は、組み換え細胞内のインシトゥー状態の抗体を含む。なぜなら、抗体の天然環境の少なくとも一成分は存在しないからである。同様に、単離抗体は、組み換え細胞周囲の媒体における抗体を含む。しかしながら、通常、単離抗体は、少なくとも一つの精製ステップによって調製される。
【００９１】
「単離」核酸分子とは、特定されて、該抗体核酸の天然供給源において通常関連する、少なくとも一つの汚染性核酸分子から分離される核酸分子である。単離核酸分子は、それが天然で見出される形状または背景とは異なる。したがって、単離核酸は、それが天然細胞において存在するときの核酸分子とは区別される。しかしながら、単離核酸分子は、通常抗体を発現する、細胞内に含まれる核酸分子、例えば、天然細胞のものとは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【００９２】
「Ｋａｂａｔと同様の、可変ドメインの番号付け」、または「Ｋａｂａｔと同様の、アミノ酸位置の番号付け」という用語、およびその変異種は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）による抗体編集において、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのために使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の直線的アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲの短縮、または挿入に対応して、より少ない、または余分なアミノ酸を含んでもよい。例えば、重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後に、単一のアミノ酸挿入（Ｋａｂａｔによれば５２ａ）、および、重鎖ＦＲ残基８２の後に、複数の挿入残基（Ｋａｂａｔによれば８２ａ、８２ｂ、および８２ｃ）を含んでもよい。残基に関するＫａｂａｔ番号付けは、任意の抗体について、該抗体配列の、整列によるＫａｂａｔの「標準的」番号付け配列との相同領域において決定されてもよい。
【００９３】
本明細書で用いる、「事実上同様の」、または「事実上同じ」という語句は、二つの数値（一般的には、一方は本発明の抗体に関連し、他方は、参照／比較抗体に関連する）の間の近似が十分に高度であって、当業者であれば、この二つの数値間の差は、前記数値（例えば、Ｋｄ値）によって測定される生物学的特徴の背景において、ほとんど、または、全く生物学的および／または統計学的に有意ではないと見なすと考えられる程度のものであることを示す。前記二つの数値間の差は、参照／比較抗体の数値の関数として、好ましくは約５０％未満、好ましくは約４０％未満、好ましくは約３０％未満、好ましくは約２０％未満、好ましくは約１０％未満である。
【００９４】
「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位、および、その結合パートナー（例えば、抗原）の間の、非共有的相互作用の加算合計強度を指す。別様に指示しない限り、本明細書で用いる「結合親和性」とは、結合ペア（例えば、抗体および抗原）のメンバー同士の間における１：１相互作用を反映する、内在的結合親和性を指す。そのパートナーＹに対する、分子Ｘの親和性は、一般に、解離定数（Ｋｄ）によって表される。親和性は、当該分野で既知の一般的方法、例えば、本明細書に記載される方法によって測定することが可能である。低親和性抗体は、一般に、抗原への結合が遅く、速やかに解離する傾向を持つが、一方、高親和性抗体は、一般に、抗原に対しより速やかに結合し、より長く結合状態に留まる傾向を持つ。結合親和性を測定するには、種々の方法が知られるが、その内のいずれのものも、本発明の目的のために使用が可能である。特異的例示実施態様が下記に記載される。
【００９５】
一実施態様では、本発明による“Ｋｄ”または「Ｋｄ値」は、下記のアッセイによって記載されるように、対象抗体のＦａｂ形と、その抗原によって実行される、放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される。アッセイは、一連の規定濃度の未標識抗原の存在下に、最小濃度の（^{125}Ｉ）標識抗原とＦａｂを平衡させ、次いで、抗Ｆａｂ抗体塗布プレートによって結合抗原を捕捉することによって、Ｆａｂの、溶液結合親和性を測定する（Ｃｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９３：８６５－８８１）。このアッセイのための条件を定めるため、マイクロタイタープレート（Ｄｙｎｅｘ）に、５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）に溶解した、捕捉性の抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ）５μｇ／ｍｌを塗布し、一晩置き、次いで、ＰＢＳに溶解した２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン、室温（約２３℃）、２～５時間によってブロックした。非吸着性プレート（Ｎｕｎｃ ＃２６９６２０）では、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を、対象Ｆａｂの連続希釈液と混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４５９３－４５９９におけ

る抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ－１２の評価と一致して）。次に、この対象Ｆａｂを一晩インキュベートする。一方、インキュベーションは、平衡の達成を確保するために、さらに長期間（例えば、６５時間）続けてもよい。その後、この混合物を、捕捉プレートに移し、室温でインキュベートする（例えば、１時間）。次に、溶液を除き、プレートを、ＰＢＳに溶解した０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０で８回洗浄する。プレートを乾燥後、１５０μｌ／ウェルのシンチレーション試薬（ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ（商標）－２０；Ｐａｃｋａｒｄ）を加え、プレートを、ＴｏｐＣｏｕｎｔガンマカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ）において１０分間カウントする。最大結合の２０％以下を示す各Ｆａｂの濃度を、競合結合アッセイに用いるために選ぶ。別の実施態様では、ＢＩＡｃｏｒｃ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用い表面プラズモン共鳴によって、ＫｄまたはＫｄ値を、２５℃で、固定抗原ＣＭ５チップについて～１０反応単位（ＲＵ）として測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示にしたがって、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を、１０ｍＭの酢酸ナトリウムｐＨ４．８で希釈し５μｇ／ｍｌ（～０．２μＭ）とし、次いで、５μｌ／分の流速で注入し、約１０反応単位（ＲＵ）の結合タンパクを実現する。抗原注入後、１Ｍエタノールアミンを注入して、無反応基をブロックする。反応速度測定のために、Ｆａｂの２倍連続希釈（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳ溶液として、約２５μｌ／分の流速で、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０（ＰＢＳＴ）と共に、２５℃で注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、会合および解離センサーグラムを同時適合させることによって、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計算する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、k_{off}/k_{on}として計算する。例えば、Ｃｈｅｎ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９３：８６５－８８１を参照されたい。上の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を超えた場合、オン速度は、蛍光消光法を用いて定量することが可能である。この方法は、漸増濃度の抗原の存在下に、２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形）のＰＢＳ液（ｐＨ７．２）の、分光光度計、例えばフロー停止器装備分光光度計（Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、または、攪拌赤色キュベット付き８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定される、２５℃における蛍光発射強度（励起＝２９５ｎｍ；発射＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域幅）の増減を測定する。

【００９６】

本発明による「オン速度」または「会合速度」、または「会合速度」または“k_{on}”は、さらに、固定抗原ＣＭ５チップ、～１０反応単位（ＲＵ）について、２５℃でＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００、またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、上記と同じ表面プラズモン共鳴法によって定量することが可能である。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示にしたがって、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を、１０ｍＭの酢酸ナトリウムｐＨ４．８で希釈し５μｇ／ｍｌ（～０．２μＭ）とし、次いで、５ｕｌ／分の流速で注入し、約１０反応単位（ＲＵ）の結合タンパクを実現する。抗原注入後、１Ｍエタノールアミンを注入して、無反応基をブロックする。反応速度測定のために、Ｆａｂの２倍連続希釈（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳ溶液として、約２５μｌ／分の流速で、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０（ＰＢＳＴ）と共に、２５℃で注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、会合および解離センサーグラムを同時適合させることによって、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計

算する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、ｋｏｆｆ／ｋｏｎとして計算する。例えば、Ｃｈｅｎ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３：８６５－８８１を参照されたい。しかしながら、上の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が１０^{6}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$を超えた場合、オン速度は、蛍光消光法を用いて定量することが好ましい。この方法は、漸増濃度の抗原の存在下に、２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形）のＰＢＳ液（ｐＨ７．２）の、分光光度計、例えばフロー停止器装備分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、または、攪拌赤色キュベット付き８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定した、２５℃における蛍光発射強度（励起＝２９５ｎｍ；発射＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域幅）の増減を測定する。

【００９７】

本明細書で用いる「ベクター」という用語は、それが連結される別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指すことが意図される。ベクターの一型は、「プラスミド」である。これは、さらに別のＤＮＡセグメントを連結させることが可能な、環状の、２本鎖ＤＮＡループを指す。もう一型のベクターは、ファージベクターである。もう一型のベクターは、ウィルスベクターである。このベクターでは、添加ＤＮＡセグメントは、ウィルスゲノムの中に連結される。あるベクターは、導入された宿主細胞において自律複製することが可能である（例えば、細菌性複製起源を持つ細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入と同時に宿主細胞のゲノムの中に組み込まれ、そのため、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、あるベクターは、それらが動作可能的に連結される遺伝子の発現を指令することが可能である。このようなベクターは、本明細書では、「組み換え発現ベクター」（または、単純に「組み換えベクター」）と呼ばれる。一般に、組み換えＤＮＡ法に有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形を取る。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、時に、相互交換的に使用される。なぜなら、プラスミドは、もっとも普通に使用されるベクター形だからである。

【００９８】

本明細書で相互交換的に使用される、「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さの、ヌクレオチドポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオシキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および／またはその類縁体、または、ＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼによって、または合成反応によって、ポリマーの中に組み込むことが可能な任意の基質であってもよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびその類縁体を含んでもよい。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合、該ポリマーの重合の前または後に付与してもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後、例えば、ラベルとの結合などによってさらに修飾されてもよい。他の種類の修飾としては、例えば、「キャップ」、一つ以上の天然ヌクレオチドの、類縁体による置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルフォスフォネート、フォスフォトリエステル、フォスフォアミデート、カルバミン酸塩など）による修飾、および、荷電結合（例えば、フォスフォロチオエート、フォスフォロジチオエートなど）による修飾、側基、例えば、タンパク（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リシンなど）を含むもの、介在因子（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を有するもの、キレート剤を含むもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属など）、アルキル化剤を含むもの、修飾結合を含むもの（アルファアノマー核酸など）が、未修飾形ポリヌクレオチドと並んで、挙げられる。さらに、糖類に通常存在するヒドロキシル基のいずれのものも、例えば、フォスフォン酸基、リン酸基によって置換されてもよいし、標準的保護基によって保護されてもよいし、または、追加のヌクレオチドとのさらに新たな結合のために活性化されてもよいし、または、固相、または半固相支持体に結合されてもよい。５′および３′末端ＯＨは、リン酸化されるか、または、アミン、または、１から２０個の炭素原子を有する、有機キャップ基

によって置換されてもよい。他のヒドロキシル基も、誘導体形成して標準的保護基とされてもよい。ポリヌクレオチドはさらに、当該分野で一般的に知られる、リボースまたはデオキシリボース糖の類縁体、例えば、２′－Ｏ－メチル－、２′－Ｏ－アリル、２′－フルオロ－、または２′－アジド－リボース、炭素環糖類縁体、アルファーアノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類縁体、および、メチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシド類縁体を含むことが可能である。一つ以上のフォスフォジエステル結合が、別の結合基によって置換されてもよい。そのような別様結合基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、リン酸塩が、Ｐ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、（Ｏ）NR_2（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ′、ＣＯ、またはCH_2（「フォルムアセタール」）によって置換される実施態様が挙げられる。なお、前式において、ＲまたはＲ′は、独立に、Ｈ、または、任意にエーテル（－Ｏ－）結合、アリール、アルケニル、シクロアルケニル、またはアラルジルを含む、置換または未置換アルキル（１－２０Ｃ）である。ポリヌクレオチドにおける、必ずしも全ての結合が同じである必要はない。上の記述は、ＲＮＡおよびＤＮＡを含む、本明細書で参照する全てのポリヌクレオチドに適用される。

【００９９】

本明細書で用いる「オリゴヌクレオチド」は、一般に、ただし必ずしもそうとは限らないが、長さが約２００ヌクレオチド長の、一般に短い、一般に一本鎖の、一般に合成ポリヌクレオチドを指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、互いに排除的ではない。ポリヌクレオチドに関する上の記述は、等しく、完全に、オリゴヌクレオチドにも適用が可能である。

【０１００】

ペプチドまたはポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」とは、候補配列と、特定のペプチドまたはポリペプチド配列とを整列させ、要すれば、最大の配列同一性パーセントを達成するようギャップを導入した後、かつ、保存的置換を配列同一性の一部と考慮しないで得られた、特定ペプチドまたはポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である、候補配列のアミノ酸残基のパーセントと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを求めるための整列は、従来技術の能力の範囲内の種々の方法で、例えば、一般に入手が可能なコンピュータソフトウェア、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭｇＡｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて実現することが可能である。当業者であれば、比較される配列同士の全長に亘って最大整列を実現するのに必要な、いずれかのアルゴリスムを含め、整列を測定するための適切なパラメータを決定することが可能である。しかしながら、本発明の目的のためには、アミノ酸配列同一性パーセント値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．が著作権を有し、ソースコードは、ユーザー文書と共に、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ Ｏｆｆｉｃｅ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．，２０５５９に寄託され、米国著作権登録番号第ＴＸＵ５１００８７号の下に登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａによって一般に市販されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムはＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標） Ｖ４．０Ｄでの使用のために作られている。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定されており、変動しない。

【０１０１】

アミノ酸配列比較のためにＡＬＩＧＮ－２が用いられる場合、任意のアミノ酸配列Ｂとの、に関する、または、に対する、任意のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（これは、別に、任意のアミノ酸配列Ｂと、に関し、または、に対し、あるアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む、任意のアミノ酸配列Ａと表現することも可能である）は、下記のように計算される：

１００掛ける・分数Ｘ／Ｙ

上式において、Ｘは、ＡおよびＢのプログラム整列において、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって同一マッチと評価されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さが、アミノ酸配列Ｂの長さに等しくない場合、Ｂに対するＡのアミノ酸配列同一性％は、Ａに対するＢのアミノ酸配列同一性％と等しくならないことが理解されよう。

【０１０２】

別様に指示しない限り、本明細書で用いるアミノ酸配列同一性％値は、全て、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを用いて、先の段落で記述したようにして得られたものである。

【０１０３】

本明細書で用いる“ＤＬＬ４”（相互交換的に「デルタ様４」とも呼ばれる）という用語は、特記または文脈から別様に指示されない限り、任意の天然の、または変異（天然であると、合成であるとを問わず）ＤＬＬ４ペプチドを指す。「天然配列」という用語は、天然の短縮形または分泌形（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然の変異形（例えば、選択的スプライス形）、および天然の対立遺伝子変異形を特異的に包含する。「野生型ＤＬＬ４」という用語は、一般に、天然ＤＬＬ４タンパクのアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「野生型ＤＬＬ４配列」という用語は、一般に、天然のＤＬＬ４に見られるアミノ酸配列を指す。

【０１０４】

本明細書で用いる「Ｎｏｔｃｈ受容体」（相互交換的に“Ｎｏｔｃｈ”とも呼ばれる）という用語は、特記または文脈から別様に指示されない限り、任意の、天然または変異（天然であると、合成であるとを問わず）Ｎｏｔｃｈ受容体ポリペプチドを指す。ヒトは、四つのＮｏｔｃｈ受容体（Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、およびＮｏｔｃｈ４）を有する。「天然配列」という用語は、天然の短縮形または分泌形（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然の変異形（例えば、選択的スプライス形）、および天然の対立遺伝子変異形を特異的に包含する。「野生型Ｎｏｔｃｈ受容体」という用語は、一般に、天然Ｎｏｔｃｈ受容体タンパクのアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「野生型Ｎｏｔｃｈ受容体配列」という用語は、一般に、天然のＮｏｔｃｈ受容体に見られるアミノ酸配列を指す。

【０１０５】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、もっとも広い意味で相互交換的に用いられ、モノクローナル抗体（例えば、完全長または完全なモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異的抗体（例えば、所望の生物活性を示す限りにおいて、二重特異的抗体）を含み、さらに、（本明細書においてさらに詳細に記述されるように）いくつかの抗体断片を含んでもよい。抗体は、ヒトのもの、ヒト化、および／または親和性熟成されたものであってもよい。

【０１０６】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分の配列が、抗体間で大きく異なり、それが、各特定の抗体において、その特定の抗原に対する結合および特異性に使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインを通じて均一には分布していない。可変性は、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方に見られる、相補性決定領域（ＣＤＲ）、または超可変領域（ＨＶＲ）と呼ばれる、三つのセグメントに集中する。可変ドメインの比較的高度に保存される領域を、骨組構造（ＦＲ）と呼ぶ。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、三つのＣＤＲによって接続される、大部分βシート構造を採用する、四つのＦＲ領域を含む。ＣＤＲは、このβシート構造を接続し、ある場合には、その一部となるループを形成する。各鎖のＣＤＲは、ＦＲ領域によって近接して一緒に保持され、他の鎖のＣＤＲと共に、抗体の抗原結合部位の形成に貢献する（Ｋａｂａ

ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１）を参照）。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接には関与しないが、各種エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与を示す。

【０１０７】

抗体をパパイン消化することによって、それぞれが単一抗原結合部位を有する“Ｆａｂ”断片と呼ばれる、二つの、同じ抗原結合断片、および、残余の“Ｆｃ”断片が得られる。後者の名前は、それが容易に結晶化することができる、その能力を反映する。ペプシン処理によって、二つの抗原結合部位を有し、かつ、依然として抗原に架橋結合することが可能な、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片が得られる。

【０１０８】

“Ｆｖ”とは、完全な抗原認識および結合部位を含む、抗体の最小断片である。２本鎖Ｆｖ分子では、この領域は、緊密な、非共有的連結で結ばれた、１本の重鎖および１本の軽鎖の可変ドメインのダイマーから成る。単一鎖Ｆｖ分子では、１本の重鎖および１本の軽鎖可変ドメインが、屈曲性ペプチドリンカーによって共有的に連結され、そのため、軽鎖および重鎖は、２本鎖Ｆｖ分子のものと同様の「ダイマー」構造として連結することが可能である。各可変ドメインの、三つのＣＤＲが相互作用を持ち、このＶＨ－ＶＬダイマーの表面に抗原結合部位を定めるのは、この形態においてである。以上まとめると、６つのＣＤＲが抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一可変ドメイン（または、抗原に対して特異的な、僅か三つのＣＤＲしか含まない、Ｆｖの半分）であっても、全体結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を持つ。

【０１０９】

Ｆａｂ断片はさらに、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第１定常ドメイン（ＣＨ１）を持つ。Ｆａｂ′断片は、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端において数個の残基を余分に持つことによって、Ｆａｂ断片とは異なる。この残基は、抗体のヒンジ領域の１個以上のシステインを含む。定常ドメインのシステイン残基（単数または複数）が、遊離チオール基を担持するＦａｂ′を、本明細書ではＦａｂ′－ＳＨと表示する。Ｆ（ａｂ′）$_2$抗体断片は、もともと、その間にヒンジ・システインを有する、Ｆａｂ′断片ペアとして生産された。抗体断片の、他の化学的結合も知られている。

【０１１０】

任意の脊椎動物種から得られた抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる、はっきりと異なる二つのタイプの内の一方に割り当てられる。

【０１１１】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てられる。免疫グロブリンには、大きく五つのクラスがある：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭで、これらの内のいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）に、例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$、ＩｇＧ$_4$、ＩｇＡ$_1$、およびＩｇＡ$_2$に分割することが可能である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する、重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンの、サブユニット構造および三次元形態も周知である。

【０１１２】

「抗体断片」は、完全な抗体の一部しか含まないが、その一部は、それが完全な抗体に存在する場合、その部分と通常関連する機能の内の少なくとも一つ、好ましくは大部分または全てを保持することが好ましい。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ′、Ｆ（ａｂ′）２、およびＦｖ断片；ダイアボディー；線状抗体；単一鎖抗体分子；および、抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原結合能を保持する。別の実施態様では、抗体断片、例えば、Ｆｃ領域を含む断片は、それが完全な抗体に存在する場合Ｆｃ領域と通

常関連する生物機能、例えば、ＦｃＲｎ結合、抗体半減期修飾、ＡＤＣＣ機能、および補体結合の内の少なくとも一つを保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と事実上同様のインビボ半減期を有する、一価抗体である。例えば、そのような抗体断片は、該断片にインビボ安定性を付与することが可能なＦｃ配列と連結する、抗原結合アームを含んでもよい。

【０１１３】

本明細書で用いる「超可変領域」、“ＨＶＲ，”または“ＨＶ”という用語は、配列において超可変的で、および／または、構造的に定められたループを形成する、抗体の可変ドメインを指す。一般に、抗体は、六つの超可変領域：ＶＨに三つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、およびＶＬに三つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。いくつかの超可変領域区画が用いられており、本明細書にも包含される。Ｋａｂａｔ相補性決定領域（ＣＤＲ）は、配列可変性に基づき、もっとも広く用いられている（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１））。Ｃｈｏｔｈｉａは、代わりに、構造的ループの位置を参照する（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））。ＡｂＭ超可変領域は、ＫａｂａｔのＣＤＲと、Ｃｈｏｔｈｉａの構造ループの間の妥協の産物であり、Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＡｂＭ抗体モデル化ソフトウェアによって使用される。「接触」超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらの超可変領域それぞれの残基を下記に掲げる。

【０１１４】

【化３】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
（Ｋａｂａｔ番号付け）				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
（Ｃｈｏｔｈｉａ番号付け）				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

超可変領域は、下記のように「延長型超可変領域」を含んでもよい：ＶＬでは、２４－３６または２４－３４（Ｌ１）、４６－５６または５０－５６（Ｌ２）、および８９－９７（Ｌ３）、および、ＶＨでは、２６－３５（Ｈ１）、５０－６５または４９－６５（Ｈ２）、および９３－１０２、９４－１０２、または９５－１０２（Ｈ３）。可変ドメインの残基は、これらの定義のそれぞれについて、上記のＫａｂａｔらにしたがって番号付けされる。

【０１１５】

「骨組構造」または“ＦＲ”残基は、本明細書で定義される超可変領域以外の、可変ドメイン残基である。

【０１１６】

本明細書で用いる「モノクローナル抗体」という用語は、事実上均一な抗体集団から得られる抗体、すなわち、集団を構成する個々の抗体が同一であるか、および／または、同

じエピトープ（単数または複数）に結合する抗体を指す。ただし、モノクローナル抗体の生産時に生じる可能性のある変異種は除く。このような変異種は、一般に、少量ながら存在するものである。このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体であり、複数のポリペプチド配列の中から、単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって獲得される。例えば、選択プロセスは、複数のクローン、例えば、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組み換えＤＮＡクローンのプールから、一意のクローンの選択を含んでもよい。選ばれた標的結合配列は、例えば、標的に対する親和性をさらに上げるために、標的結合配列をヒト化するため、多重特異的抗体を創出するためなどのために変えられてもよいこと、および、この標的結合配列を変えられた抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることを理解しなければならない。通常、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製品と違って、モノクローナル抗体調製品の、各モノクローナル抗体は、ある抗原の、ある単一決定基のみを指向する。その特異性の外に、モノクローナル抗体調製品は、通常、他の免疫グロブリンによって汚染されないという利点を有する。「モノクローナル」という修飾語は、抗体が、事実上均一な抗体集団から得られたものであることを示すものであって、その抗体が、何かの特定の方法によって生産されることを要求するものと考えてはならない。例えば、本発明にしたがって使用されるモノクローナル抗体は、種々の技術、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３－６８１，(Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８１)を参照）、組み換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号明細書を参照）、ファージディスプレイ技術（例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）；Ｓｉｄｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３８（２）：２９９－３１０（２００４）；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４０（５）：１０７３－１０９３（２００４）；Ｆｅｌｌｏｕｓｅ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０１（３４）：１２４６７－１２４７２（２００４）；および、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８４（１－２）：１１９－１３２（２００４）、および、ヒトの免疫グロブリン配列をコードする、ヒト免疫グロブリン座位または遺伝子の一部、または全てを有する動物において、ヒト、またはヒト様抗体を生産するための技術（例えば、国際公開第１９９８／２４８９３号パンフレット；国際公開第１９９６／３４０９６号パンフレット；国際公開第１９９６／３３７３５号パンフレット；国際公開第１９９１／１０７４１号パンフレット；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏ．，７：３３（１９９３）；米国特許第５，５４５，８０６号明細書；同第５，５６９，８２５号明細書；同第５，５９１，６６９号明細書（全て、ＧｅｎＰｈａｒｍ）；同第５，５４５，８０７号明細書；国際公開第１９９７／１７８５２号パンフレット；米国特許第５，５４５，８０７号明細書；同第５，５４５，８０６号明細書；同第５，５６９，８２５号明細書；同第５，６２５，１２６号明細書；同第５，６３３，４２５号明細書；および同第５，６６１，０１６号号明細書；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）；Ｌｏｎｇｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６８：８５６－８５９（１９９４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ，３６８：８１２－８１３（１９９４）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４：８４５－８５１（１９９６）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ

，１４：８２６（１９９６）；および、Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３：６５－９３（１９９５）によって作製されてもよい。

【０１１７】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、最小の、非ヒト免疫グロブリン由来配列を含む、キメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、非ヒト動物種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギ、または、非ヒト霊長類の超可変領域によって置換されるヒト免疫グロブリンである。ある場合、ヒト免疫グロブリンの骨組構造領域（ＦＲ）の残基は、対応する、非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体、またはドナー抗体にも認められない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つの、通常は、二つの可変ドメインの事実上全てを含み、該可変ドメインにおいて、超可変ループの全て、または事実上全ては、非ヒト免疫グロブリンに対応し、ＦＲの全て、または事実上全ては、ヒトの免疫グロブリン配列である。さらに、ヒト化抗体は、免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を任意に含む。これ以上の詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９（１９８８）；および、Ｐｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照されたい。さらに、下記の総説、およびその中に引用される文献を参照されたい：Ｖａｓｗａｎｉ ａｎｄ Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ａｎｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ，Ａｓｔｈｍａ ＆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１：１０５－１１５（１９８８）；Ｈａｒｒｉｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ ２３：１０３５－１０３８（１９９５）；Ｈｕｒｌｅ ａｎｄ Ｇｒｏｓｓ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：４２８－４３３（１９９４）。

【０１１８】

「キメラ」抗体（免疫グロブリン）は、ある特定動物種由来の抗体、またはある特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一、または相同の重鎖および／または軽鎖の一部を有するが、一方、鎖（単数または複数）の残余部分は、それらが所望の生物活性を呈する限り、別の動物種由来の抗体、または、別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、および、そのような抗体の断片と同一か、または相同である（米国特許第４，８１６，５６７号明細書、およびＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１:６８５１－６８５５（１９８４））。本明細書で用いるヒト化抗体は、キメラ抗体のサブセットである。

【０１１９】

「単一鎖Ｆｖ」または“ｓｃＦｖ”抗体断片は、単一ポリペプチド鎖として存在する、抗体のＶＨおよびＶＬドメインを含む。一般に、ｓｃＦｖポリペプチドはさらに、該ｓｃＦｖポリペプチドが、抗原結合のために所望の構造を形成することが可能となるように、ＶＨおよびＶＬドメインの間にポリペプチドリンカーを含む。ｓｃＦｖに関する総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照されたい。

【０１２０】

「抗原」とは、ある抗体が選択的に結合することが可能な、指定の抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、またはその他の、天然または合成化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが好ましい。

【０１２１】

「ダイアボディ」という用語は、二つの抗原結合部位を有する、小型の抗体断片であって、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）において軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続する重

鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む抗体断片を指す。同じ鎖の二つのドメインの対合を不可能とするほど短いリンカーを用いると、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合することを強制され、二つの抗原結合部位を創出する。ダイアボディーについては、例えば、欧州特許第４０４，０９７号明細書；国際公開第９３／１１１６１号パンフレット；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０:６４４４－６４４８（１９９３）により詳細に記載される。

【０１２２】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体、および／または、本明細書に開示されるヒト抗体の作製技術の内のいずれかを用いて作製される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体に関するこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に排除する。

【０１２３】

「親和性熟成」抗体とは、その、一つ以上のＣＤＲに、一つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更（単数または複数）を持たない親抗体と比べて、抗原に対する該抗体の親和性に向上がもたらされる抗体である。好ましい親和性熟成抗体は、標的抗原に対し、ナノモル、場合によってはピコモルの親和性を有する。親和性熟成抗体は、当該分野で既知の手順によって生産される。Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９－７８３（１９９２）は、ＶＨおよびＶＬドメインシャフリングによる親和性熟成を記載する。ＣＤＲおよび／または骨組構造残基のランダムな突然変異誘発が、Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３８０９－３８１３（１９９４）；Ｓｃｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ １６９：１４７－１５５（１９９５）；Ｙｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：１９９４－２００４（１９９５）；Ｊａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４（７）：３３１０－９（１９９５）；および、Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６：８８９－８９６（１９９２）に記載される。

【０１２４】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然のＦｃ領域配列、または、Ｆｃ領域アミノ酸配列変異種）による生物活性を指し、抗体アイソタイプに応じて変動する。抗体エフェクター機能の例としては：Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害性；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞介在細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方調整；およびＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１２５】

「抗体依存性細胞介在細胞傷害作用」または「ＡＤＣＣ」とは、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するＦｃ受容体（ＦｃＲ）に結合した分泌ＩｇＧは、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原担持標的細胞に対して特異的に結合し、次いで、該標的細胞を細胞毒素によって殺すことを可能とする、細胞傷害性の一形態である。抗体は、これらの細胞傷害性細胞を「武装」させるので、この殺作用には必須である。ＡＤＣＣを仲介する一次細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩしか発現しないが、一方、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞におけるＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２（１９９１）の４６４ページの表３にまとめられる。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するためには、インビトロＡＤＣＣアッセイ、例えば、米国特許第５，５００，３６２号明細書または同第５，８２１，３３７号明細書、または米国特許第６，７３７，０５６号明細書に記載されるアッセイを実行してもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、対象分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるものと同様の、動物モデルにおいて評価してもよい。

【０１２６】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一つ以上のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。この細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行することが好ましい。ＡＤＣＣを仲介するヒト白血球の例としては、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞傷害性Ｔ細胞、および好中球が挙げられるが、ＰＢＭＣおよびＮＫ細胞が好ましい。エフェクター細胞は、天然の供給源、例えば、血液から単離されてもよい。

【０１２７】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を記述する。好ましいＦｃＲは、ヒトＦｃＲの天然配列である。さらに、好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体に結合するもの（ガンマ受容体）で、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩサブクラスで、これらの受容体の、対立遺伝子変異種、および選択的スプライス形を含む受容体である。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性化受容体」）およびＦｃγＲＩＩＢ（「抑制受容体」）を含む。これらは、主に、その細胞原形質ドメインにおいて異なるだけの、近似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞原形質ドメインに、免疫受容体のチロシン主体活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含む。抑制受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞原形質ドメインに、免疫受容体のチロシン主体抑制モチーフ（ＩＴＩＭ）を含む（Ｄａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３－２３４（１９９７）による総説を参照）。ＦｃＲは、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５－３４（１９９４）；および、ｄｅ Ｈａａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１（１９９５）において総説されている。将来特定されるものも含めて、他のＦｃＲも、本明細書の、この用語“ＦｃＲ”によって包含される。本用語はさらに新生児受容体のＦｃＲであって、母親のＩｇＧの胎児への輸送を担当し（Ｇｕｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）、およびＫｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））、免疫グロブリンのホメオスターシスを調節する受容体を含む。国際公開第００／４２０７２号パンフレット（Ｐｒｅｓｔａ）は、ＦｃＲへの結合が向上、または低減させられた抗体変異種を記載する。この特許公報の内容を、特に指定して引用により本明細書に含める。さらに、Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい。

【０１２８】

ＦｃＲへの結合を測定する方法は既知である（例えば、Ｇｈｅｔｉｅ １９９７，Ｈｉｎｔｏｎ ２００４）。インビボにおけるヒトＦｃＲｎに対する結合、ヒトＦｃＲｎに対する高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウスにおいて、または、トランスフェクションしたヒト細胞系統において、または、Ｆｃ変異ポリペプチドを投与した霊長類において、定量することが可能である。

【０１２９】

「補体依存性細胞傷害性」、または“ＣＤＣ”とは、補体の存在下における標的細胞の分解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体システムの第１成分（Ｃ１ｑ）の、その認識抗原に結合した（適切なサブクラスの）抗体に対する結合によって起動される。補体の活性化を評価するためには、ＣＤＣアッセイ、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載されるものと同様のアッセイを実行してもよい。

【０１３０】

Ｆｃ領域のアミノ酸配列を変えられ、Ｃ１ｑ結合能が上昇、または下降させられたポリペプチド変異種が、米国特許第６，１９４，５５１Ｂ１号明細書、および国際公開第９９／５１６４２号パンフレットに記載される。これらの特許公開公報の内容を、特に指定して引用により本明細書に含める。さらに、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕ

ｎｏｌ．１６４:４１７８－４１８４（２０００）を参照されたい。
【０１３１】
「Ｆｃ領域含有ポリペプチド」という用語は、Ｆｃ領域を含む、抗体または免疫アドヘジン（下記の定義参照）などのポリペプチドを指す。Ｆｃ領域のＣ－末端リジン（ＥＵ番号付けシステムによると残基４４７）は、例えば、該ポリペプチドの精製時、または、該ポリペプチドをコードする核酸の組み換え加工によって除去してもよい。したがって、Ｆｃ領域を有するポリペプチドを含有する、本発明による組成物は、Ｋ４４７含有ポリペプチド、全Ｋ４４７除去ポリペプチド、または、Ｋ４４７含有、およびＫ４４７非含有ポリペプチドの混合物を含むことが可能である。
【０１３２】
「阻止性」抗体、または「拮抗」抗体とは、それが結合する抗原の生物活性を抑制するか、または低減する抗体である。好ましい阻止性抗体または拮抗抗体は、抗原の生物活性を、事実上または完全に抑制する。
【０１３３】
本明細書で用いる「作用抗体」とは、対象ポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。
【０１３４】
本発明の目的のための「ヒトアクセプター骨組構造」とは、ヒトの免疫グロブリン骨組構造、またはヒトの共通骨組構造から導かれる、ＶＬまたはＶＨ骨組構造のアミノ酸配列を含む骨組構造である。ヒト免疫グロブリン骨組構造、またはヒト共通骨組構造「から導かれる」ヒトアクセプター骨組構造は、それと同じアミノ酸配列を含んでもよいし、あるいは、それに先行するアミノ酸配列変化を含んでもよい。先行アミノ酸変化が存在する場合、先行アミノ酸変化は、好ましくは５個以下、好ましくは４個以下、または３個以下である。先行アミノ酸変化がＶＨに存在する場合、その変化は、位置７１Ｈ、７３Ｈ、および７８Ｈの内の三つ、二つ、または一つだけにあることが好ましい：例えば、これらの位置におけるアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔ、および／または７８Ａであってもよい。一実施態様では、ヒトのＶＬアクセプター骨組構造は、配列において、ヒトのＶＬ免疫グロブリン骨組配列、またはヒトの共通骨組構造配列と同じである。
【０１３５】
「ヒトの共通骨組構造」とは、ヒトの免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ骨組構造配列の選択において、もっとも普通に出現するアミノ酸残基を代表する骨組構造である。一般に、ヒトの免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループから行われる。一般に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔらの言うサブグループである。一実施態様では、ＶＬに関しては、サブグループは、Ｋａｂａｔらの言うように、サブグループカッパＩである。一実施態様では、ＶＨに関しては、サブグループは、Ｋａｂａｔらの言うように、サブグループＩＩＩである。
【０１３６】
「ＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造」は、Ｋａｂａｔらの重鎖可変領域サブグループＩＩＩのアミノ酸配列から得られる共通配列を含む。一実施態様では、ＶＨサブグループＩＩＩ共通骨組構造アミノ酸配列は、下記の配列：
【０１３７】
【化４】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (**配列番号** 42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (**配列番号** 43)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (**配列番号** 44)-H3-WGQGTLVTVSS (**配列番号** 45).

それぞれの少なくとも一部、または全てを含む。
【０１３８】
「ＶＬサブグループＩ共通骨組構造」は、Ｋａｂａｔらの軽鎖可変領域カッパサブグループＩのアミノ酸配列から得られる共通配列を含む。一実施態様では、ＶＨサブグループ

Ｉ共通骨組構造アミノ酸配列は、下記の配列：
【０１３９】
【化５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号 46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号 47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号 48)-L3-FGQGTKVEIK (配列番号 49).

それぞれの少なくとも一部、または全てを含む。
【０１４０】
「障害」または「疾患」とは、本発明の物質／分子、または方法による処置を施した場合、それによって利益を受けると予想される全ての状態である。これは、慢性および急性の障害または疾患であって、哺乳動物を、問題の障害に対して罹りやすくさせる病的状態を含む。本発明において処置される障害の非限定的例として、悪性および良性腫瘍；上皮癌、芽細胞腫、および肉腫を含む。
【０１４１】
「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖と関連する障害を指す。一実施態様では、細胞増殖性障害は癌である。
【０１４２】
本明細書で用いる「腫瘍」とは、悪性であると良性であるとを問わず、全ての、新生の細胞成長および増殖、および、全ての前癌および癌様細胞および組織を指す。「癌」、「癌様」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」は、本明細書において言及される場合、相互に排除的ではない。
【０１４３】
「癌」および「癌様」という用語は、通常、無統制な細胞成長／増殖によって特徴づけられる、哺乳動物における生理的状態を指すか、または記述する。癌の例として、例えば、ただしこれらに限定されないが、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このような癌のより詳細な例として、例えば、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、すい臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、メラノーマ、および、種々の頭部および頸部癌が挙げられる。無統制な血管形成は、本発明の組成物および方法によって処置することが可能な多くの障害を招く。それらの障害は、非新形成、および新形成病態の両方を含む。新形成物としては、例えば、前述のものが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。非新形成障害としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、不快な、または異常な過形成、関節炎、慢性関節リューマチ（ＲＡ）、乾癬、乾癬プラーク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、アテローム硬化プラーク、糖尿病性、およびその他の増殖性網膜症で、例えば、未熟児網膜症などの網膜症、水晶体後線維増殖、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新形成、移植角膜組織血管新形成、移植角膜組織の免疫拒絶反応、網膜／脈絡膜血管新形成、隅角血管新形成（ルベオーシス）、眼内血管新生病、血管再狭窄、動静脈変形（ＡＶＭ）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺過形成（グレーブズ病を含む）、角膜およびその他の組織の移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺傷害／ＡＲＤＳ、敗血症、一次肺高血圧、悪性肺滲出、脳浮腫（例えば、急性発作／閉塞性頭部傷害／外傷と関連する）、滑膜炎症、ＲＡにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、過栄養骨形成、骨関節炎（ＯＡ）、難治性腹水、多のう胞卵巣疾患、子宮内膜炎、流体疾患（すい臓炎、仕切り症候群、火傷、腸疾患）の第３間隔、子宮類線維腫、早産、ＩＢＤ（クローン病および潰瘍性結腸炎）などの慢性炎症、腎臓異種移植拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、不快な、または異常な組織塊の成長（非癌）、出血性関節、肥大瘢痕、毛髪成長抑制、オスラー－ウェーバー症候群、膿形成肉芽腫、水晶体後線維増殖、強皮症、トラコーマ、血

管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心内膜液滲出（心膜炎に関連するものなど）、および胸水滲出が挙げられる。

【０１４４】

本明細書で用いる「処置」とは、処置される個体または細胞の天然のコースを変えようとする試みとしての臨床的介入を指し、予防のためか、または臨床病理の進行時のいずれかに実行することが可能である。処置の望ましい作用としては、病気の発生または再発の阻止、症状の緩和、いずれのものであれ、病気の直接または間接の病理的結果の低減、転移の阻止、病気の進行速度の低下、病状の寛解または緩和、および、治癒または予後の改善が挙げられる。ある実施態様では、本発明の抗体は、疾病または障害の発達を遅らせるために使用される。

【０１４５】

「個体」とは、脊椎動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。哺乳動物としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、農場動物（例えば、ウシ）、スポーツ動物、ペット（例えば、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類、マウス、およびラットが挙げられる。

【０１４６】

処置のための「哺乳動物」とは、哺乳動物として分類される任意の動物、例えば、ヒト、家畜、および農場動物、および動物園動物、スポーツ動物、またはペット動物（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【０１４７】

「有効量」とは、所望の治療または予防結果を実現するために必要な、投与回数および期間において有効な量を指す。

【０１４８】

本発明の物質／分子、作用剤または拮抗剤の「治療的有効量」は、要因、例えば、個体の病状、年齢、性別、および体重、および、物質／分子、作用剤または拮抗剤の、該個体において所望の反応を誘起する能力に応じて変動してよい。さらに、治療的有効量とは、その量においては、治療的有効作用の方が、該物質／分子、作用剤または拮抗剤の、何らかの毒作用または有害作用よりも優勢となる量である。「予防的有効量」とは、所望の予防結果を実現するために必要な、投与回数および期間において有効な量を指す。通常、ただし常にそうであるとは限らないが、予防用量は、病気の前、または初期段階で使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量よりも少ない。

【０１４９】

本明細書で用いる「細胞傷害剤」という用語は、細胞の機能を抑制または阻止するか、および／または、細胞の破壊を誘起する物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、およびＬｕの放射性同位元素）、化学療法剤、例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他の仲介性薬剤、酵素およびその断片（例えば、核酸分解酵素）、抗生物質、および毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の小型分子毒素または酵素的に活性の毒素で、その断片および／または変異種を含む毒素）、および、後述の、各種抗腫瘍剤または抗癌剤を含むことが意図される。他の細胞傷害剤は後述される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。

【０１５０】

「化学療法剤」とは、癌の処置に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパ、およびＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロスフォスファミド；スルフォン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；エチレンイミンおよびメチルアメラミン、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンフォスフォルアミド、トリエチレンチオフォスフォルア

ミド、およびトリメチロロメラミンなど；アセトゲニン（特に、ブラタシンおよびブラタシノン）；デルタ－９－テトラヒドロカナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標））；ベータ－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類縁体トポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ（登録商標））、ＣＰＴ－１１（イリノテカン、ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および９－アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類縁体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィル酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン（合成類縁体ＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エルカセロビン；パンクラティスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロールナファジン、クロロフォスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン；抗生物質、例えば、エネジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特に、カリケアミシンガンマ１Ｉ，およびカリケアミシンオメガＩ１（例えば、Ａｇｎｅｗ，Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１８３－１８６（１９９４）を参照））；ダイネミシン、例えば、ダイネミシンＡなど；エスペラミシン；および、ネオカルジノスタチン発色団、および関連発色タンパク・エネジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロロマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）ドキソルビシン（モルフォリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、およびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗体謝剤、例えば、メトトレキセート、および５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸類縁体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセート；プリン類縁体、例えば、フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類縁体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸；アセグラトン；アルドフォスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシン、およびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）ポリサッカリド複合体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２′，２″－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、Ｔ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ（登録商標）、ＦＩＬＤＥＳＩＮ（登録商標））；ダカルバジン；マノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン

；アラビノシド（“Ａｒａ－Ｃ”）；チオテパ；タキソイド、例えば、ＴＡＸＯＬ（登録商標）パクリタキセル（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（登録商標）パクリタキセルの、クレモフォル非含有、アルブミン加工ナノ粒子処方（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐａｒｔｎｅｒｓ，Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）、およびＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）ドキセタキセル（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ　Ｒｏｒｅｒ，Ａｎｔｏｎｙ，Ｆｒａｎｃｅ）；クロランブシル；ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標））；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類縁体、例えば、シスプラチン、およびカルボプラチン；ビンブラスチン（ＶＥＬＢＲＡＮ（登録商標））；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩＮ（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボビン；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド、例えば、レチン酸；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））；前記の内のいずれかの、製薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体；および、前記の二つ以上の組み合わせ、例えば、ＣＨＯＰ、すなわち、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニソロンの併用治療の短縮形、およびＦＯＬＦＯＸ、すなわち、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標））と、５－ＦＵおよびロイコボビンとの組み合わせによる処置処方の短縮形が挙げられる。

【０１５１】

さらにこの定義に含まれるものは、癌の増殖を促進することが可能なホルモンの作用を調整、低減、阻止、または抑制するように作用する抗ホルモン剤であり、体系的、または全身処置の形を取ることが多い。抗ホルモン剤は、それ自身がホルモンであってもよい。例としては、抗エストロゲン、および、選択的エストロゲン受容体修飾剤（ＳＥＲＭ）、例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェンを含む）、ＥＶＩＳＴＡ（登録商標）ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、およびＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）トレミフェンなど；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方調整剤（ＥＲＤ）；卵巣を抑制または機能停止するように働く薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）作用剤、例えば、ＬＵＰＲＯＮ（登録商標）およびＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標）酢酸ルプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、およびトリプテレリン；その他の抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、およびビカルタミド；および、副腎におけるエストロゲン生産を調整する酵素アロマターゼを抑制する、アロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）酢酸メゲストロール、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタニー、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）ボロゾール、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）レトロゾール、およびＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）アナストロゾールが挙げられる。さらに、この化学療法剤の定義は、ビスフォスフォネート、例えば、クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）、またはＯＳＴＡＣ（登録商標））、ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標）エピドロネート、ＮＥ－５８０９５、ＺＯＭＥＴＡ（登録商標）ゾレドロン酸／ゾレドロネート、ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標）アレンドロネート、ＡＲＥＤＩＡ（登録商標）パミドロネート、ＳＫＥＬＩＤ（登録商標）チルドロネート、またはＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標）リセドロネート；および、トロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類縁体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の遺伝子、例えば、ＰＫＣ－アルファ、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、および、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦ－Ｒ）の遺伝子の発現を抑制するもの；ワクチン、例えば、ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチン、および遺伝子治療ワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、およびＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチン；ＬＵＲＴＯＴＥ

ＣＡＮ（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；ラパチニブジトシレート（ＥｒｂＢ－２およびＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小型分子阻害剤、ＧＷ５７２０１６とも呼ばれる）；および、前記の内のいずれかの製薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体を含む。

【０１５２】

本明細書で用いる「増殖阻害剤」とは、インビトロ、またはインビボのいずれかにおいて細胞（例えば、ＤＬＬ４を発現する細胞）の増殖を抑制する化合物または組成物を指す。したがって、この増殖阻害剤は、Ｓ期の細胞（例えば、ＤＬＬ４を発現する細胞）のパーセントを著明に減らすものであってもよい。増殖阻害剤の例としては、細胞周期の進行を阻止する（Ｓ期以外の時点において）薬剤、例えば、Ｇ１停止およびＭ－期停止を誘発する薬剤が挙げられる。古典的Ｍ期阻止剤としては、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン、およびトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンが挙げられる。Ｇ１停止させ、さらに進んでＳ期停止をもたらす薬剤は、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、およびａｒａ－Ｃである。さらに詳細な情報は、Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｍｅｎｄｅｌｓｏｈｎ ａｎｄ Ｉｓｒａｅｌ，ｅｄｓ．，Ｃｈａｐｔｅｒ １，表題“Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ｏｎｃｏｇｅｎｅｓ，ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ”，Ｍｕｒａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ．（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ：Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９５）、特に１３ページに見出すことができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、いずれも、樹木いちいから得られる抗癌剤である。ヨーロッパいちいから得られるドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｐｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｐｏｒｅｒ）は、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）の半合成類縁体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、脱重合を阻止することによって微小管を安定化し、これは、細胞分裂の抑制をもたらす。

【０１５３】

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

【０１５４】

「抗腫瘍組成物」という用語は、少なくとも一つの活性治療剤、例えば、「抗癌剤」を含む、癌の処置に有用な組成物を指す。治療剤（抗癌剤、本明細書では、別に「抗腫瘍剤」とも呼ばれる）の例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、放射線療法に使用される薬剤、抗血管形成剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、トキシン、および、他の癌処置薬、例えば、抗ＶＥＧＦ中和性抗体、ＶＥＧＦ拮抗剤、抗ＨＥＲ－２、抗ＣＤ２０、表皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）拮抗剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ阻害剤、エルロチニブ、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、またはＶＥＧＦ受容体（単数または複数）の内の一つ以上に結合する、拮抗剤（例えば、中和性抗体）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）および／または幹細胞因子（ＳＣＦ）に対する受容体チロシンキナーゼの阻害剤（例えば、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標）Ｎｏｖａｒｔｉｓ））、ＴＲＡＩＬ／Ａｐｏ２Ｌ、および、その他の、生物活性および有機化学薬剤などが挙げられる。

【０１５５】

本出願で用いられる「プロドラッグ」という用語は、製薬学的活性物質の前駆体または誘導体であって、親薬剤と比べて、腫瘍細胞に対しより細胞傷害性が低く、酵素的に活性

化または変換されて、より活性的な親形態になるものを指す。例えば、Ｗｉｌｍａｎ，“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ”Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ，１４，ｐｐ．３７５－３８２，６１５ｔｈ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｂｅｌｆａｓｔ（１９８６）、およびＳｔｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ：Ａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｂｏｒｃｈａｒｄｔ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄ．），ｐｐ．２４７－２６７，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（１９８５）を参照されたい。本発明のプロドラッグとしては、例えば、ただしこれらに限定されないが、リン酸塩含有プロドラッグ、チオフォスフェート含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Ｄ－アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ベーターラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されるフェノキシアセタミド含有プロドラッグ、または任意に置換されるフェニルアセタミド含有プロドラッグ、５－フルオロシトシン、および、より活性の高い細胞傷害性遊離薬剤に変換することが可能な、他の５－フルオロウリジンプロドラッグが挙げられる。本発明において使用するためにプロドラッグ形に誘導体形成することが可能な細胞傷害剤の例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、前述の化学療法剤が挙げられる。

【０１５６】

「抗血管形成剤」または「血管形成阻害剤」とは、血管形成、脈管形成、または不要な血管透過性を直接・間接に抑制する、低分子量物質、ポリヌクレオチド（例えば、抑制性ＲＮＡ（ＲＮＡｉまたはｓｉＲＮＡ））、ポリペプチド、単離タンパク、組み換えタンパク、抗体、その複合体または融合タンパクを指す。例えば、抗血管形成剤は、上に定義した血管形成剤に対する抗体または他の拮抗剤、例えば、ＶＥＧＦに対する抗体、ＶＥＧＦ受容体、可溶性ＶＥＧＦ受容体断片に対する抗体、または、ＶＥＧＦ受容体シグナル伝達を阻止する小型分子（例えば、ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２８４、ＳＵ６６６８、ＳＵＴＥＮＴ（登録商標）／ＳＵ１１２４８（スニチニブマレート）、ＡＭＧ７０６、または、例えば、国際公開第２００４／１１３３０４号パンフレットに記載されるもの）である。抗血管形成剤はさらに、天然の血管形成阻害剤、例えば、アンギオスタチン、エンドスタチンなどを含む。例えば、Ｋｌａｇｓｂｒｕｎ ａｎｄ Ｄ'Ａｍｏｒｅ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，５３：２１７－３９（１９９１）；Ｓｔｒｅｉｔ ａｎｄ Ｄｅｔｍａｒ，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２２：３１７２－３１７９（２００３）（例えば、表３は、悪性メラノーマにおける抗血管形成治療を掲げる）；Ｆｅｒｒａｒａ ＆ Ａｌｉｔａｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ５（１２）：１３５９－１３６４（１９９９）；Ｔｏｎｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２２：６５４９－６５５６（２００３）（例えば、表２は、抗血管形成因子を列挙する）；および、Ｓａｔｏ Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，８：２００－２０６（２００３）（例えば、表１は、臨床治験で使用された抗血管形成剤を列挙する）を参照されたい。

本発明の組成物、およびその作製法

本発明は、抗ＤＬＬ４抗体を含む製薬組成物を含む組成物、および抗ＤＬＬ４抗体をコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。本明細書で用いる組成物は、ＤＬＬ４に結合する、一つ以上の抗体、および／または、ＤＬＬ４に結合する、一つ以上の抗体をコードする配列を含む、一つ以上のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物はさらに、適切な担体、例えば、製薬学的に受容可能な賦形剤、例えば、当該分野で周知のバッファーを含む賦形剤を含んでもよい。

【０１５７】

本発明はさらに、単離抗体およびポリヌクレオチドの実施態様を包含する。本発明はさらに、事実上純粋な抗体、およびポリヌクレオチドの実施態様を包含する。

【０１５８】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体はモノクローナルであることが好ましい。さらに、本発明の範囲に含まれるものは、本明細書に提供される抗ＤＬＬ４抗体のＦａｂ、Ｆａｂ'、Ｆａｂ

′－ＳＨ、およびＦ（ａｂ′）$_2$断片である。これらの抗体断片は、酵素消化などの従来手段によって創出してもよいし、あるいは、組み換え技術によって生成してもよい。この抗体断片は、キメラであっても、またはヒト化されていてもよい。これらの断片は、下記に記載される診断および治療目的のために有用である。

【０１５９】

モノクローナル抗体は、事実上均一な抗体の集団から獲得される。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量において天然に出現する可能性のある突然変異を除いては、同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、別々の抗体の混合物ではないという、その抗体の特徴を示す。

【０１６０】

本発明の抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、最初にＫｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって記載されたハイブリドーマ法を用いて作製することが可能であるが、あるいは、組み換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）によって作製してもよい。

【０１６１】

ハイブリドーマ法では、マウス、またはその他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターを免疫化して、免疫化のために使用されたタンパクに対して特異的に結合する抗体を生産する、または生産することが可能なリンパ球を誘起する。ＤＬＬ４に対する抗体は、一般に、ＤＬＬ４およびアジュバントを複数回皮下（ｓｃ）、または腹腔内（ｉｐ）に注入することによって誘起する。ＤＬＬ４は、当該分野で周知の方法によって調製してもよく、そのあるものは、下記に本明細書において記述される。一実施態様では、免疫グロブリン重鎖のＦｃ部分に融合したＤＬＬ４の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、ＤＬＬ４誘導体によって動物を免疫化する。好ましい実施態様では、ＤＬＬ４－ＩｇＧ１融合タンパクで動物を免疫化する。動物は、通常、ＤＬＬ４と、モノフォスフォリル脂質Ａ（ＭＰＬ）／トレハロースジクリノミコレート（ＴＤＭ）（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）との、免疫原性融合体または誘導体に対して免疫化され、溶液は、複数箇所の皮内に注入される。２週間後、動物をブーストする。７から１４日後、動物は採血され、血清について抗ＤＬＬ４力価を定量した。力価がプラトーに達するまで動物をブーストした。

【０１６２】

それとは別に、リンパ球は、インビトロで免疫化してもよい。次に、リンパ球を、適切な融合剤、例えば、ポリエチレングリコールを用いて骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１６３】

このように調製したハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の、親の骨髄腫細胞の増殖または生存を抑制する、一つ以上の物質を含む、適切な培養培地に撒き、育成する。例えば、もしも、親の骨髄腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠くならば、ハイブリドーマ用の培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（ＨＡＴ培地）、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠乏細胞の増殖を阻止する。

【０１６４】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選ばれた抗体生産細胞による抗体の安定な高レベル生産を支持し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性を持つものである。これらの中でも、好ましい骨髄腫細胞系統は、マウスの骨髄腫細胞系統、例えば、Ｓａｌｋ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　ＵＳＡから入手が可能な、ＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍から得られたもの、および、米国基準菌株保存機関、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ，ＵＳＡから入手が可能なＳｐ－２またはＸ６３－Ａｇ８－６５３

細胞である。ヒトのモノクローナル抗体の生産用として、ヒトの骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞系統が従来から記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１６５】

ハイブリドーマ細胞が成育する培養培地は、ＤＬＬ４に向けたモノクローナル抗体の生産に関して定量される。ハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法、または、インビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、または固相酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）によって定量することが好ましい。

【０１６６】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって定量することが可能である。

【０１６７】

所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が特定された後、このクローンを、限界希釈処置によってサブクローンし、標準的方法によって育成してもよい（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭ、またはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において、腹水腫瘍としてインビボで育成してもよい。

【０１６８】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、通例の免疫グロブリン精製処置、例えば、プロテインＡ－セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーによって、培養培地、腹水液、または血清から適切に分離される。

【０１６９】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、併合ライブラリーを用い、所望の一つの活性、または複数の活性を有する合成抗体クローンを求めてスクリーニングすることによって作製することも可能である。原理的には、ファージコートタンパクに融合した抗体可変領域（Ｆｖ）の各種断片を提示するファージを含むファージライブラリーをスクリーニングすることによって、合成抗体クローンが選択される。このようなファージライブラリーは、所望の抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別にかけられる。所望の抗原に結合することが可能なＦｖ断片を発現するクローンは、抗原に吸着され、したがって、ライブラリー中の非結合クローンから分離される。次に、この結合クローンは、抗原から溶出され、さらに、抗原吸着／溶出から成る数サイクルを重ねることによって濃縮させることが可能である。本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、どれも、適切な抗原スクリーニング処置を設計し、対象ファージクローンを選別し、次いで、該対象ファージクローンのＦｖ配列、および、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３に記載される、適切な定常領域（Ｆｃ）を用いて、完全長の、抗ＤＬＬ４抗体クローンを構築することによって獲得することが可能である。

【０１７０】

抗体の抗原結合ドメインは、約１１０アミノ酸から成る、二つの可変（Ｖ）領域、一方は、軽鎖（ＶＬ）由来のもの、もう一方は重鎖（ＶＨ）由来のものから形成される。これらは、共に、三つの超可変ループ、すなわち、相補性決定領域（ＣＤＲ）を提示する。可

変ドメインは、ファージにおいて、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、ＶＨおよびＶＬが、短い、屈曲性のペプチドで共有的に連結される、単一鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片として、あるいは、それぞれが定常ドメインに融合され、非共有的に相互作用を持つ、Ｆａｂ断片として機能的に提示することが可能である。本明細書で用いる場合、ｓｃＦｖをコードするファージクローン、およびＦａｂをコードするファージクローンは、まとめて「Ｆｖファージクローン」、または「Ｆｖクローン」と呼ぶ。

【０１７１】

ＶＨおよびＶＬ遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって別々にクローンし、ファージライブラリーにおいてランダムに再結合させ、次いで、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化された供給源から得られたライブラリーは、ハイブリドーマの構築を要することなく、免疫原に対し高い親和性を持つ抗体を提供する。それとは別に、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ，１２：７２５－７３４（１９９３）によって記載されるように、天然のレパトーリーをクローン化して、全く免疫化無しで得られる、広範な非自己および自己抗原に対する、単一供給源のヒト抗体を得ることが可能である。最後に、天然のライブラリーは、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）に記載されるように、幹細胞由来の、未再編成Ｖ－遺伝子セグメントを合成的にクローンし、超可変のＣＤＲ３領域をコードするランダム配列を含むＰＣＲプライマーを用い、インビトロで再編成を実行することによって合成的に作製することが可能である。

【０１７２】

繊維状ファージを用い、マイナーコートタンパクｐＩＩＩに融合させることによって抗体断片を提示する。この抗体断片は、例えば、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載されるように、ＶＨおよびＶＬが、屈曲性ポリペプチドスペーサによって同じポリペプチド鎖に接続される、単一鎖Ｆｖ断片として提示することが可能であり、あるいは、例えば、Ｈｏｏｇｅｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９:４１３３－４１３７（１９９１）に記載されるように、一方の鎖はｐＩＩＩに融合され、他方鎖は、細菌宿主細胞の細胞周辺腔に分泌され、そこで、Ｆａｂ－コートタンパク構造の集合体が、野生型コートタンパクのあるものを押しのけることによってファージ表面に提示されるＦａｂ断片として提示することが可能である。

【０１７３】

一般に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒトまたは動物から採取される免疫細胞から得られる。抗ＤＬＬ４クローンに偏向したライブラリーが所望ならば、被検体をＤＬＬ４で免疫化し、抗体反応を発生させ、脾臓細胞、および／または、循環性Ｂ細胞、他の抹消血リンパ球（ＰＢＬ）を回収して、ライブラリー構築に備える。好ましい実施態様では、抗ＤＬＬ４クローンに偏向した、ヒトの抗体遺伝子断片ライブラリーは、機能的なヒトの免疫グロブリン遺伝子アレイを担持する（かつ、機能的な内因性抗体生産システムを欠如する）トランスジェニックマウスにおいて、抗ＤＬＬ４抗体反応を発生させ、そうすることによって、ＤＬＬ４免疫化が、ＤＬＬ４に対するヒト抗体を生産するＢ細胞を生じるようにさせることによって得られる。ヒト抗体を生産するトランスジェニックマウスの生成は後述される。

【０１７４】

抗ＤＬＬ４反応細胞集団をさらに濃縮するには、ＤＬＬ４特異的膜結合抗体を発現するＢ細胞を単離するための、適切なスクリーニング処理、例えば、ＤＬＬ４アフィニティークロマトグラフィーによる細胞分離、または、細胞を、フルオロクロム標識ＤＬＬ４に吸着させ、次いで、蛍光表示細胞分取法（ＦＡＣＳ）を用いることによって実現することが可能である。

【０１７５】
それとは別に、免疫化されないドナーからの脾臓細胞、および／またはＢ細胞、または他のＰＢＬを用いることによって、可能な抗体ライブラリーの、より優れた代表物が得られ、かつ、ＤＬＬ４が抗原性ではない動物種（ヒト、または非ヒト）による抗体ライブラリーの構築が可能となる。インビトロで抗体遺伝子構築体を組み込んだライブラリーのためには、幹細胞を被検体から採取すると、未再編成抗体遺伝子セグメントをコードする核酸が得られる。対象免疫細胞は、様々の動物種、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ類、ｌｕｐｒｉｎｅ、イヌ類、ネコ類、ブタ類、ウシ類、ウマ類、および鳥類などから得ることが可能である。
【０１７６】
抗体の可変領域遺伝子セグメント（ＶＨおよびＶＬセグメントを含む）をコードする核酸は、対象細胞から回収され、増幅される。再編成済みＶＨおよびＶＬ遺伝子ライブラリーの場合は、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），８６：３８３３－３８３７（１９８９）に記載されるように、リンパ球からゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡを単離し、次いで、再編成済みＶＨおよびＶＬ遺伝子の５′および３′末端に適合するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を実行することによって種々のＶ遺伝子レパートリーを発現させることによって、所望ＤＮＡを得ることが可能である。Ｏｒｌａｎｄｉら（１９８９）およびＷａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４１：５４４－５４６（１９８９）に記載されるように、成熟Ｖ－ドメインをコードするエキソンの５′末端に逆行プライマー、およびＪ－セグメント内部に基づく順行プライマーを用いて、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡからＶ遺伝子を増幅することが可能である。しかしながら、ｃＤＮＡから増幅する場合には、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９：８８－８９（１９９１）に記載されるように、逆行プライマーはさらに、リーダーエキソンに基づいてもよく、順行プライマーは、Ｓａｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），８６：５７２８－５７３２（１９８９）に記載されるように、定常領域内部に基づいてもよい。相補性を最大にするためには、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）またはＳａｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．（１９８９）に記載されるように、プライマーの中に縮重を組み込んでもよい。ライブラリーの多様性は最大化することが好ましいが、そのためには、例えば、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）の方法に記載されるように、あるいは、Ｏｒｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１：４４９１－４４９８（１９９３）の方法に記載されるように、免疫細胞核酸サンプル中に存在する、利用可能な全てのＶＨおよびＶＬ再編成体を増幅するために、各Ｖ－遺伝子ファミリーを標的としたＰＣＲプライマーを使用する。増幅ＤＮＡを発現ベクターにクローンするために、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９）によって記載されるように、一端のタグとして、ＰＣＲプライマーの内部に、希少な制限部位を導入することも可能であるし、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）に記載されるように、標識プライマーによってさらにＰＣＲ増幅することによって導入することも可能である。
【０１７７】
合成的に再編成されたＶ遺伝子レパートリーを、インビトロでＶ遺伝子セグメントから得ることが可能である。ヒトのＶＨ－遺伝子セグメントの多くは、クローニングされ、配列決定され（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：７７６－７９８（１９９２）に報告される）、かつマップされる（Ｍａｔｓｕｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．，３：８８－９４（１９９３）に報告される）。これらのクローニングされたセグメント（Ｈ１およびＨ２ループの、全ての大きな立体配座を含む）を用いて、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）に記載されるように、種々の配列および長さを持つＨ３ループをコードするＰＣＲプライマーを用いて、多様なＶＨ遺伝子レパートリーを生成することが可能である。さらに、ＶＨレパートリーは、Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａ

ｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４４５７－４４６１（１９９２）に記載されるように、全ての配列多様性を、単一長の長いＨ３ループに基づいて作製することが可能である。ヒトのＶκおよびＶλセグメントは、クローニングされ、配列決定されており（Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２３：１４５６－１４６１（１９９３）に報告される）、それらを用いて合成の軽鎖レパートリーを作製することが可能である。ある範囲のＶＨおよびＶＬフォールド、およびＬ３およびＨ３長に基づく、合成Ｖ遺伝子レパートリーは、相当の構造的多様性の抗体をコードする。Ｖ－遺伝子コードＤＮＡの増幅後、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）の方法にしたがって、生殖系列Ｖ－遺伝子セグメントをインビトロで再編成することが可能である。

【０１７８】

抗体断片のレパートリーは、ＶＨおよびＶＬ遺伝子レパートリーをいくつかのやり方で組み合わせることによって構築することが可能である。各レパートリーは、異なるベクターにおいて創出することが可能であり、これらのベクターは、例えば、Ｈｏｇｒｅｆｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１２８：１１９－１２６（１９９３）に記載されるようにインビトロで組み合わせることも可能であるし、あるいは、例えば、組み合わせ感染によって、例えば、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２１：２２６５－２２６６（１９９３）に記載されるｌｏｘＰシステムを用いて、インビボで組み合わせることも可能である。このインビボ組み合わせ法は、大腸菌の形質転換効率によって課せられるライブラリーサイズの制限を克服するために、Ｆａｂ断片の二鎖性を利用する。天然のＶＨおよびＶＬレパートリーを別々に、一方はファージミドに、他方はファージベクターにクローニングする。次に、ファージミド含有細菌をファージ感染して、各細胞が異なる組み合わせを持ち、かつ、ライブラリーサイズは、存在する細胞の数（約10^{12}クローン）によってのみ制限されるようにして、二つのライブラリーを組み合わせる。両ベクターとも、インビボ再編シグナルを含むので、ＶＨおよびＶＬ遺伝子は、単一レプリコンに再結合され、ファージ粒子に共同パックされる。これらの巨大ライブラリーによって、高親和性（約10^{-8}ＭのＫｄ$^{-1}$）の多様な抗体が多数得られる。

【０１７９】

それとは別に、レパートリーは、例えば、Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：７９７８－７９８２（１９９１）に記載されるように、同じベクターに順次クローニングされてもよいし、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）に記載されるように、ＰＣＲによって一種に組立てしてから、クローニングしてもよい。ＰＣＲ組立ては、屈曲性ペプチドスペーサをコードするＤＮＡによってＶＨおよびＶＬ　ＤＮＡを連結して、単一鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）レパートリーを形成するために使用することが可能である。さらに別の技術では、Ｅｍｂｌｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２０：３８３１－３８３７（１９９２）に記載されるように、「細胞内ＰＣＲ組立て」を用いて、ＰＣＲによってリンパ球内でＶＨおよびＶＬ遺伝子を結合し、次いで、連結遺伝子のレパートリーをクローニングする。

【０１８０】

天然ライブラリー（天然か、または合成）によって生産される抗体は、中等の親和性（約10^{6}から10^{7}Ｍ$^{-1}$のＫｄ$^{-1}$）を持つことが可能であるが、上記Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）に記載されるように、二次ライブラリーを構築し、その中から再選択することによって親和性熟成をインビトロで模倣することが可能である。例えば、Ｈｏｗｋｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２６：８８９－８９６（１９９２）の方法、または、Ｇｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８９：３５７６－３５８０（１９９２）の方法にあるように、間違え易いポリメラーゼ（Ｌｅｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，１：１１－１５（１９８９）に報告される）を用いることによって、突然変異をインビトロでランダムに導入す

ることが可能である。さらに、選ばれた個別のＦｖクローンにおいて、対象ＣＤＲにまたがる、ランダム配列を有すプライマーによるＰＣＲを用いることによって、一つ以上のＣＤＲにランダムに突然変異を発生させ、比較的高度な親和性を持つクローンを求めてスクリーニングすることによって、親和性熟成を実行することが可能である。国際公開第９６０７７５４号パンフレット（１９９６年３月１４日公開）は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定域に突然変異を導入し、軽鎖遺伝子ライブラリーを創製する方法を記載する。もう一つの効果的な方法は、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されるように、ファージディスプレイによって選ばれたＶＨまたはＶＬドメインを、免疫化されないドナーから得られた天然のＶドメイン変異種のレパートリーと再結合させ、数ラウンドの鎖シャッフリングを行って、より高い親和性を求めてスクリーニングすることである。この技術によって、１０$^{-9}$Ｍ範囲の親和性を持つ抗体および抗体断片の生産が可能となる。

【０１８１】

ＤＬＬ４核酸およびアミノ酸配列は、当該分野において既知である。ＤＬＬ４をコードする核酸配列は、ＤＬＬ４の所望領域のアミノ酸配列を用いて設計することが可能である。それとは別に、ＧｅｎＢａｎｋのアクセス番号ＮＭ＿０１９０７４のｃＤＮＡ配列（または、その断片）がある。ＤＬＬ４は、膜貫通タンパクである。細胞外領域は、８個のＥＧＦ様反復列の外、全てのＮｏｔｃｈリガンドの間で保存され、受容体結合に必要なＤＳＬドメインを含む。さらに、この予想タンパクは、膜貫通領域、および、触媒モチーフを全く欠く細胞質内尾部を含む。ヒトのＤＬＬ４タンパクは、６８５個のアミノ酸のタンパクであり、下記の領域：シグナルペプチド（アミノ酸１－２５）；ＭＮＮＬ（アミノ酸２６－９２）；ＤＳＬ（アミノ酸１５５－２１７）；ＥＧＦ様（アミノ酸２２１－２５１）；ＥＧＦ様（アミノ酸２５２－２８２）；ＥＧＦ様（アミノ酸２８４－３２２）；ＥＧＦ様（アミノ酸３２４－３６０）；ＥＧＦ様（アミノ酸３６６－４００）；ＥＧＦ様（アミノ酸４０２－４３８）；ＥＧＦ様（アミノ酸４４０－４７６）；ＥＧＦ様（アミノ酸４８０－５１８）；膜貫通（アミノ酸５２９－５５１）；細胞原形質ドメイン（アミノ酸５５２－６８５）を含む。ヒトＤＬＬ４のアクセス番号は、ＮＭ＿０１９０７４であり、マウスＤＬＬ４のアクセス番号は、ＮＭ＿０１９４５４である。

【０１８２】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、当該分野で既知の種々の方法によって調製することが可能である。そのような方法としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、Ｅｎｇｅｌｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｇｎｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，２８：７１６－７３４（１９８９）に記載される方法の内のいずれかによる化学合成、例えば、トリエステル、亜リン酸塩、フォスフォロアミダイト、およびＨ－フォスフォン酸法が挙げられる。一実施態様では、発現宿主細胞によって好まれるコドンが、ＤＬＬ４コードＤＮＡの設計に用いられる。それとは別に、ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、ゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーから単離することが可能である。

【０１８３】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡ分子を構築した後、このＤＮＡ分子は、プラスミドなどの発現ベクターにおいて発現調節配列に作動可能に連結される。その際、この調節配列は、ベクターによって形質転換される宿主細胞によって認識される。一般に、プラスミド配列は、宿主細胞と適合性を持つ動物種から得られた複製および調節配列を含む。ベクターは、通常、複製部位の外に、形質転換細胞において表現型選択の実行を可能とするタンパクをコードする配列を有す。原核および真核宿主細胞における発現にとって好適なベクターは、当該分野で既知であり、いくつかは、本明細書においても記載される。真核生物、例えば、酵母、または、多細胞生物、例えば、哺乳動物から得られた細胞を使用してもよい。

【０１８４】

ＤＬＬ４をコードするＤＮＡは、分泌リーダー配列に、任意に作動可能に連結され、宿主細胞によって、発現産物が、培地に分泌されることを可能とする。分泌リーダー配列の

例としては、例えば、ｓｔＩＩ、エコチン、ｌａｍＢ、ヘルペスＧＤ、ｌｐｐ、アルカリフォスファターゼ、インベルターゼ、およびアルファ因子が挙げられる。さらに、本発明で使用するのに好適なのは、プロテインＡの３６アミノ酸リーダー配列である（Ａｂｒａｈｍｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，４：３９０１（１９８５））。

【０１８５】

好ましくは、本発明の、前述の発現またはクローニングベクターによって、宿主細胞をトランスフェクション、または形質転換し、通例のもので、プロモーターを誘起するように適切に修飾された栄養培地で培養し、形質転換細胞を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅する。

【０１８６】

トランスフェクションとは、何らかのコード配列が実際に発現されるかどうかとは無関係に、宿主細胞によって発現ベクターが取り込まれることを指す。例えば、$CaPO_4$沈殿、および電気穿孔などの、数多くのトランスフェクション法が当業者には知られる。トランスフェクションが上手くいったかどうかは、一般に、宿主細胞の内部において、このベクターの動作を示す何かの兆候が起こった時点で認識される。トランスフェクションのための方法は、当該分野で周知であり、いくつかは本明細書にも後述される。

【０１８７】

形質転換は、ＤＮＡを、該ＤＮＡが、染色体外要素として、または染色体組み込み体として複製可能となるように、生物体に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、その細胞に適切な標準技術を用いて形質転換は実行される。形質転換のための方法は、当該分野で周知であり、いくつかは本明細書において後述される。

【０１８８】

ＤＬＬ４を生産するために使用される原核宿主細胞は、上にＳａｍｂｒｏｏｋらの中に概説されるようにして培養することが可能である。

【０１８９】

ＤＬＬ４を生産するために使用される哺乳動物宿主細胞は、当該分野で周知であり、その内のいくつかは本明細書にも記述される、種々の培地において培養することが可能である。

【０１９０】

本開示に言及される宿主細胞は、インビトロ培養細胞の外、宿主動物の体内の細胞も包含する。

【０１９１】

ＤＬＬ４の精製は、当該分野で認知済みの方法、その内のいくつかは本明細書にも記述される、によって実現してもよい。

【０１９２】

精製ＤＬＬ４は、基質、例えば、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、各種アクリルコポリマー、ヒドロキシルメタクリレートゲル、ポリアクリルおよびポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性およびイオン性担体など、ファージディスプレイクローンのアフィニティークロマトグラフィー分離に使用するのに好適な基質に付着させることが可能である。基質に対するＤＬＬ４タンパクの付着は、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．４４（１９７６）に記載される方法で実現することが可能である。ポリサッカリド基質、例えば、アガロース、デキストラン、またはセルロースに対してタンパクリガンドを付着させるために一般に用いられる技術は、ハロゲン化シアノゲンによって担体を活性化し、次いで、このペプチドリガンドの一次脂肪族または芳香族アミンを、活性化基質に結合させることを含む。

【０１９３】

それとは別に、ＤＬＬ４を、吸着プレートのウェルに塗布すること、吸着プレートに固定した宿主細胞において発現させること、または、細胞分取に使用すること、ストレプトアビジン塗布ビーズによって捕捉されるようにビオチンに結合すること、または、ファージディスプレイライブラリーの選別のために使用される、他の任意の周知の方法において

使用することが可能である。

【０１９４】

ファージライブラリーを、該ファージ粒子の少なくとも一部が吸着体と結合するのに好適な条件下で、固定ＤＬＬ４と接触させる。通常、ｐＨ、イオン強度、温度などを含む条件は、生理的条件を模倣するように選ばれる。固相に結合したファージは、洗浄され、例えば、Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８８:７９７８－７９８２（１９９１）に記載されるように酸で溶出されるか、あるいは、例えば、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）によって記載されるようにアルカリによって溶出されるか、あるいは、Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５３：６２４－６２８（１９９１）の抗原競合法と同様の手順によって、ＤＬＬ４抗原競合体によって溶出される。ファージは、１回の選択ラウンドで２０～１，０００倍濃縮することが可能である。さらに、この濃縮ファージは、細菌培養において育成し、さらに数回の選択ラウンドを経過させることが可能である。

【０１９５】

選択の効率は、多くの要因、例えば、洗浄時の解離反応速度、単一ファージにおける複数の抗体断片が同時に抗原に嵌合することが可能かどうか、などの要因に依存する。速やかな解離反応速度（および、弱い結合親和性）を有する抗体は、短時間の洗浄、多価ファージディスプレイ、および、固相に対し高密度の抗原コーティングを使用することによって保持することが可能である。高密度は、多価相互作用によってファージを安定化させるばかりでなく、一旦解離したファージの再結合を促進する。解離反応速度の低い（および、結合親和性の高い）抗体の選択は、Ｂａｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）、および国際公開第９２／０９６９０号パンフレットに記載されるように、長時間の洗浄、および一価のファージディスプレイを用いることによって、かつ、Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されるように、低密度の抗原コーティングを用いることによって促進することが可能である。

【０１９６】

ＤＬＬ４に対し、異なる親和性を持つファージ抗体、場合によっては、親和性が僅かしか違わないファージ抗体を区別することも可能である。しかしながら、ある選ばれた抗体のランダムな突然変異誘発（例えば、前述のアフィニティー熟成技術のあるもので行われるもののような）は、たくさんの突然変異種を生じさせるが、その多くは抗原に結合し、ごく僅かのものは比較的高い親和性で結合すると考えられる。ＤＬＬ４を制限した場合、希少な高親和性ファージは、競合の結果排除される可能性がある。全ての高親和性突然変異を保持するために、ファージを、過剰なビオチニル化ＤＬＬ４と、ビオチニル化ＤＬＬ４がＤＬＬ４に対する標的モル親和定数よりも低いモル濃度となる条件下でインキュベートすることが可能である。次に、高親和性結合性ファージを、ストレプトアビジン塗布常磁性ビーズによって捕捉することが可能である。このような「平衡捕捉」は、抗体を、その結合親和性にしたがって捕捉することを可能とし、その感度は、比較的低い親和性を持つ、きわめて過剰なファージの中から、親和性が僅かに２倍しか高くない突然変異クローンの単離を可能とする。さらに、解離反応速度に基づいて識別するように、固相に結合したファージの洗浄に使用される条件を操作することも可能である。

【０１９７】

抗ＤＬＬ４クローンは、活性選択してもよい。一実施態様では、本発明は、Ｎｏｔｃｈ受容体（例えば、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、および／またはＮｏｔｃｈ４）と、ＤＬＬ４の間の結合は阻止するが、Ｎｏｔｃｈ受容体と第２タンパクの間の結合は阻止しない抗ＤＬＬ４抗体を提供する。このような抗ＤＬＬ４抗体に対応するＦｖクローンは、（１）前述のようにしてファージライブラリーから抗ＤＬＬ４クローンを単離し、ファージクローンのこの単離集団を、該集団を適切な細菌宿主において育成することによって、任意に増幅すること；（２）それに対して、それぞれ、阻止活性および非阻止

活性が望まれるＤＬＬ４および第２タンパクを選択すること；（３）抗ＤＬＬ４ファージクローンを、固定ＤＬＬ４に吸着させること；（４）過剰な第２タンパクを用いて、第２タンパクの結合決定基と重複、または、それと共有されるＤＬＬ４－結合決定基を認識する、不要のクローンがあればそれらを全て溶出すること；および、（５）工程（４）の後でも依然として吸着したままのクローンを溶出すること、によって選択することが可能である。所望の阻止性／非阻止性を有するクローンは、本明細書に記載される選択手順を１回以上繰り返すことによってさらに任意に濃縮することが可能である。

【０１９８】

ハイブリドーマ由来モノクローナル抗体をコードするＤＮＡ、または、本発明のファージディスプレイＦｖクローンは、従来の手順を用いて（例えば、ハイブリドーマまたはファージＤＮＡ鋳型から、対象領域をコードする重鎖および軽鎖を特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いることによって）、簡単に単離され、かつ、配列決定される。一旦単離されたならば、このＤＮＡは、発現ベクターの中に設置し、次に、宿主細胞、例えば、大腸菌、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または、他の条件下では免疫グロブリンを生産しない骨髄腫細胞中にトランスフェクションし、該組み換え宿主細胞において、所望のモノクローナル抗体の合成を実現することが可能である。抗体コードＤＮＡの、細菌における組み換え発現に関する総説としては、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６（１９９３）およびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ，１３０：１５１（１９９２）が挙げられる。

【０１９９】

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖および／または軽鎖定常領域をコードする、既知のＤＮＡ配列（例えば、適切なＤＮＡ配列は、上記Ｋａｂａｔらから得ることが可能である）と結合させて、完全または部分長の重鎖および／または軽鎖をコードするクローンを形成することが可能である。この目的のために、任意のアイソタイプの定常領域、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥの定常領域を使用すること、および、その定常領域は、ヒトまたは任意の動物種から獲得することが可能であることが理解されよう。一動物種（例えば、ヒト）の可変ドメインＤＮＡ由来のＦｖクローンで、別の動物種の定常領域ＤＮＡに融合させて、「ハイブリッド」の完全長重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成したものは、本明細書で用いる「キメラ」および「ハイブリッド」抗体の定義の中に含められる。好ましい実施態様では、ヒト可変領域ＤＮＡ由来のＦｖクローンは、ヒトの定常領域ＤＮＡに融合されて、全体ヒトの、完全または部分長重鎖および／または軽鎖のコード配列（単数または複数）を形成する。

【０２００】

本発明のハイブリドーマから得られた、抗ＤＬＬ４抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の、マウスの相同配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによってさらに修飾することが可能である（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１－６８５５（１９８４）の方法に見られるように）。ハイブリドーマ由来抗体またはその断片、あるいは、Ｆｖクローン由来抗体またはその断片をコードするＤＮＡは、該免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全て、または一部を共有的に結合することによってさらに修飾することが可能である。このようにして、本発明のＦｖクローン、またはハイブリドーマ由来抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

抗体断片

本発明は、抗体断片を含有する。ある状況では、抗体全体よりも、抗体断片を使用する方が有利なことがある。断片の比較的小さいサイズのために、速やかな排泄が可能となり、固形腫瘍への接近が改善される可能性がある。

【０２０１】

抗体断片の生産のために種々の技術が開発されている。従来、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化によって得られていた（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４：１０７－１１７（１９９２）；およびＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照）。しかしながら、今では、これらの断片は、組み換え宿主細胞によって直接生産することが可能である。Ｆａｂ、Ｆｖ、およびＳｃＦｖ抗体断片は、全て、大腸菌において発現させ、分泌させることが可能であり、したがって、これらの断片を、容易に大量に生産することが可能である。それとは別に、Ｆａｂ′－ＳＨ断片を、直接大腸菌から回収し、化学的に結合させて、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片を形成することが可能である（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３－１６７（１９９２））。別の方法によれば、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片は組み換え宿主細胞培養から直接単離される。救済受容体結合性エピトープ残基を含み、インビボ半減期を延長させたＦａｂおよびＦ（ａｂ′）$_2$断片が、米国特許第５，８６９，０４６号明細書に記載される。抗体断片生産のための、他の技術も、当業者には明白であろう。別の実施態様では、選択抗体は、単一鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。国際公開第９３／１６１８５号パンフレット；米国特許第５，５７１，８９４号明細書および同第５，５８７，４５８号明細書を参照されたい。ＦｖおよびｓＦｖは、定常領域を欠くが、結合部位は元のままの、唯一の分子である。したがって、これらは、インビボ使用の際、非特異的結合の抑制に好適である。ｓＦｖ融合タンパクは、ｓＦｖのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパクを付着させた融合体を生成するように構築してもよい。Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｅｄ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ上記を参照されたい。さらに、抗体断片は、例えば、米国特許第５，６４１，８７０号明細書に記載されるように「線状抗体」であってもよい。このような線状抗体断片は、単一特異的であっても、二重特異的であってもよい。

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を含有する。非ヒト抗体をヒト化するために種々の方法が当該分野において知られる。例えば、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から得られた一つ以上のアミノ酸残基を、その中に導入させて有することが可能である。これらの、非ヒトアミノ酸残基は、よく、「輸入」残基と呼ばれるが、これらは、通常、「輸入」可変領域から取られる。ヒト化は、事実上、Ｗｉｎｔｅｒおよびその共同研究者らの方法にしたがって（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６）、ヒト抗体の対応配列の代わりに、超可変領域配列を置換することによって行われる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第４，８１６，５６７号明細書）であって、元のヒトの可変ドメインが、事実上より少なくなるように、非ヒト動物種由来の対応配列によって置換される抗体である。実際には、ヒト化抗体は、通常、いくつかの超可変領域残基、および、場合によってはいくつかのＦＲ残基が、げっ歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

【０２０２】

ヒト化抗体作製のために使用される、軽鎖および重鎖の、ヒト可変ドメインの選択は、抗原性の抑制のためにきわめて重要である。いわゆる「最善適合」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列が、既知のヒト可変ドメイン配列の全体ライブラリーに対してスクリーニングされる。次に、げっ歯類配列に対してもっとも近似するヒト配列が、ヒト化抗体のヒトの骨組構造として受容される（Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１）。もう一つの方法は、軽鎖または重鎖のある特定サブグループの、全てのヒト抗体の共通配列から得られた特定骨組構造を使用する。この同じ骨組構造は、いくつかの異なるヒト化抗体に使用することが可能である（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８

５；Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３）。

【０２０３】

さらに、抗体は、抗原に対する高い親和性、および、他の有利な生物学的特性を保有しつつヒト化されることが重要である。この目標を達成するために、一方法によれば、ヒト化抗体は、親配列、および、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、種々の概念的ヒト化産物の分析過程によって調製される。免疫グロブリンの三次元モデルは、普通に利用可能であり、当業者には親しいものである。選択された、免疫グロブリン候補配列の、予想される三次元立体配座構造を図示し、表示するコンピュータプログラムが市販されている。これらの表示を検査することによって、免疫グロブリン候補配列の機能における、これら残基の予想される役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンの、その抗原に対する結合能に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、レシピエントおよび輸入配列からＦＲ残基を選択し、所望の抗体特性、例えば、標的抗原（単数または複数）に対する親和性の増加が実現されるように、それらを組み合わせることが可能となる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響において、直接に、そしてもっとも実質的に関与する。

ヒト抗体

本発明の、ヒトの抗ＤＬＬ４抗体は、前述のように、既知の、ヒト定常ドメイン配列（単数または複数）と、ヒト由来ファージディスプレイライブラーから選ばれた、Ｆｖクローン可変ドメイン配列（単数または複数）を組み合わせることによって構築することが可能である。それとは別に、本発明の、ヒトの、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することも可能である。ヒトモノクローナル抗体生産のための、ヒトの骨髄腫細胞およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞系が、例えば、Ｋｏｚｂｏｒ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７）；およびＢｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：８６（１９９１）によって記載される。

【０２０４】

現在では、内因性免疫グルブリン生産を全く見ることなく、免疫化によって、ヒト抗体の完全レパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生産することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異マウスにおいて、抗体の重鎖連結域（ＪＨ）遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体生産の完全抑制をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異マウスにヒトの生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを転送すると、抗原チャレンジによって、ヒト抗体の生産がもたらされる。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７：３３（１９９３）を参照されたい。

【０２０５】

さらに、遺伝子シャッフリングを用いて、非ヒトの、例えば、げっ歯類の抗体から、ヒトの抗体を得ることが可能である。この場合、ヒト抗体は、最初の非ヒト抗体と同様の親和性および特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法によれば、前述のようなファージディスプレイ技術によって得られた、非ヒト抗体断片の重鎖または軽鎖可変領域のいずれかが、ヒトのＶドメイン遺伝子のレパートリーによって置換され、それによって、非ヒト鎖／ヒト鎖ｓｃＦｖまたはＦａｂキメラの集団が創出される。抗原によって選択することによって、非ヒト鎖／ヒト鎖キメラｓｃＦｖまたはＦａｂで、そこにおいては、一次ファージディスプレイクローンにおいて対応する非ヒト鎖の除去と同時に破壊された抗原結合部位を、ヒト鎖が回復する、すなわち、エピトープが、ヒト鎖のパートナーを支配する（インプリントする）キメラ抗体断片が単離される。残余の

非ヒト鎖を置換するためにこのプロセスを繰り返すと、ヒト抗体が得られる（１９９３年４月１日公開の、国際公開第９３／０６２１３号パンフレットを参照）。従来の、ＣＤＲ移植による非ヒト抗体のヒト化と違って、この技術は、非ヒト起源のＦＲまたはＣＤＲを全く含まない、完全なヒトの抗体を提供する。

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有する、モノクローナルの、好ましくは、ヒトの、またはヒト化抗体である。本発明の場合、結合特異性の一つは、ＤＬＬ４に対するものであり、他方は、他の任意の抗原に対する。例示の二重特異性抗体は、ＤＬＬ４タンパクの二つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体はさらに、ＤＬＬ４を発現する細胞に対し、細胞傷害性薬剤を局在化するために使用してもよい。これらの抗体は、ＤＬＬ４結合性アーム、および、細胞傷害剤（例えば、サポニン、抗インターフェロンα、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート、または放射性同位元素ハプテン）に結合するアームを持つ。二重特異性抗体は、完全長抗体として、または、抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ′）$_2$二重特異性抗体）として調製することが可能である。

【０２０６】

二重特異性抗体の作製法は当該分野において既知である。従来、二重特異性抗体の組み換え生産は、異なる特異性を持つ、二つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアの同時発現に基づいていた（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７（１９８３））。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クワドローマ）は、１０種の異なる抗体分子から成る混合物を生産する可能性があり、この内、適正な二重特異的構造を持つものはただ一つである。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって実行される、適正分子の精製は、面倒で、かつ、生産収率は低い。同様の手順が、１９９３年５月１３日公開の国際公開第９３／０８８２９号パンフレット、およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５（１９９１）に開示される。

【０２０７】

別の、より好ましい方法によれば、所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する、抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合は、少なくともヒンジの一部、ＣＨ２、およびＣＨ３領域を含む、免疫グロブリン定常ドメイン配列と行われることが好ましい。融合部の少なくとも一部において、軽鎖結合に必要な部位を含む、重鎖の第１定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合部、および、要すれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡを、別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時にトランスフェクションする。これによって、構築に使用される三つのポリペプチド鎖の不等比率が最適収率を与える実施態様において、三つのポリペプチド断片の相互比の調整に大きな融通性が得られる。しかしながら、少なくとも二つのポリペプチド鎖の、同等比の発現が高い収率をもたらすか、あるいは、その比は、特に重要性を持たない場合には、二つのポリペプチド鎖、または三つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を一つの発現ベクターに挿入することも可能である。

【０２０８】

本法の一つの好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、一アームに第１結合特異性、および、他方アームに、ハイブリッド免疫グロブリンの重鎖－軽鎖ペア（第２の結合特異性を与える）を有する、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖から構成される。この非対称構造は、所望の二重特異性化合物を、不要な免疫グロブリン鎖結合から容易に分離させることが見出された。なぜなら、免疫グロブリン軽鎖は、この二重特異性抗体の片方だけにしか存在しないので、分離がし易くなるからである。この方法は、国際公開第９４／０４６９０号パンフレットに記載される。二重特異性抗体の生成に関するさらに詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照されたい。

【０２０９】

もう一つの方法によれば、一対の抗体分子の界面を、組み換え細胞培養体から回収される、ヘテロダイマーのパーセントが最大となるように加工することが可能である。好ましい界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメンの、少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面の、一つ以上の小型アミノ酸側鎖が、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）によって置換される。大型側鎖（単数または複数）と同じ、又は近似の大きさを持つ相補的「腔」が、大型アミノ酸側鎖を、小型側鎖（例えば、アラニン、またはトレオニン）で置換することによって、第２抗体分子の界面に創出される。これによって、ホモダイマーなどの、他の、不要な最終産物を上回って、ヘテロダイマーの収率を上げるための機構が得られる。

【０２１０】

二重特異性抗体は、架橋結合される、または「ヘテロ接合される」抗体を含む。例えば、このヘテロ接合体における抗体の一方は、アビジンに結合させ、他方はビオチンに結合させることが可能である。このような抗体が、例えば、有害細胞に対して免疫系細胞を標的させるために（米国特許第４，６７６，９８０号）、および、ＨＩＶ感染の処置のために（国際公開第９１／００３６０号パンフレット、国際公開第９２／００３７３号パンフレット、および欧州特許第０３０８９号明細書）提案されている。ヘテロ接合抗体は、都合のよいものであれば、いずれの架橋結合法を用いて作製してもよい。好適な架橋結合剤は周知であり、いくつかの架橋結合法とともに、米国特許第４，６７６，９８０号明細書に記載される。

【０２１１】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術も文献に記載される。例えば、二重特異性抗体は、化学的結合を用いて調製することが可能である。Ｂｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）は、完全な抗体を、タンパク分解酵素によって切断して、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片を生成する手順を記載する。これらの断片は、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール複合体形成剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元する。次に、得られたＦａｂ′をチオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換する。次に、Ｆａｂ′－ＴＮＢ誘導体の一方を、メルカプトエチルアミンによって還元してＦａｂ′－チオールに再変換し、等モル量の、他方のＦａｂ′－ＴＮＢ誘導体と混ぜ合わせて、二重特異性抗体を形成する。生産された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定のための薬剤として使用することが可能である。

【０２１２】

最近の進歩によって、大腸菌からのＦａｂ′－ＳＨ断片の回収が容易になったが、これらの断片を化学的に結合して二重特異性抗体を形成することが可能である。Ｓｈａｌａｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）は、完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ′）$_2$分子の生産を記載する。各Ｆａｂ′断片は大腸菌から分離して分泌され、インビトロで管理された化学結合に供され二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、ＨＥＲ２受容体を過剰発現する細胞、および正常なヒトＴ細胞に結合が可能であるだけでなく、ヒトの乳癌目標物に対する、ヒトの細胞傷害性リンパ球の分解活性を誘導することが可能である。

【０２１３】

組み換え細胞培養体から二重特異性抗体断片を直接作製し、単離するために種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて生産されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク由来のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合によって結合させて、二つの異なる抗体から成るＦａｂ′部分とする。この抗体ホモダイマーを、ヒンジ領域において還元して、モノマーを形成し、次いで、再度酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はさらに、抗体ホモダイマーの生産のために利用することが可能である。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって記載される「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片作製の、別の機構を提供する。この断

片は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に、リンカーによって接続される重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含み、その際、リンカーが短すぎるために、同じ鎖における二つのドメインの間の対向は不可能とされる。したがって、一断片のＶＨおよびＶＬドメインは、別断片の相補的ＶＬおよびＶＨドメインと対向することを強制されるので、二つの抗原結合部位が形成される。単一鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーを用いて二重特異性断片を作製する、もう一つの戦略も報告されている。Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照されたい。

【０２１４】

２価を超える抗体も考慮の対象とされる。例えば、三重特異性抗体を調製することは可能である。Ｔｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

多価抗体

多価抗体は、該抗体が結合する抗原を過剰発現する抗体によって、二価抗体よりも速やかに取り込まれる（および／または異化される）と考えられる。本発明の抗体は、３個以上（例えば、４価抗体）の抗原結合部位を有する多価抗体（ＩｇＭクラスとは別に）であることが可能であり、このような抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸を組み換え的に発現することによって簡単に生産することが可能である。多価抗体は、ダイマー化ドメイン、および３個以上の抗原結合部位を含むことが可能である。好ましいダイマー化ドメインは、Ｆｃ領域またはヒンジ領域を含む（または、から成る）。このシナリオでは、抗体は、Ｆｃ領域、および、Ｆｅ領域に対してアミノ末端側を持つ３個以上の結合部位を含む。本発明において好ましい多価抗体は、３から約８個、好ましくは４個の抗原結合部位を含む（または、から成る）。この多価抗体は、二つ以上の可変ドメインを含む、少なくとも一つのポリペプチド鎖（および、好ましくは二つのポリペプチド鎖）を含む。例えば、ポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＤ１－（Ｘ１）ｎ－ＶＤ２－（Ｘ２）ｎ－Ｆｃを含んでもよい。前式において、ＶＤ１は第１可変ドメインであり、ＶＤ２は第２可変ドメインであり、Ｆｃは、Ｆｃ領域の一ポリペプチド鎖であり、Ｘ１およびＸ２は、アミノ酸またはポリペプチドであり、ｎは０または１である。例えば、このポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＨ－ＣＨ１－屈曲性リンカー－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖；または、ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖を含んでもよい。本発明の多価抗体は、さらに、少なくとも二つの（好ましくは、四つの）軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。本発明の多価抗体は、例えば、約２から約８個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでもよい。本発明の考察の対象とされる軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメイン、および、任意にさらにＣＬドメインを含む。

抗体変異種

ある実施態様では、本明細書に記載される抗体の、アミノ酸配列修飾体（単数または複数）も考察の対象とされる。例えば、抗体の結合親和性および／またはその他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、該抗体核酸の中に適切なヌクレオチド変化を導入することによって調製される。このような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内部の残基の欠失、および／または該残基への挿入、および／または、該残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを行って、最終構築体に、該最終構築体が所望の特性を有する限り、到達してもよい。アミノ酸変更は、配列決定が行われた時点で、被検抗体アミノ酸配列の中に導入されてもよい。

【０２１５】

突然変異誘発のための好ましい位置である、抗体のある残基または領域を特定するのに有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５によって記載されるもので「アラニン走査突然変異誘発法」と呼ばれる。この方法で、一残基、または一群の標的残基が特定され（例えば、ａｒｇ，ａｓｐ，ｈｉｓ，ｌｙｓ，およびｇｌｕなどの荷電残基）、該アミノ酸の抗原との相互作用に影響を及ぼすために、中性、または負に荷電したアミノ酸（もっとも好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）によって置換される。次に、その置換部位に、または、該

部位のために、さらにそれ以外の変異種を導入することによって、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置を微細に調節する。こうすると、アミノ酸配列変動を導入するための位置はあらかじめ指定されるが、突然変異の性質自体をあらかじめ指定する必要はない。例えば、ある任意の部位における突然変異の性能を分析するには、その標的コドンまたは領域においてａｌａ走査またはランダム突然変異誘発を行ない、発現された免疫グロブリンを、所望の活性についてスクリーニングする。

【０２１６】

アミノ酸配列の挿入は、長さが１残基から、百以上の残基を含むポリペプチドの範囲までの、アミノ－および／またはカルボキシ－末端融合ばかりでなく、単一または複数アミノ酸の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、Ｎ－末端メチオニル残基を有する抗体、または、細胞傷害性ポリペプチドに融合される抗体が挙げられる。抗体分子の、他の挿入性変異体としては、抗体のＮ－またはＣ－末端の、酵素（例えば、ＡＤＥＰＴ）、または、抗体の血清半減期を延長させるポリペプチドへの融合が挙げられる。

【０２１７】

ポリペプチドのグリコシル化は、通常、Ｎ－結合、またはＯ－結合である。Ｎ－結合とは、炭水化物成分の、アスパラギン残基の側鎖に対する付着を指す。トリペプチド配列、すなわち、Ｘがプロリン以外の任意のアミノ酸である、アスパラギン－Ｘ－セリン、および、アスパラギン－Ｘ－トレオニンは、アスパラギン側鎖に対する、炭水化物成分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおいてこれらトリペプチド配列のいずれかが存在すると、それは、可能なグリコシル化部位を創出する。Ｏ－結合グリコシル化は、糖類の内の一つ、Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの、ヒドロキシアミノ酸、もっとも一般的にはセリンまたはトレオニンに対する付着を指す。ただし、５－ヒドロキシプロリン、または５－ヒドロキシリシンを使用してもよい。

【０２１８】

抗体に対するグリコシル化部位の添加は、アミノ酸配列を、それが、前述のトリペプチド配列（Ｎ－結合グリコシル化部位のために）の内の一つ以上を含むように変えることによって好都合に実現される。変更はさらに、元の抗体の配列に、一つ以上のセリンまたはトレオニン残基を付加、または置換代入する（Ｏ－結合グリコシル化部位のために）ことによって実現してもよい。

【０２１９】

抗体がＦｃ領域を含む場合、それに付着される炭水化物は変えられてもよい。例えば、抗体のＦｃ領域に付着されるフコースを欠く、成熟炭水化物構造を有する抗体が、米国特許出願ＵＳ２００３／０１５７１０８号明細書（Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ．）に記載される。さらに、米国特許第２００４／００９３６２１号明細書（Ｋｙｏｗａ　Ｈａｋｋｏ　Ｋｏｇｙｏ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）を参照されたい。抗体のＦｃ領域に付着される２分性Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）を有する抗体が、国際公開第２００３／０１１８７８号パンフレット、Ｊｅａｎ－Ｍａｉｒｅｔ　ｅｔ　ａｌ．および米国特許第６，６０２，６８４号明細書、Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．に参照される。抗体のＦｃ領域に付着されるオリゴッサカリド中に少なくとも一つのガラクトース残基を有する抗体が、国際公開第１９９７／３００８７号パンフレット、Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．に報告される。さらに、そのＦｃ領域に変更炭水化物を付着させた抗体に関しては、国際公開第１９９８／５８９６４号パンフレット（Ｒａｊｕ，Ｓ．）および国際公開１９９９／２２７６４号パンフレット（Ｒａｊｕ，Ｓ．）を参照されたい。さらに、グリコシル化を修飾させた抗原結合分子については、米国特許第２００５／０１２３５４６号明細書（Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．）を参照されたい。

【０２２０】

本発明において好ましいグリコシル化変異種は、Ｆｃ領域に付着する炭水化物構造がフコースを欠くＦｃ領域を含む。このような変異種では、ＡＤＣＣ機能が改善される。Ｆｃ領域はさらに、その中に、ＡＤＣＣをさらに改善する、一つ以上のアミノ酸置換、例えば

、Ｆｃ領域の位置２９８、３３３、および／または３３４（残基のＥｕ番号付けによる）における置換を含む。「脱フコシル化」または「フコース欠乏」抗体に関する公刊物の例としては、米国特許第２００３／０１５７１０８号明細書；国際公開第２０００／６１７３９号パンフレット；国際公開第２００１／２９２４６号パンフレット；米国特許第２００３／０１１５６１４号明細書；米国特許第２００２／０１６４３２８号明細書；米国特許第２００４／００９３６２１号明細書；米国特許第２００４／０１３２１４０号明細書；米国特許第２００４／０１１０７０４号明細書；米国特許第２００４／０１１０２８２号明細書；米国特許第２００４／０１０９８６５号明細書；国際公開第２００３／０８５１１９号パンフレット；国際公開第２００３／０８４５７０号；国際公開第２００５／０３５５８６号；国際公開第２００５／０３５７７８号パンフレット；国際公開第２００５／０５３７４２号パンフレット；Ｏｋａｚａｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３６:１２３９－１２４９（２００４）；Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４（２００４）が挙げられる。脱フコシル抗体を生産する細胞系統の例としては、タンパクのフコシル化を欠くＬｅｃ１３ ＣＨＯ細胞が挙げられる（Ｒｉｐｋａ ｅｔ ａｌ．Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２４９：５３３－５４５（１９８６）；米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８Ａ１号明細書、Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ；および国際公開第２００４／０５６３１２Ａ１号パンフレット、Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，の特に実施例１１）、およびノックアウト細胞系統、例えば、アルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞（Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４（２００４））。

【０２２１】

もう一つのタイプの変異種は、アミノ酸置換変異種である。これらの変異種では、抗体分子の少なくとも一つのアミノ酸残基が、異なる残基によって置換される。置換による突然変異誘発にとってもっとも興味深い部位として、超可変領域が挙げられるが、ＦＲ変化も考慮の対象とされる。保存的置換が、「好ましい置換」という表題の下に表１に示される。もしもこのような置換が、生物学的活性に変化をもたらすならば、表１に「例示置換」と表示され、アミノ酸クラスに関連してさらに後述される、より実質的な変化を導入して、その産物をスクリーニングしてもよい。

【０２２２】

【表１】

元の残基	例示置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

抗体の生物学的特性の実質的修飾は、（ａ）置換区域のポリペプチドのバックボーン構造、例えば、シートまたは螺旋立体構造の維持、（ｂ）標的部位における分子の電荷または疎水性、または、（ｃ）側鎖の体積、に対するその作用において著明に異なる置換を選択することによって実現される。天然残基は、共通の側鎖特性に基づいて下記のようにグループ分けされる：

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；

（２）中性、親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；

（４）塩基性：ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；

（５）鎖の方向性に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ、および、

（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０２２３】

非保存的置換は、これらの内の１クラスの１メンバーを、別のクラスと交換することを必要とする。

【０２２４】

一タイプの置換変異種は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の、一つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる開発のために選ばれる変異種（単数または複数）は、その作製の元になった親抗体に比べて、生物学的特性が改善される。

このような置換変異種を生成するための好適な方法は、ファージディスプレイによるアフィニティー熟成を含む。簡単に言うと、超可変部位（例えば、６－７部位）を突然変異誘発して、各部位において可能な全てのアミノ酸置換を生成する。このようにして生成された抗体を、繊維状ファージ粒子から、各粒子内部にパックされるＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物に対する融合体として提示させる。次に、このファージディスプレイされる変異種を、本明細書に開示されるように、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を行って、抗原結合に著明に貢献する超可変領域残基を特定することが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、抗体および抗原間の接触点を特定するために、抗原・抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であろうと考えられる。このような接触残基および隣接残基は、本発明において改良を加えた技術による置換のための候補となる。一旦このような変異種が生成されたならば、この一連の変異種に対し、本明細書に記載されるようにスクリーニングを実施し、一つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を示す抗体を将来の開発のために選んでもよい。

【０２２５】

抗体のアミノ酸変異種をコードする核酸分子は、当該分野で既知の様々な方法によって調製される。そのような方法として、例えば、ただしこれらに限定されないが、天然供給源からの単離（天然の、アミノ酸配列変異種の場合）、または、オリゴヌクレオチド介在性（または、部位指向性）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、および、抗体の、以前に調製した変異種、または非変異種のカセット突然変異誘発が挙げられる。

【０２２６】

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのＦｃ領域に一つ以上のアミノ酸置換を導入して、Ｆｃ領域変異種を生成することが好ましい場合がある。このＦｃ領域変異種は、ヒンジシステインの位置も含む、一つ以上のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトのＦｃ領域配列（例えば、ヒトのＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４　Ｆｃ領域）を含んでもよい。本明細書の記載および従来技術の教示に一致して、ある実施態様では、本発明の方法に使用される抗体は、野生型抗体に比べ、例えば、Ｆｃ領域に一つ以上の変化を含んでもよいことが考えられる。にも拘らず、これらの抗体は、その野生型対応物に比べ、治療的有用性のために要求される、事実上同じ特徴を保持することが考えられる。例えば、国際公開第９９／５１６４２号パンフレットに記載されるように、例えば、Ｆｃ領域においてある変化を実行し、それが、Ｃｌｑ結合および／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）に変化（すなわち、上昇または低下）をもたらすことが考えられる。Ｆｃ領域変異種の、他の例については、さらに、Ｄｕｎｃａｎ　＆　Ｗｉｎｔｅｒ　Ｎａｔｕｒｅ　３２２：７３８－４０（１９８８）；米国特許第５，６４８，２６０号明細書；米国特許第５，６２４，８２１号明細書；および国際公開第９４／２９３５１号パンフレットを参照されたい。国際公開第００／４２０７２号パンフレット（Ｐｒｅｓｔａ）および国際公開第２００４／０５６３１２号パンフレット（Ｌｏｗｍａｎ）は、ＦｃＲに対する結合が向上または低減した抗体変異種を記載する。これら特許公開の内容を、引用により特に指定して本明細書に含める。さらに、Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい。半減期が延び、母親ＩｇＧの、胎児への転送を担当する、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）（Ｇｕｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）およびＫｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））に対する結合が上昇した抗体が、米国特許第２００５／００１４９３４Ａ１号明細書（Ｈｉｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）に記載される。これらの抗体は、Ｆｃ領域の、ＦｃＲｎに対する結合を上昇させる一つ以上の置換をその中に持つＦｃ領域を含む。Ｆｃ領域のアミノ酸配列を変化させ、Ｃ１ｑ結合能を上昇または低下させたポリペプチド変異種が、米国特許第６，１９４，５５１Ｂ１号明細書、国際公開９９／５１６４２号パンフレットに記載される。これら特許公開の内容を、引用により特に指定して本明細書に含める。さらに、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４:４１７８－４１８４（２０００

）を参照されたい。
抗体誘導体
本発明の抗体は、当該分野で既知で、簡単に入手が可能な、新たな非タンパク成分を含むようにさらに修飾することが可能である。抗体の誘導体形成に好適な成分は、水に可溶なポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー、またはランダムコポリマー）、および、デキストラン、またはポリ（ｎ－ビニールピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、酸化プロリプロピレン／酸化エチレンコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニールアルコール、およびそれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水におけるその安定性のために製造において有利である場合がある。このポリマーは、どのような分子量を有していてもよく、分枝しても、分枝してなくともよい。抗体に付着されるポリマーの数は変動してよいが、一つを超えるポリマーが付着される場合、それらは、同じ分子であっても、異なる分子であってもよい。一般に、誘導体形成のために使用されるポリマーの数および／または種類は、例えば、改善される抗体の特性または機能、その抗体誘導体が、定められた条件下で治療に使用されるのかどうかなどの配慮点に基づいて決定することが可能である。
所望の特性を有する抗体に関するスクリーニング
本発明の抗体は、当該分野で既知の種々のアッセイを用いて、その物理的／化学的特性および生物学的機能に関して解明することが可能である。ある実施態様では、抗体は、ＤＬＬ４に対する結合；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体活性化の低減または阻止；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体下流の分子シグナル伝達の低減または阻止；および／または、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体結合の遮断または阻止；および／または、内皮細胞増殖の増進；および／または、内皮細胞分化の抑制；および／または動脈分化の抑制；および／または、腫瘍血管還流の抑制；および／または、腫瘍、細胞増殖性障害、または癌の処置および／または予防；および／または、ＤＬＬ４発現および／または活性と関連する障害の処置または予防；および／または、Ｎｏｔｃｈ受容体発現および／または活性と関連する障害の処置また予防、の内の任意の一つ以上について特徴が解明される。
【０２２７】
精製抗体はさらに、一連のアッセイ、例えば、ただしこれらに限定されないが、Ｎ－末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、およびパパイン消化などによって特徴を解明することが可能である。
【０２２８】
本発明のある実施態様では、本発明において生産される抗体は、その生物活性に関して分析される。ある実施態様では、本発明の抗体は、その抗原結合活性について試験される。当該分野で既知で、本発明において使用することが可能な抗原結合アッセイとしては、例えば、ただし限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（固相酵素免疫測定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインＡイムノアッセイなどの技術を用いる、任意の直接的、または競合的結合アッセイが挙げられる。例示の抗原結合アッセイが、下記の実施例において示される。
【０２２９】
さらに別の実施態様では、本発明は、ＤＬＬ４に対する結合に関して、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体と競合する、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を提供する。このような競合抗体としては、抗体２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２によって認識されるＤＬＬ４

エピトープと同じ、または重複するＤＬＬ４エピトープを認識する抗体が挙げられる。このような競合抗体は、標識された２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体と競合して、固定されたＤＬＬ４に結合する抗ＤＬＬ４ハイブリドーマの上清をスクリーニングすることによって獲得することが可能である。無関係抗体を含む（または、抗体無しの）コントロール結合混合物において検出される結合標識抗体の量に比べて、競合抗体を含むハイブリドーマ上清は、対象競合結合混合物において検出される結合標識抗体の量を低下させる。本明細書に記載される競合結合アッセイは、いずれも、前記手順に使用するのに好適である。

【０２３０】

別の局面では、本発明は、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の一つ以上の（例えば、２、３、４、５、および／または６個の）ＨＶＲを含む、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を提供する。２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の、一つ以上のＨＶＲを含む、抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体は、２６．６、２６．１４、２６．２０、２６．３４、および／または２６．８２抗体の一つ以上のＨＶＲ（単数または複数）を、鋳型抗体配列、例えば、マウス親抗体の対応配列にもっとも近似する、ヒトの抗体配列に、あるいは、親抗体の軽鎖または重鎖の特定サブグループの全てのヒト抗体の共通配列に移植し、かつ、このようにして得られた、付属の定常領域配列（単数または複数）を持つか、または持たない、キメラ軽鎖および／または重鎖可変領域配列（単数または複数）を、本明細書に記載されるように、組み換え宿主細胞において発現させることによって構築することが可能である。

【０２３１】

本明細書に記載される独特の特性を有する、本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、好都合な、いずれかの方法によって、所望の特性について抗ＤＬＬ４ハイブリドーマクローンをスクリーニングすることによって獲得することが可能である。例えば、もしも、ＤＬＬ４に対するＮｏｔｃｈ受容体の結合を阻止するか、または阻止しない抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を望むのであれば、候補抗体を、競合結合アッセイにおいて、例えば、プレートウェルにＤＬＬ４を塗布し、対象とするＮｏｔｃｈ受容体を過剰に含む抗体液を、該塗布プレートに重層し、結合抗体を酵素的に、例えば、競合結合ＥＬＩＳＡであって、結合抗体を、ＨＲＰ－結合抗Ｉｇ抗体か、または、ビオチニル化抗Ｉｇ抗体に接触させ、プレートを、例えば、ストレプトアビジン－ＨＲＰおよび／または過酸化水素で現像してＨＲＰ発色反応を起こさせ、ＥＬＩＳＡプレートリーダーによる４９０ｎｍにおける分光光度計測によってそのＨＲＰ発色反応を検出する、ＥＬＩＳＡを用いて試験することが可能である。

【０２３２】

一実施態様では、本発明は、エフェクター機能の全ては持たないが、その若干を所有する変更抗体を考慮の対象とする。このような抗体は、あるエフェクター機能（例えば、補体、およびＡＤＣＣ）は不要であるか、有害であるが、インビボにおける抗体半減期が重要な、多くの応用において望ましい候補となる。ある実施態様では、生産される免疫グロブリンのＦｃ活性が、所望の特性だけが保持されることを確かめるために測定される。ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ活性の低下／消失を確かめるために、インビトロおよび／またはインビボ細胞傷害性アッセイを実行することが可能である。例えば、抗体が、ＦｃγＲ結合を欠く（したがって、ＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎ結合活性は保持することを確かめるために、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを実行することが可能である。ＡＤＣＣを仲介する一次細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現するが、一方、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞におけるＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９：４５７－９２（１９９１）の４６４ページの表３にまとめられる。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するインビトロアッセイの一例が、米国特許第５，５００，３６２号明細書または同第５，８２１，３３７号明細書に記載される。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞として、抹消血単球（ＰＢＭＣ）、およびナチュラルキラー

（ＮＫ）細胞が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、対象分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ａ ９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるものと同様の動物モデルにおいて評価してもよい。さらに、抗体が、Ｃ１ｑに結合できないこと、したがって、ＣＤＣ活性を欠くことを確かめるために、Ｃ１ｑ結合アッセイを実行してもよい。補体活性を評価するために、ＣＤＣアッセイ、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載されるようなＣＤＣアッセイを実行してもよい。さらに、ＦｃＲｎ結合、およびインビボクリアランス／半減期定量を、当該分野で既知の方法、例えば、実施例セクションに記載される方法を用いて実行することも可能である。

ベクター、宿主細胞、および組み換え法

本発明の抗体を組み換え生産するためには、該抗体をコードする核酸を単離し、複製可能なベクターに挿入し、さらにクローニング（ＤＮＡの増幅）、または発現させる。抗体をコードするＤＮＡは、通例手順を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）、簡単に単離され、配列決定される。多くのベクターが市販されている。ベクターの選択は、一部は、使用される宿主細胞に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核性であるか、真核性（一般に、哺乳動物起源）である。この目的のためには、任意のアイソタイプの定常領域、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥ定常領域などの使用が可能であること、および、このような定常領域は、ヒトまたは、任意の動物種から入手が可能であることが理解されよう。

【０２３３】

ａ．原核宿主細胞による抗体の生成

ｉ．ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的組み換え技術を用いて獲得することが可能である。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞などの抗体生産細胞から単離し、配列決定してもよい。それとは別に、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機、またはＰＣＲ技術を用いて合成することも可能である。一旦獲得されたならば、ポリペプチドをコードする配列は、原核細胞宿主において、複製し、異種ポリヌクレオチドを発現することが可能な組み換えベクターに挿入される。市販され、当該分野で既知の多くのベクターが、本発明の目的のために使用が可能である。適切なベクターの選択は、主に、そのベクターに挿入される核酸のサイズ、および、そのベクターによって形質転換される特定宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅または発現、またはその両方）、および、それが存在する特定宿主細胞との適合性に応じて、種々の成分を含む。ベクターの成分としては、一般に、例えば、ただしこれらに限定されないが：複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、シグナル配列、異種核酸挿入体、および転写終結配列が挙げられる。

【０２３４】

一般に、宿主細胞と適合する動物種から得られた、レプリコンおよび調節配列を含むプラスミドが、これらの宿主と組み合わされて使用される。このベクターは、通常、複製部位のほか、形質転換細胞において表現型選択を与えることが可能なマーキング配列を有す。例えば、大腸菌は、通常、大腸菌種から得られたプラスミドであるｐＢＲ３２２によって形質転換される。ｐＢＲ３２２は、アンピシリン（Ａｍｐ）およびテトラサイクリン（Ｔｅｔ）耐性をコードする遺伝子を含むので、形質転換細胞を特定するための簡単な手段を提供する。ｐＢＲ３２２、その誘導体、または、他の微生物プラスミド、またはバクテリオファージはさらに、内因性タンパクの発現のために該微生物によって使用されるプロモーターを含んでもよく、あるいは、含むように修飾されてもよい。特定抗体の発現のために使用されるｐＢＲ３２２の例が、Ｃａｒｔｅｒらの、米国特許第５，６４８，２３７号明細書に詳述される。

【０２３５】
さらに、宿主微生物と適合するレプリコンおよび調節配列を含むファージベクターも、これらの宿主と関連する形質転換ベクターとして使用することが可能である。例えば、λＧＥＭ（商標）－１１などのバクテリオファージは、大腸菌ＬＥ３９２などの、感受性宿主細胞の形質転換に使用することが可能な組み換えベクターの作製に利用することが可能である。
【０２３６】
本発明の発現ベクターは、それぞれ、各ポリペプチド成分をコードする、二つ以上のプロモーター－シストロンペアを含んでもよい。プロモーターとは、シストロンに対して上流（５′）に位置し、シストロンの発現を変調する、翻訳されない、調整配列である。原核細胞プロモーターは、通常、二つのクラス、誘導性および構成的に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養分の有無、または温度変化に応じて、その調節下のシストロンの転写レベルの上昇を起動するプロモーターである。
【０２３７】
種々の可能な宿主細胞によって認識される、たくさんのプロモーターがあり、それらはよく知られる。選択されるプロモーターは、制限酵素消化によって元のＤＮＡからプロモーターを取り除き、該単離プロモーター配列を、本発明のベクターの中に挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作動可能に連結することが可能である。標的遺伝子の直接的増幅および／または発現のために、天然のプロモーター配列、および多数の異種プロモーターの両方の使用が可能である。ある実施態様では、異種プロモーターが利用される。それは、一般に、天然標的ポリペプチドプロモーターと比べて、異種プロモーターの方が、標的遺伝子の発現において、より大きな転写、およびより高い収率を可能とするからである。
【０２３８】
原核性宿主において使用するのに好適なプロモーターとしては、Ｐｈｏ　Ａプロモーター、β－ガラクタマーゼ、およびラクトースプロモーターシステム、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーターシステム、およびハイブリッドプロモーター、例えば、ｔａｃまたはｔｒｃプロモーターが挙げられる。しかしながら、細菌において機能的な、他のプロモーター（例えば、他の、既知の細菌またはファージプロモーター）も同様に好適である。それらのヌクレオチド配列は公表されているので、当業者であれば、それらを、任意の必要制限部位を供給するように、リンカーまたはアダプターを用いて、標的軽鎖および重鎖をコードするシストロンに作動可能に連結することが可能である（Ｓｉｅｂｅｎｌｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８０）　Ｃｅｌｌ　２０：２６９）。
【０２３９】
本発明の一局面では、組み換えベクター内の各シストロンは、発現されたポリペプチドの、膜を横断する転置を指令する、分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの一成分であってもよいし、あるいは、ベクターの中に挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であってもよい。本発明のために選ばれるシグナル配列は、宿主細胞によって認識、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものでなければならない。異種ポリペプチドに付属のシグナル配列を認識し、処理しない原核宿主細胞の場合は、そのシグナル配列は、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐ、または熱安定エンテロトキシンＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡ、およびＭＢＰから成る群から選ばれる、原核性シグナル配列によって置換される。本発明の一実施態様では、発現システムの両シストロンに使用されるシグナル配列は、ＳＴＩＩシグナル配列、およびその変異種である。
【０２４０】
別局面では、本発明による免疫グロブリンの生産は、宿主細胞の細胞原形質で起こることも可能であり、したがって、各シストロンの内部に分泌シグナル配列の存在を要しない。この場合、免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、細胞原形質内部で発現され、フォールド形成し、組立てされて機能的免疫グロブリンを形成する。ある宿主株（例えば、大腸菌

ｔｒｘＢ－株）は、ジスルフィド結合の形成に有利な細胞原形質条件を提供し、そのため、発現されたタンパクサブユニットの適切なフォールド形成および組立てが可能となる。Ｐｒｏｂａ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ｇｅｎｅ，１５９：２０３（１９９５）。

【０２４１】

本発明の抗体の発現に好適な原核宿主細胞としては、古細菌、および真正細菌、例えば、グラム陰性、またはグラム陽性生物が挙げられる。有用な細菌の例としては、例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｂａｃｉｌｌｉ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｐｓｕｄｏｍｏｎａｓ種（例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｒｈｉｚｏｂｉａ、Ｖｉｔｒｅｏｓｃｉｌｌａ、またはＰａｒａｃｏｃｃｕｓが挙げられる。一実施態様では、グラム陰性細胞が使用される。一実施態様では、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）細胞が、本発明のために宿主として使用される。大腸菌株の例としては、Ｗ３１１０（Ｂａｃｈｍａｎｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９８７），ｐｐ．１１９０－１２１９；ＡＴＣＣ（登録商標）寄託番号２７，３２５）、および、その誘導体、例えば、遺伝型Ｗ３１１０ΔｆｈｕＡ（ΔｔｏｎＡ）ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ΔｏｍｐＴΔ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ｄｅｇＰ４１ ｋａｎＲ（米国特許第５，６３９，６３５号明細書）を有する３３Ｄ３株などが挙げられる。その他の株、およびその誘導体、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉＢ、Ｅ．ｃｏｌｉλ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）、およびＥ．ｃｏｌｉＲＶ３０８（ＡＴＣＣ３１，６０８）も適切である。これらの例は、限定的なものではなく、例示のためである。定められた遺伝型を有する、前述の細菌の内のいずれかについて、その誘導体を構築する方法は、当該分野で既知であり、例えば、Ｂａｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）に記載される。一般に、細菌細胞におけるレプリコンの複製性能を考慮に入れながら、適切な細菌を選ぶことが必要である。例えば、レプリコンを供給するのに、周知のプラスミド、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、またはｐＫＮ４１０が使用される場合、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、またはＳａｌｍｏｎｅｌｌａを好適に使用することが可能である。通常、宿主細胞は、最低量のタンパク分解酵素を分泌する必要があり、細胞培養体にはさらに新たにプロテアーゼ阻害剤を取り込ませることが好ましい。

ｉｉ 抗体生産

宿主細胞は、前述の発現ベクターによって形質転換させられ、プロモーターを誘導するように適宜改変された、通例の栄養培地において培養され、形質転換株が選択され、または、所望の配列をコードする遺伝子が増幅される。

【０２４２】

形質転換とは、原核宿主の中に、ＤＮＡを、該ＤＮＡが、染色体外要素として、または、染色体内組み込み体として複製可能となるように導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、その細胞に適切な標準技術を用いて実行される。一般に、しっかりした細胞壁障壁を含む細菌細胞に対しては、塩化カルシウムによるカルシウム処理が用いられる。形質転換のためのもう一つの方法は、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯを用いる。使用される、さらにもう一つの技術は、電気穿孔である。

【０２４３】

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核細胞は、当該分野で既知で、選ばれた宿主細胞の培養に好適な培地において育成される。好適な培地の例としては、例えば、必要栄養添加物を加えたルリアブロス（ＬＢ）が挙げられる。ある実施態様では、培地はさらに、発現ベクターを含む原核細胞の増殖を選択的に可能とするために、発現ベクターの構築に基づいて選ばれる選択剤を含む。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のために、培地にアンピシリンが加えられる。

【０２４４】
さらに、炭素、窒素、および無機リン酸供給源の外に、任意の必要添加物が、単独で、または、別の添加物との混合物として、または、窒素複合供給源などの媒体として、適切な濃度で含まれてもよい。培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール、およびジチオスレイトールから成る群から選ばれる一つ以上の還元剤を任意に含んでもよい。
【０２４５】
原核宿主細胞は、適切な温度で培養される。大腸菌増殖のためには、例えば、好ましい温度は、約２０℃から約３９℃の範囲、より好ましくは約２５℃から約３７℃の範囲、さらに好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に、宿主生物に依存して、約５から約９の範囲内の任意のｐＨであってもよい。大腸菌の場合、ｐＨは、好ましくは約６．８から約７．４、より好ましくは約７．０である。
【０２４６】
本発明の発現ベクターにおいて誘導性プロモーターが使用される場合、タンパク発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一局面では、ポリペプチドの転写調節のために、ＰｈｏＡプロモーターが使用される。したがって、形質転換される宿主細胞は、誘導のために、リン酸塩制限培地において培養される。リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地であることが好ましい（例えば、Ｓｉｍｍｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ(２００２)，２６３：１３３－１４７を参照）。当該分野で知られるように、用いられるベクター構築体にしたがって、外にも、種々の誘導因子を使用してよい。
【０２４７】
一実施態様では、本発明の発現ポリペプチドは、宿主細胞のペリプラズムに分泌され、ペリプラズムから回収される。タンパク回収は、微生物を、一般には、浸透圧ショック、超音波処理、または溶菌などの手段によって破壊することを含む。一旦細胞が破壊されたならば、細胞破片または全体細胞は、遠心またはろ過によって除去してもよい。タンパクはさらに、例えば、アフィニティー樹脂クロマトグラフィーニよって精製してもよい。それとは別に、タンパクは、培地に移し、その中で単離することも可能である。細胞を、培養物から取り出し、培養上清をろ過し、濃縮して、生産されたタンパクをさらに精製してもよい。さらに、この発現ポリペプチドを、周知の方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）、およびウェスタンブロットアッセイを用いて単離し、特定することも可能である。
【０２４８】
本発明の一局面では、抗体生産は、発酵プロセスによって大量に実行される。組み換えタンパクの生産のためには、種々の大規模流加発酵手順が利用可能である。大規模発酵は、少なくとも１０００リットル容量、好ましくは約１，０００から１００，０００リットル容量を有する。これらの発酵槽は、酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を拡散させるために攪拌インペラーを用いる。小規模発酵とは、一般に、容積が約１００リットル未満の発酵槽における発酵を指し、約１リットルから約１００リットルの範囲にあることが可能である。
【０２４９】
発酵プロセスでは、タンパク発現の誘導は、通常、細胞が、適切な条件下で所望の密度、例えば、ＯＤ５５０が約１８０－２２０となるまで育成された後、すなわち、細胞が初期の静止期に達した段階で、起動される。当該分野で既知のように、かつ、前述のように、使用されるベクター構築体に応じて、各種の誘起因子の使用が可能である。細胞は、誘導前に、より短い期間育成してもよい。細胞は、通常、約１２－５０時間誘導されるが、それよりも長いか、または短い誘導時間を使用してもよい。
【０２５０】
本発明のポリペプチドの生産収率および品質を上げるために、様々の発酵条件を改変することが可能である。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切な組立ておよびフォー

ルド形成を向上させるために、シャペロンタンパク、例えば、ＤｓｂタンパクＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｃＣ、ＤｓｂＤ、および／またはＤｓｂＧ）、またはＦｋｐＡ（シャペロン活性を有する、ペプチジルプロリル・シス、トランス－イソメラーゼ）を過剰発現する添加ベクターを用いて、宿主原核細胞を共時形質転換することが可能である。このシャペロンタンパクは、細菌宿主細胞において生産される異種タンパクの適切なフォールド形成および可溶性を促進することが示されている。Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１９６０１－１９６０５；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０８３，７１５号明細書；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第６，０２７，８８８号明細書；Ｂｏｔｈｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１００－１７１０５；Ｒａｍｍ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１７１０６－１７１１３；Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３９：１９９－２１０。

【０２５１】

発現される異種タンパク（特に、タンパク分解に感受性を持つもの）の分解を最小にするために、タンパク分解酵素を欠乏する、いくつかの宿主株を本発明のために使用することが可能である。例えば、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ、およびそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子突然変異（単数または複数）を実現するように、宿主細胞株を修飾してもよい。いくつかの大腸菌のプロテアーゼ欠損株が市販されており、例えば、Ｊｏｌｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８）上記；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，２６４，３６５号明細書；Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５０８，１９２号明細書；Ｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，２：６３－７２（１９９６）に記載される。

【０２５２】

一実施態様では、タンパク分解酵素を欠き、かつ、一つ以上のシャペロンタンパクを過剰発現するプラスミドによって形質転換される大腸菌株が、本発明の発現システムにおける宿主細胞として使用される。

ｉｉｉ．抗体精製

当該分野で既知の標準的タンパク精製法の使用が可能である。下記の手順は、適切な精製手順を示す例示的なものである：免疫アフィニティーまたはイオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、ＤＥＡＥなどの、シリカまたは陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、および、例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－７５使用のゲルろ過。

【０２５３】

一局面では、固相の上に固定されたプロテインＡが、本発明の、完全長抗体産物の免疫アフィニティー精製のために使用される。プロテインＡは、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅａｓから得られた、４１ｋＤの細胞壁タンパクであり、抗体のＦｃ領域に対して高い親和性をもって結合する。Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３。プロテインＡが固定される固相は、ガラスまたはシリカ表面を含むカラムであることが好ましく、より好ましくは孔調節ガラスカラム、またはケイ酸カラムである。ある応用では、カラムは、汚染物質の、非特異的結合を防止する試みとして、グリセロールなどの試薬によってコートされる。

【０２５４】

精製の第１段階として、前述のようにして細胞培養体から得た調製品を、プロテインＡが固定された固相に与え、対象抗体をプロテインＡに特異的に結合させる。次に、この固相を洗浄し、固相に非特異的に結合した汚染物質を除去する。最後に、対象抗体を、溶出によって固相から取り除く。

【０２５５】

ｂ．真核宿主細胞を用いて抗体を生成する

一般に、ベクター成分としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、下記：シグナル配列、複製起点、一つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列、の内の一つ以上が挙げられる。

【０２５６】

（ｉ）シグナル配列成分

真核宿主細胞に使用されるベクターはさらに、対象成熟タンパクまたはポリペプチドのＮ－末端に特異的切断部位を有する、シグナル配列または他のポリペプチドを含んでもよい。選ぶことが好ましい異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞の発現では、哺乳動物シグナル配列のほか、ウィルスの分泌リーダー、例えば、ｈｅｒｐｅｓ ｓｉｍｐｌｅｘ ｇＤシグナルも利用可能である。

【０２５７】

この前駆領域のＤＮＡは、抗体をコードするＤＮＡに対し読み枠を一致させて連結される。

【０２５８】

（ｉｉ）複製起点

一般に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには不要である。例えば、ＳＶ４０起点は、通常、ただ、それが早期プロモーターを含むために使用される。

【０２５９】

（ｉｉｉ）選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる、選択遺伝子を含んでもよい。典型的選択遺伝子は、（ａ）抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク、（ｂ）栄養欠乏を補償するタンパク、関連して、または（ｃ）複合培地からは得られない必須栄養素を供給するタンパク、をコードする。

【０２６０】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止させる薬剤を利用する。異種遺伝子によって思い通りに形質転換された細胞は、薬剤耐性を付与するタンパクを生産し、選択処方を生き延びる。このような優勢選択の例は、薬剤のネオマイシン、マイコフェノール酸、およびハイグロマイシンを用いる。

【０２６１】

哺乳動物細胞のために好適な選択可能マーカーの、もう一つの例は、抗体核酸を取り込むことが可能な細胞の特定を可能とするもの、例えば、ＤＨＦＲ、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン－Ｉおよび－ＩＩ、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

【０２６２】

例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、全ての形質転換体を、ＤＨＦＲの競合的拮抗剤である、メトトレキセート（Ｍｔｘ）を含む培地において培養することによって特定される。野生型ＤＨＦＲを用いる場合、適切な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性を欠く、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞系列（例えば、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－９０９６）である。

【０２６３】

それとは別に、抗体、野生型ＤＨＦＲタンパク、および、もう一つの選択可能マーカー、例えば、アミノグリコシド３′－フォスフォトランスフェラーゼ（ＡＰＨ）をコードするＤＮＡ配列によって形質転換されるか、または同時形質転換される宿主細胞（特に、内因性ＤＨＦＲを含む野生型宿主細胞）は、選択可能マーカーのための選択剤、例えば、カナマイシン、またはＧ４１８を含む培地において細胞増殖することによって選択することが可能である。米国特許第４，９６５，１９９号明細書を参照されたい。

【０２６４】

（ｉｖ）プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗体ポリペプチド核酸に作動可能に連結されるプロモーターを含む。真核細胞のためのプロモーターは既知である。ほぼ全ての真核細胞は、転写が起動される部位から約２５から３０塩基上流にＡＴに富んだ領域を配置させる。多くの遺伝子の転写開始点から７０から８０塩基上流に見出されるもう一つの配列は、ＣＮＣＡＡＴ領域であり、この式において、Ｎは任意のヌクレオチドであってもよい（配列番号６０）。多くの真核細胞遺伝子の３′末端には、ＡＡＴＡＡＡ配列がある。これは、コード配列の３′末端（配列番号６１）に対するポリＡ付加のシグナルとなると考えられる。これらの配列は全て、真核細胞発現ベクターの中に適切に挿入される。

【０２６５】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターによる抗体ポリペプチドの転写は、そのプロモーターが宿主細胞システムと適合する限り、例えば、ウィルスのゲノム、例えば、ポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス、アデノウィルス（例えば、アデノウィルス２）、牛パピローマウィルス、鳥類肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス、およびシミアンウィルス４０（ＳＶ４０）のゲノムから得られるプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーター、または免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって調節される。

【０２６６】

ＳＶ４０ウィルスの早期および後期プロモーターは、好都合にも、さらにＳＶ４０ウィルスの複製起点を含む、ＳＶ４０制限断片として得られる。ヒトのサイトメガロウィルスの初期プロモーターは、好都合にも、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限断片として得られる。ベクターとして牛パピローマウィルスを用いる、哺乳動物宿主におけるＤＮＡ発現システムが、米国特許第４，４１９，４４６号明細書に開示される。このシステムの改変版が、米国特許第４，６０１，９７８号明細書に記載される。それとは別に、ラウス肉腫ウィルスの長い末端反復列も、プローモーターとして使用することが可能である。

【０２６７】

（ｖ）エンハンサー要素成分

比較的高度な真核細胞による、本発明の抗体ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増大することがよくある。現在では、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトタンパク、およびインスリン）について多くのエンハンサーが知られる。しかしながら、通常、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後期側（ｂｐ１００－２７０）のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウィルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウィルスエンハンサーが挙げられる。さらに、真核細胞プロモーター活性化のための促進要素について、Ｙａｎｉｖ，Ｎａｔｕｒｅ　２９７：１７－１８（１９８２）を参照されたい。エンハンサーはスプライスされて、抗体ポリペプチドコード配列に対して、５′または３′側の位置においてベクター中に挿入されてもよいが、プロモーターから５′側の部位に配置されることが好ましい。

【０２６８】

（ｖｉ）転写終結成分

真核宿主細胞において使用される発現ベクターは、通常、転写を終結させ、ｍＲＮＡを安定化するのに必要な配列をさらに含む。このような配列は、一般に、真核細胞またはウィルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの５′、および時には３′の未翻訳領域から得られる。これらの領域は、抗体をコードするｍＲＮＡの未翻訳部分中のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分は、牛成長ホルモンのポリアデニル化領域である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレット、およびそこに開示される発現ベクターを参照されたい。

【０２６９】

（ｖｉｉ）宿主細胞の選択および形質転換

本発明のベクターにおいてＤＮＡをクローニングし、発現するのに好適な宿主細胞としては、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書に記載される、比較的高度な真核細胞が挙げられる。培養において脊椎動物細胞を継代することは（組織培養）は、通例手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞の例として、ＳＶ４０で形質転換した、サル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１）；ヒト胚腎臓系統（２９３細胞、または、縣濁培養による育成のためにサブクローンされた２９３細胞、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；新生児ハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．７７：４２１６（１９８０））；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））；サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７０）；アフリカ緑猿腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒトのヘパトーム系統（Ｈｅｐ　Ｇ２）がある。

【０２７０】

宿主細胞は、抗体生産のために、前述の発現またはクローニングベクターによって形質転換され、プロモーターを誘導するために適宜に改変された通例の栄養培地において培養され、形質転換体が選択され、所望の配列をコードする遺伝子が増幅される。

【０２７１】

（ｖｉｉｉ）宿主細胞を培養する

本発明の抗体を生産するために使用される宿主細胞は、種々の培地において培養してよい。市販の培地、例えば、Ｈａｍ′ｓ　Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ））、およびＤｕｌｂｅｃｃｏの改変Ｅａｇｌｅ培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）は、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、Ｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９）、Ｂａｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０）、米国特許第４，７６７，７０４号明細書；同第４，６５７，８６６号明細書；同第４，９２７，７６２号明細書；同第４，５６０，６５５号明細書；または同第５，１２２，４６９号明細書；国際公開第９０／０３４３０号パンフレット；同第８７／００１９５号パンフレット；または米国再発行特許第Ｒｅ．３０，９８５号明細書に記載される培地の内のいずれかを、宿主細胞の培養培地として使用してもよい。これらの培地は、いずれも、ホルモンおよび／またはその他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または表皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、バッファー（例えば、ＨＥＰＥＳ）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬剤）、微量要素（通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、および、グルコース、または当量エネルギー供給源を、適宜、補給されてもよい。さらに、その他、当業者には知られると考えられる、必要添加物は、いずれのものでも適切な濃度において含めてよい。培養条件、例えば、温度、ｐＨなどは、発現のために選択された宿主について以前に使用されているものであり、当業者にとっては明白であろう。

【０２７２】

（ｉｘ）抗体の精製

組み換え技術を用いる場合、抗体は、細胞内に生産することが可能であるし、あるいは、培地中に直接分泌させることも可能である。抗体が細胞内で生産される場合、第１工程

として、宿主細胞または分解断片のものである粒状破片を、例えば、遠心またはろ過によって除去する。抗体が培地に分泌される場合は、一般的には先ず、その発現システムから得られた上清を、市販のタンパク濃縮フィルター、例えば、Ａｍｉｃｏｎ、またはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ（登録商標）限外ろ過ユニットを用いて濃縮する。前記工程のいずれかに、ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を含めてもよく、かつ、外来汚染菌の増殖を防止するため抗生物質を含めてもよい。

【０２７３】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することが可能であるが、アフィニティークロマトグラフィーが、好ましい精製技術である。アフィニティーリガンドとしてプロテインＡが好適であるかどうかは、抗体中に存在する免疫グロブリンＦｃドメインの種類およびアイソタイプに依存する。ヒトのγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するにはプロテインＡを用いることが可能である（Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３（１９８３））。マウスの全アイソタイプ、およびヒトのγ３に対してはプロテインＧが薦められる（Ｇｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．５：１５６７１５７５（１９８６））。アフィニティーリガンドが付着される基質は、多くの場合、アガロースであるが、他の基質も利用可能である。機械的に安定な基質、例えば、孔調節ガラス、またはポリ（スチレンジビニール）ベンゼンの場合、アガロースにおいて実現可能なものよりも、より速い流速、およびより短い処理時間が可能となる。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｉｐｓｂｕｒｇ，ＮＪ）が、精製のために有用である。タンパク精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）によるクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）によるクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈殿などの技術も、回収される抗体に応じて利用が可能である。

【０２７４】

いずれかの予備精製工程（単数または複数）の後、対象抗体および汚染物質を含む混合物に対し、約２．５－４．５のｐＨの溶出バッファーを用い、好ましくは低い塩濃度において（例えば、約０－０．２５Ｍの塩）、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーを実施してもよい。

免疫複合体

本発明はさらに、細胞傷害剤、例えば、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、トキシン（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の、酵素的に活性なトキシン、またはその断片）、または放射性同位元素に結合させた（すなわち、放射性複合体）、本明細書に記載される、いずれかの抗ＤＬＬ４抗体を含む免疫複合体（「抗体－薬剤複合体」または“ＡＤＣ”と相互交換的に使用される）を提供する。

【０２７５】

癌の処置において、細胞傷害性または細胞増殖抑制性薬剤、すなわち、腫瘍細胞を殺すか、増殖抑制する薬剤の局所的送達のために抗体－薬剤複合体を用いることは（Ｓｙｒｉｇｏｓ　ａｎｄ　Ｅｐｅｎｅｔｏｓ（１９９９）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１９：６０５－６１４；Ｎｉｃｕｌｅｓｃｕ－Ｄｕｖａｚ　ａｎｄ　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（１９９７）Ａｄｖ．Ｄｒｇ　Ｄｅｌ．Ｒｅｖ．２６：１５１－１７２；米国特許第４，９７５，２７８号明細書）、腫瘍に対する薬剤成分の標的指向性送達、および該腫瘍における細胞内蓄積を可能とする。一方、これらの薬剤が、結合されずに全身投与された場合、排除することを求める腫瘍細胞の外に、正常細胞にたいしても受け容れがたいほどのレベルの毒性をもたらす可能性がある（Ｂａｌｄｗｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８６）Ｌａｎｃｅｔ　ｐｐ．（Ｍａｒ．１５，１９８６）：６０３－０５；Ｔｈｏｒｐｅ，（１９８５）“Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃａｒｒｉｅｒｓ　Ｏｆ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ａｇｅｎｔ

ｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ '８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａ．Ｐｉｎｃｈｅｒａ ｅｔ ａｌ．（ｅｄ．ｓ），ｐｐ．４７５－５０６）。このようにして、毒性を最小にしながら最大の効力が求められる。この戦略では、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が有用であると報告されている（Ｒｏｗｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２１：１８３－８７）。この方法に使用される薬剤としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンデシンが挙げられる（Ｒｏｗｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）上記）。抗体－トキシン複合体において使用されるトキシンとしては、細菌トキシン、例えば、ジフテリアトキシン、植物トキシン、例えば、リシン、小型分子トキシン、例えば、ゲルダナマイシン（Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｊｏｕｒ．ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．９２（１９）：１５７３－１５８１；Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １０：１０２５－１０２８；Ｍａｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３：７８６－７９１）、マイタンシノイド（欧州特許第１３９１２１３号明細書；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：８６１８－８６２３）、およびカリケアミシン（Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：２９２８；Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：３３３６－３３４２）が挙げられる。これらのトキシンは、チューブリン結合、ＤＮＡ結合、またはトポイソメラーゼ抑制を含む機構によって、その細胞毒性および細胞増殖抑制作用を実行すると考えられる。ある細胞毒性薬剤は、大きな抗体、またはタンパク受容体リガンドに結合されると、不活性になるか、より活性が低くなる傾向がある。

【０２７６】

ＺＥＶＡＬＩＮ（登録商標）（イブリツモマブチューキセタン、Ｂｉｏｇｅｎ／Ｉｄｅｃ）は、抗体－放射性同位元素複合体であって、正常および悪性Ｂリンパ球の表面に見られるＣＤ２０抗原に対して向けられる、マウスＩｇＧ１カッパモノクローナル抗体、および、^{111}Ｉｎまたは^{90}Ｙ放射性同位元素が、チオウレアリンカー－キレート剤によって結合されて構成される複合体である（Ｗｉｓｅｍａｎ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｅｕｒ．Ｊｏｕｒ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．２７（７）：７６７－７７；Ｗｉｓｅｍａｎ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｂｌｏｏｄ ９９（１２）：４３３６－４２；Ｗｉｔｚｉｇ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０（１０）：２４５３－６３；Ｗｉｔｚｉｇ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０（１５）：３２６２－６９）。ＺＥＶＡＬＩＮは、Ｂ細胞非ホジキン型リンパ腫（ＮＨＬ）に対しては活性を有するが、投与は、多くの患者において重篤な、長期の血球欠乏症をもたらす。ＭＹＬＯＴＡＲＧ（商標）（ゲムツズマブオゾガマイシン、Ｗｙｅｔｈ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）は、カリケアマイシンに連結させたヒトＣＤ３３抗体から構成される抗体薬剤複合体であるが、急性骨髄性白血病の注射処置として２０００年に承認された（Ｄｒｕｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ（２０００）２５（７）：６８６；米国特許第４９７０１９８号明細書；同第５０７９２３３号明細書；同第５５８５０８９号明細書；同第５６０６０４０号明細書；同第５６９３７６２号明細書；同第５７３９１１６号明細書；同第５７６７２８５号明細書；同第５７７３００１号明細書）。カンツズマブメルタンシン（Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ，Ｉｎｃ．）は、ジスルフィドリンカーＳＰＰを介してマイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１に連結させたｈｕＣ２４２抗体から構成される、抗体薬剤複合体であるが、これは、現在、ＣａｎＡｇを発現する癌、例えば、結腸、すい臓、胃癌などの処置用としてＩＩ相治験に進んでいる。ＭＬＮ－２７０４（Ｍｉｌｌｅｎｉｕｍ Ｐｈａｒｍ．，ＢＺＬ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ Ｉｎｃ．）は、マイタンシノイド薬剤成分ＤＭ１に連結させた、抗前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）モノクローナル抗体であるが、これは、前立腺腫瘍処置の可能な薬剤として現在開発中である。ドラスタチンの合成類

縁体である、アウリスタチンペプチド、アウリスタチンＥ（ＡＥ）およびモノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）は、キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６（癌上のＬｅｗｉｓ Ｙに対して特異的）およびｃＡＣ１０（血清学的悪性腫瘍上のＣＤ３０に対して特異的）に対して結合され（Ｄｏｒｏｎｉｎａ ｅｔ ａｌ（２００３）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ２１（７）：７７８－７８４）、現在治療剤として開発中である。

【０２７７】

免疫複合体の生成において有用な化学療法剤が本明細書に（例えば、上記）記載される。酵素的に活性なトキシン、および、使用が可能な、その断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、エキソトキシンＡ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク、ジアンチンタンパク、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号パンフレットを参照されたい。放射性複合抗体の生産のために、各種の放射性核種の利用が可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、および^{186}Ｒｅが挙げられる。抗体および細胞傷害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製される。例えば、リシン免疫トキシンは、Ｖｉｔｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：１０９８（１９８７）に記載されるように調製することが可能である。炭素１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体に放射性核種を結合するための、例示のキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレットを参照されたい。

【０２７８】

抗体、および、一つ以上の小分子トキシン、例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコテセン、およびＣＣ１０６５、および、トキシン活性を有する、これらのトキシンの誘導体から成る複合体も、本発明の考慮の対象とされる。

【０２７９】

ｉ．マイタンシンおよびマイタンシノイド

ある実施態様では、免疫複合体は、一つ以上のマイタンシノイド分子に結合させた、本発明の抗体（完全長、または断片）を含む。

【０２８０】

マイタンシノイドは、チューブリンの重合を抑制することによって活動する細胞分裂阻害剤である。マイタンシンは、最初、東アフリカ産潅木Ｍａｙｔｅｎｕｓ ｓｃｒｒａｔａから単離された（米国特許第３，８９６，１１１号明細書）。次いで、ある種の微生物も、マイタンシノイド、例えば、マイタンシノール、およびＣ－３マイタンシノールエステルを生産することが発見された（米国特許第４，１５１，０４２号明細書）。合成マイタンシノール、およびその誘導体および類縁体が、例えば、米国特許第４，１３７，２３０号明細書；同第４，２４８，８７０号明細書；同第４，２５６，７４６号明細書；同第４，２６０，６０８号明細書；同第４，２６５，８１４号明細書；同第４，２９４，７５７号明細書；同第４，３０７，０１６号明細書；同第４，３０８，２６８号明細書；同第

４，３０８，２６９号明細書；同第４，３０９，４２８号明細書；同第４，３１３，９４６号明細書；同第４，３１５，９２９号明細書；同第４，３１７，８２１号明細書；同第４，３２２，３４８号明細書；同第４，３３１，５９８号明細書；同第４，３６１，６５０号明細書；同第４，３６４，８６６号明細書；同第４，４２４，２１９号明細書；同第４，４５０，２５４号明細書；同第４，３６２，６６３号明細書；および同第４，３７１，５３３号明細書に開示される。

【０２８１】

マイタンシノイド薬剤成分は、抗体薬剤複合体において魅力的な薬剤である。その理由は、これらの成分は、（ｉ）発酵、または化学的修飾、または、発酵産物の誘導体形成によって比較的入手し易いこと、（ｉｉ）抗体に対し非ジスルフィドリンカーを介して結合するのに好適な官能基による誘導体形成に受容的であること、（ｉｉｉ）血漿において安定であること、および（ｉｖ）各種腫瘍細胞系統に対して有効である、からである。

【０２８２】

マイタンシノイドを含む免疫複合体、その製法、およびその治療的使用は、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、同第５，４１６，０６４号明細書、および欧州特許第０　４２５　２３５Ｂ１明細書に開示される。なお、この開示を、引用により本明細書に含めることを明言する。Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３:８６１８－８６２３（１９９６）は、ヒトの結腸直腸癌に対して向けられたモノクローナル抗体Ｃ２４２に結合された、ＤＭ１と表示されるマイタンシノイドを含む免疫複合体を記載する。この複合体は、培養された結腸癌細胞に対し高度の細胞傷害性を持つことが見出され、かつ、インビボの腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：１２７－１３１（１９９２）は、免疫複合体であって、マイタンシノイドが、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞系統上の抗原に結合するマウス抗体Ａ７に連結されるか、または、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ癌遺伝子に結合する、別のマウスモノクローナル抗体ＴＡ．１に連結される免疫複合体を記載する。ＴＡ．１－マイタンシノイド複合体の細胞傷害性を、細胞当たり３×１０^{5}ＨＥＲ－２表面抗原を発現する、ヒト乳癌細胞系統ＳＫ－ＢＲ－３についてインビトロで試験した。この薬剤複合体は、遊離マイタンシノイド薬剤と同程度の細胞傷害性を実現したが、これは、抗体分子当たりのマイタンシノイド分子の数を増すことによってさらに上昇が可能であることが予想された。Ａ７－マイタンシノイド複合体は、マウスの全身に投与したが、低い細胞傷害性を示した。

【０２８３】

抗体－マイタンシノイド複合体は、抗体を、マイタンシノイド分子に対し、抗体またはマイタンシノイド分子の生物活性を著明に下げることなく、化学的に連結することによって調製される。例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書（この開示を、引用により本明細書に含めることを明言する）を参照されたい。抗体１分子当たり、マイタンシノイド平均３－４分子の結合が、抗体の機能または可溶性に対し否定的影響を及ぼすことなく、標的細胞に対する細胞傷害性の強化において効力を示した。ただし、抗体当たり１分子のトキシンであっても、抗体単独の使用よりも、細胞傷害性を強化することが予想されると考えられる。マイタンシノイドは、当該分野において周知であり、既知の技術によって合成するか、または、天然資源から単離することが可能である。適切なマイタンシノイドは、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、および、その他の、本明細書に引用される、特許および非特許公刊物において開示される。好ましいマイタンシノイドは、マイタンシノール、および、芳香環において、または、マイタンシノール分子の他の位置において修飾されるマイタンシノール類縁体、例えば、各種マイタンシノールエステルである。

【０２８４】

抗体－マイタンシノイド複合体を作製するために、従来技術においてたくさんの結合基があり、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号明細書、または欧州特許第０　４２５　２３５　Ｂ１号明細書、Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ

５２：１２７－１３１（１９９２）、および、２００４年１０月８日出願の米国特許出願第１０／９６０，６０２号明細書に開示されるものが挙げられる。なお、この開示を引用により本明細書に含めることを明言する。リンカー成分ＳＭＣＣを含む抗体－マイタンシノイドは、２００４年１０月８日出願の米国特許出願第１０／９６０，６０２号明細書に開示されるように調製してもよい。この結合基としては、例えば、上に引用した特許に開示されるように、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸感受基、光感受基、ペプチダーゼ感受基、またはエステラーゼ感受基が挙げられるが、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。さらに別の結合基が、本明細書において記述され、例示される。

【０２８５】

抗体およびマイタンシノイドの複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシニミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製してよい。特に好ましい結合剤としては、例えば、ジスルフィド結合を実現するために、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）（Ｃａｒｌｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１７３：７２３－７３７（１９７８））、および、Ｎ－スクシニミジル－４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）が挙げられる。

【０２８６】

リンカーは、結合の種類に応じて、マイタンシノイド分子の様々な位置に付着させてよい。例えば、通例の結合技術を用いて、ヒドロキシル基と反応させることによってエステル結合を形成してもよい。反応は、ヒドロキシル基を持つＣ－３位置、ヒドロキシメチルによって修飾されるＣ－１４位置、ヒドロキシル基によって修飾されるＣ－１５位置、およびヒドロキシル基を持つＣ－２０位置において行われてもよい。好ましい実施態様では、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類縁体のＣ－３位置に形成される。

【０２８７】

ｉｉ．アウリスタチンおよびドラスタチン

ある実施態様では、免疫複合体は、ドラスタチン、またはドラスタチンペプチド類縁体および誘導体、アウリスタチンに結合された、本発明の抗体を含む（米国特許第５６３５４８３号明細書；同第５７８０５８８号明細書）。ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管動態、ＧＴＰ加水分解、および核分裂および細胞分裂に干渉（Ｗｏｙｋｅ　ｅｔ　ａｌ（２００１）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４５（１２）：３５８０－３５８４）し、抗癌活性（米国特許第５６６３１４９号明細書）、および抗真菌活性（Ｐｅｔｔｉｔ　ｅｔ　ａｌ（１９９８）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．４２：２９６１－２９６５）を有することが示されている。ドラスタチンまたはアウロスタチン薬剤成分は、このペプチド様薬剤成分のＮ（アミノ）末端、またはＣ（カルボキシ）末端を介して抗体に付着させてもよい（国際公開第０２／０８８１７２号パンフレット）。

【０２８８】

例示のアウリスタチン実施態様は、２００４年１１月５日出願の米国特許出願第１０／９８３，３４０号明細書、“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　Ｃａｐａｂｌｅ　ｏｆ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ　ｔｏ　Ｌｉｇａｎｄｓ”に開示される、Ｎ－末端結合モノメチルアウリスタン薬剤成分ＤＥおよびＤＦを含む。なお、この開示の全体を、引用に本明細書に含めることを明言する。

【０２８９】

通常、ペプチド系薬剤成分は、二つ以上のアミノ酸および／またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって調製することが可能である。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知の、液相合成法（例えば、Ｅ．Ｓｈｒｏｅｄｅｒ ａｎｄ Ｋ．Ｌｕｂｋｅ，“Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，”ｖｏｌｕｍｅ １，ｐｐ ７６－１３６，１９６５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓを参照）にしたがって調製することが可能である。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、下記：米国特許第５６３５４８３号明細書；同第５７８０５８８号明細書；Ｐｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１１：５４６３－５４６５；Ｐｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ １３：２４３－２７７；Ｐｅｔｔｉｔ，Ｇ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，１９９６，７１９－７２５；およびＰｅｔｔｉｔ ｅｔ ａｌ（１９９６）Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１５：８５９－８６３の方法にしたがって調製してよい。さらに、Ｄｏｒｏｉｎａ（２００３）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２１（７）：７７８－７８４；“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｃａｐａｂｌｅ ｏｆ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｔｏ Ｌｉｇａｎｄｓ，”２００４年１１月５日出願米国特許出願１０／９８３，３４０号明細書を参照されたい。なお、この開示の全体を引用により本明細書に含める（リンカーに結合される、モノメチルバリン化合物、例えば、ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦを調製するリンカーおよび方法を開示）。

【０２９０】

ｉｉｉ．カリケアミシン

別の実施態様では、免疫複合体は、一つ以上のカリケアミシン分子に結合される、本発明の抗体を含む。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で２本鎖ＤＮＡの断点を生成することが可能である。カリケアマイシンファミリー複合体の調製については、米国特許第５，７１２，３７４号明細書、同第５，７１４，５８６号明細書、同第５，７３９，１１６号明細書、同第５，７６７，２８５号明細書、同第５，７７０，７０１号明細書、同第５，７７０，７１０号明細書、同第５，７７３，００１号明細書、同第５，８７７，２９６号明細書（全てＡｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄ Ｃｏｍｐａｎｙに付与されたもの）を参照されたい。使用してもよい、カリケアミシンの構造的類縁体としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、Ｎ－アセチル－γ_1^I、ＰＳＡＧ、およびθ^I_1（Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：３３３６－３３４２（１９９３），Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：２９２５－２９２８（１９９８）、および、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄに付与された前述の米国特許）が挙げられる。抗体を結合することが可能な、もう一つの抗腫瘍剤は、アンチフォレートであるＱＦＡである。カリケアマイシンおよびＱＦＡは、共に、細胞内活動部位を持つが、直ぐには原形質膜を横断しない。したがって、抗体仲介性内部進入によって、これらの薬剤の細胞内取り込みが起こるとその細胞傷害作用が大きく促進される。

【０２９１】

ｉｖ．その他の細胞傷害剤

本発明の抗体に対して結合することが可能な、他の抗腫瘍剤としては、ＢＣＮＵ、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン、および５－フルオロウラシルで、いずれも、米国特許第５，０５３，３９４号明細書、同第５，７７０，７１０号明細書に記載される、まとめてＬＬ－Ｅ３３２８８複合体と呼ばれる薬剤ファミリーの外、エスペラミシン（米国特許第５，８７７，２９６号明細書）が挙げられる。

【０２９２】

酵素的に活性なトキシン、および、使用が可能な、その断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、エキソトキシンＡ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク、ジアンチンタンパク、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ

）、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号パンフレットを参照されたい。

【０２９３】

本発明はさらに、抗体と、核分解性活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼなどのＤＮＡエンドヌクレアーゼ、ＤＮアーゼ）との間に形成される免疫複合体を考慮の対象とする。

【０２９４】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は、放射活性の高い原子を含んでもよい。例としては、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}、および、Ｌｕの放射性同位元素が挙げられる。複合体が検出のために使用される場合、該複合体は、シンチグラフィー実験用の放射性原子、例えば、tc^{99m}、またはI^{123}を含んでもよいし、または、核磁気共鳴（ＮＭＲ）画像法（磁気共鳴画像法、ｍｒｉとも呼ばれる）用のスピンラベル、例えば、ここでもヨウ素－１２３、ヨウ素－１３１、インジウム－１１１、フッ素－１９、炭素－１３、窒素－１５、酸素－１７、ガドリニウム、マンガン、または鉄を含んでもよい。

【０２９５】

放射性、または他のラベルは、既知の方法で複合体の中に組み込んでよい。例えば、ペプチドは生合成してもよいし、あるいは、水素の代わりにフッ素－１９を含む、適切なアミノ酸前駆体を用いる化学的アミノ酸合成によって合成してもよい。tc^{99m}またはI^{123}、Re^{186}、Re^{188}、およびIn^{111}などのラベルは、システイン残基を介してペプチドに付着させることが可能である。イットリウム－９０は、リジン残基を介して付着させることが可能である。ヨウ素－１２３を組み込むには、ＩＯＤＯＧＥＮ法（Ｆｒａｋｅｒ ｅｔ ａｌ（１９７８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．８０：４９－５７）を用いることが可能である。“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｓｃｉｎｔｉｇｒａｐｈｙ”（Ｃｈａｔａｌ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ １９８９）には他の方法が詳細に記載される。

【０２９６】

抗体および細胞傷害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク結合剤、例えば、Ｎ－スクシニミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシニミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣｌ）の二官能性誘導体、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製してよい。例えば、リシン免疫トキシンは、Ｖｉｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３８：１０９８（１９８７）に記載されるように調製することが可能である。炭素１４標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体に放射性核種を結合するための、例示のキレート剤である。国際公開第９４／１１０２６号パンフレットを参照されたい。リンカーは、細胞における細胞傷害剤の放出を促進する「切断性リンカー」であってもよい。例えば、酸感受性リンカー、光感受性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、または、ジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：１２７－１３１（１９９２）；米国特許第５，２０８，０２０号明細書）を使用してもよい。

【０２９７】

本発明の化合物は、明瞭に、例えば、ただしこれらに限定されないが、架橋リンカー試

薬：ＢＭＰＳ，ＥＭＣＳ，ＧＭＢＳ，ＨＢＶＳ，ＬＣ－ＳＭＣＣ，ＭＢＳ，ＭＰＢＨ，ＳＢＡＰ，ＳＩＡ，ＳＩＡＢ，ＳＭＣＣ，ＳＭＰＢ，ＳＭＰＨ，ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ，ｓｕｌｆｏ－ＧＭＢＳ，ｓｕｌｆｏ－ＫＭＵＳ，ｓｕｌｆｏ－ＭＢＳ，ｓｕｌｆｏ－ＳＩＡＢ，ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ，およびｓｕｌｆｏ－ＳＭＰＢ、およびＳＶＳＢ（スクシニミジル－（４－ビニールスルフォン）ベンゾエート）によって調製されるＡＤＣを考慮の対象とする。これらの架橋剤は、市販されている（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．）。Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ａｎｄ Ｃａｔａｌｏｇ，ページ４６７－４９８、２００３－２００４を参照されたい。

【０２９８】

ｖ．抗体薬剤複合体の調製

本発明の抗体薬剤複合体（ＡＤＣ）では、抗体（Ａｂ）は、リンカー（Ｌ）を介して、一つ以上の薬剤成分（Ｄ）に、例えば、１抗体当たり約１から約２０の薬剤成分に結合される。式ＩのＡＤＣは、当業者に既知の、有機化学反応、条件、および試薬を用い、いくつかのルート：（１）抗体の求核基を、共有結合を介して二価リンカー試薬と反応させてＡｂ－Ｌを形成し、次いで、薬剤成分Ｄを反応させること；および、（２）薬剤成分の求核基を、共有結合を介して二価リンカー試薬と反応させてＤ－Ｌを形成し、次いで、抗体の求核基と反応させることによって調製してもよい。ＡＤＣを調製するための、さらに別の方法が本明細書に記載される。

$Ab-(L-D)_p$ I

リンカーは、一つ以上のリンカー成分から構成されていてもよい。例示のリンカー成分としては、６－マレイミドカプロイル（“ＭＣ”），マレイミドプロパノイル（“ＭＰ”）、バリン－シトルリン（“ｖａｌ－ｃｉｔ”）、アラニン－フェニルアラニン（“ａｌａ－ｐｈｅ”）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（“ＰＡＢ”）、Ｎ－スクシニミジル－４－（２－ピリジルジチオ）カルボキシレート（“ＳＰＰ”）、Ｎ－スクシニミジル－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”）、およびＮ－スクシニミジル（４－イオド－アセチル）アミノベンゾエート（“ＳＩＡＢ”）が挙げられる。さらに別のリンカー成分が当該分野で既知であり、いくつかは本明細書に記載される。さらに、“Ｍｏｎｏｍｅｔｈｙｌｖａｌｉｎｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｃａｐａｂｌｅ ｏｆ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｔｏ Ｌｉｇａｎｄｓ，”２００４年１１月５日出願米国特許出願第１０／９８３，３４０号明細書を参照されたい。なお、この内容全体を参考として本明細書に援用する。

【０２９９】

ある実施態様では、リンカーは、アミノ酸残基を含む。例示のアミノ酸リンカー成分としては、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が挙げられる。例示のジペプチドとしては：バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）が挙げられる。例示のトリペプチドとしては：グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）、およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）が挙げられる。アミノ酸リンカー成分を構成するアミノ酸残基は、天然のものの外、非重要アミノ酸、および非天然のアミノ酸類縁体、例えば、シトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は、ある特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ、およびＤ、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に対し選択性を持つように、かつ、その感受性が最適となるように設計することが可能である。

【０３００】

抗体上の求核基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが：（ｉ）Ｎ－末端アミノ基、（ｉｉ）側鎖アミノ基、例えば、リジン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えば、システイン、および（ｉｖ）抗体がグリコシル化される場所における、糖ヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられる。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー成分上の求電子基と反応して共有結合を形成することが可能であり、リンカー

試薬としては：（ｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロフォルメート、およびハロゲン化酸；（ｉｉ）ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えば、ハロアセタミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基が挙げられる。ある種の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわち、システイン架橋を有する。抗体は、ＤＴＴ（ジチオスレイトール）などの還元剤によって処理することによって結合のために反応性を持たせてもよい。したがって、各システイン架橋は、理論的には、二つの反応性チオール求核基を形成することになる。リジンを、２－イミノチオラン（Ｔｒａｕｔの試薬）と反応させることによって、さらに別の求核基を抗体の中に導入することが可能であり、これによってアミノ酸はチオールに変換される。反応性チオール基は、１、２、３、４個以上のシステイン残基を導入することによって（例えば、一つ以上の非天然の、システインアミノ酸残基を含む突然変異アミノ酸を調製することによって）、抗体（またはその断片）の中に導入してもよい。

【０３０１】

本発明の抗体薬剤複合体はさらに、抗体を修飾して、リンカー試薬または薬剤の求核置換基と反応することが可能な、求電子成分を導入することによって生産することも可能である。グリコシル化抗体の糖類は、例えば、過ヨウ素酸酸化試薬によって酸化してアルデヒドまたはケトン基を形成し、これを、リンカー試薬または薬剤成分のアミノ基と反応させてもよい。得られたイミンＳｃｈｉｆｆ塩基性基が安定な結合を形成してもよいし、あるいは、例えば、水素化ホウ素試薬によって還元して安定なアミン結合を形成させてもよい。一実施態様では、グリコシル化抗体の炭水化物成分を、ガラクトースオキシダーゼ、または、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、該タンパク中にカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を生成させ、これを、薬剤上の適切な基と反応させてもよい（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）。別の実施態様では、Ｎ－末端セリンまたはトレオニン残基を含むタンパクは、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、第１アミノ酸の代わりにアルデヒドを生産させることも可能である（Ｇｅｏｇｈｅｇａｎ　＆　Ｓｔｒｏｈ，（１９９２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．３：１３８－１４６；米国特許第５３６２８５２号明細書）。このようなアルデヒドは、薬剤成分またはリンカーの求核基と反応させることが可能である。

【０３０２】

同様に、薬剤成分上の求核基としては、例えば、ただしこれらに限定されないが：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジド基が挙げられる。これらは、リンカー成分上の求電子基と反応して共有結合を形成することが可能であり、かつ、リンカー試薬としては：（ｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロフォルメート、およびハロゲン化酸；（ｉｉ）ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えば、ハロアセタミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基が挙げられる。

【０３０３】

それとは別に、抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパクは、例えば、組み換え技術またはペプチド合成によって作製してもよい。ＤＮＡの長さは、複合体の二つの部分をコードするそれぞれの領域を、互いに隣接させるか、または、複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域に隔てられて含んでもよい。

【０３０４】

さらに別の実施態様では、抗体を、腫瘍の先行標的照準に利用するために「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）に結合する。この場合、この抗体－受容体複合体は、患者に投与され、次いで、排泄剤を用いて未結合の複合体が循環から除去され、次に、細胞傷害剤（例えば、放射性核種）に結合された「リガンド」（例えば、アビジジン）が投与される。

製薬処方

本発明の抗体を含む製薬処方は、所望の純度を有する抗体を、任意の、生理的に受容可

能な担体、賦形剤、または安定化剤と、水溶液、凍結乾燥処方、またはその他の乾燥処方の形を取るように混ぜ合わせることによって（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０００））保存用に調製される。受容可能な担体、賦形剤、または安定化剤は、用いる用量および濃度においてレシピエントに対して無毒であり、バッファー、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、およびその他の有機酸；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメソニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼソニウムクロリド；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール）；低分子量（１０残基未満）ポリペプチド；タンパク、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニールピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、またはデキストランなど；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク複合体）；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、ＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む。

【０３０５】

本発明の処方はさらに、処置される特定の適応症に必要な、一つより多い活性化合物で、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を持つ活性化合物を含んでもよい。このような分子は、意図される目的に対して有効な量において適切に組み合わされて存在する。

【０３０６】

これらの活性成分はさらに、例えば、コアセルベーション技術、または界面重合によって調製される微小カプセルに、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－微小カプセルに、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、微粒子乳剤、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、または、マクロ粒子乳剤に捕捉されてもよい。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２０ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０００）に開示される。

【０３０７】

インビボ投与に使用される処方は無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜によるろ過によって簡単に実現される。

【０３０８】

持続放出調剤を調製してもよい。持続放出調剤の適切な例としては、本発明の免疫グロブリンを含む、成形品、例えば、フィルム、または微小カプセルの形状を取る、疎水性固相ポリマーの半透性基質を含む。持続放出基質の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリ（ビニールアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号明細書）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタミン酸塩のコポリマー、非分解性エチレンビニールアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えば、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびリュープロリドアセテートから構成される注入可能な微小球）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシルブチル酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニールおよび乳酸－グリコール酸などのポリマーは、１００日以上に亘る分子の放出を可能とするが、ある種のヒドロゲルはより短い期間タンパクを放出する。カプセル封入された免疫グロブリンは、生体内に長期間留まると、３７℃で湿気に暴露されるために分解または凝集する場合があり、このために、生物活性が消失したり、免疫原性が変化する可能性がある。関与する機序に応じて、安定化のために合理的戦略を工夫すること

ができる。例えば、凝集機序が、チオージスルフィド交換による、分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出されたならば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性液から凍結乾燥すること、水分含量を調節すること、および、特異的ポリマー基質組成物を開発することによって実現される場合がある。

使用

本発明の抗体は、例えば、試験管内（インビトロ）、体外（エクスビボ）、および体内（インビボ）治療法において使用してよい。

【０３０９】

一局面では、本発明は、ＤＬＬ４の発現および／または活性の上昇と関連する、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置または予防するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１０】

一局面では、本発明は、腫瘍または癌の増殖を緩和、抑制、阻止、または予防するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１１】

一局面では、本発明は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１２】

一局面では、本発明は、血管形成を抑制するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。

【０３１３】

一局面では、本発明は、血管形成に関連する病的状態を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする対象に、有効量の抗ＤＬＬ４抗体を投与することを含む方法を提供する。ある実施態様では、血管形成と関連する病的状態は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。ある実施態様では、病的状態は、眼内血管新生症である。

【０３１４】

さらに、本発明の抗体の少なくともあるものは、他の動物種由来の抗原に結合することが可能である。したがって、本発明の抗体は、例えば、抗原を含む細胞培養物において、ヒトの被験者において、または、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の動物種（例えば、チンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよびアカゲザル、ブタ、またはマウス）において特異的抗原活性に結合させるために使用することが可能である。一実施態様では、本発明の抗体は、抗原に抗体を、抗原活性が抑制されるように接触させることによって、抗原活性を抑制するために使用することが可能である。抗原は、ヒトのタンパク分子であることが好ましい。

【０３１５】

一実施態様では、本発明の抗体は、抗原発現および／または活性の上昇と関連する障害に罹患した被験体において抗原に結合させるための方法において使用することが可能である。該方法は、被験体に対し、本発明の抗体を、被験体の抗原に結合されるように投与することを含む。好ましくは、抗原は、ヒトのタンパク分子であり、被験体はヒトの被験者である。それとは別に、被験体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現する哺乳動物であることも可能である。さらにまた、被験体は、抗原が導入された（例えば、抗原の投与、または抗原トランスジーンの発現によって）哺乳動物であることも可能である。本発明の抗体は、獣医学的目的、または、ヒト疾患の動物モデルとして、該免疫グロブリンが交差反応する抗原を発現する、非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、またはマウス）に投与することが可能である。後者に関しては、そのような動物モデルは、本発明の抗体の治療効果（例えば、投与の用量および時間経過の試験）を評価するのに有用である場合がある。

【０３１６】
本発明の抗体は、一つ以上の抗原分子の発現および／または活性に関連する疾病、障害、または病態を処置、抑制、その進行を遅延させる、その再発を予防／遅延、緩和、または予防するために使用することが可能である。
【０３１７】
例示の障害としては、上皮癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられる。このような癌のさらに詳細な例としては、例えば、扁平上皮癌（例えば、表皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌を含む胃癌、すい臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、メラノーマ、多発性骨髄腫およびＢ細胞リンパ腫、脳および頭部および頸部癌、および関連する転移腫瘍が挙げられる。ある実施態様では、この癌は、小細胞肺癌、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳癌、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、および肝細胞癌から成る群から選ばれる。ある実施態様では、癌は、小細胞肺癌、結腸直腸癌、および乳癌で、これらの癌の転移形を含む癌から成る群から選ばれる。
【０３１８】
ある実施態様では、一つ以上の細胞傷害剤（単数または複数）に結合させた抗体を含む免疫複合体が患者に投与される。ある実施態様では、免疫複合体、および／または、その結合する抗原は、細胞によって内部に取り込まれ、そのため、免疫複合体の、その結合する標的細胞に対する殺作用において治療効果の上昇がもたらされる。一実施態様では、細胞傷害剤は、標的細胞中の核酸を標的とするか、または干渉する。一実施態様では、細胞傷害剤は、微小管重合を標的とするか、または干渉する。このような細胞傷害剤の例として、本明細書に注記される化学療法剤のいずれか（例えば、マイタンシノイド、アウリスタチン、ドルスタチン、またはカリケアミシン）、放射性同位元素、またはリボヌクレアーゼ、またはＤＮＡエンドヌクレアーゼが挙げられる。
【０３１９】
本発明の抗体は、治療において、単独で使用することも可能であるし、または、他の組成物と組み合わせて使用することも可能である。例えば、本発明の抗体は、別の抗体、化学療法剤（単数または複数）（複数の化学療法剤のカクテルを含む）、他の細胞傷害剤（単数または複数）、抗血管形成剤（単数または複数）、サイトカイン、および／または増殖阻害剤（単数または複数）と同時投与してもよい。本発明の抗体が、腫瘍増殖を抑制する場合、それを、やはり腫瘍増殖を抑制する、一つ以上の、他の化学療法剤（単数または複数）、例えば、ＶＥＧＦに対する抗体などの抗ＶＥＧＦ剤と組み合わせることは特に望ましいと考えられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、患者には、併用の放射線治療（例えば、外部からの放射線被爆、または、抗体などの放射性標識剤による治療）を与えてもよい。上記のような併用療法として、併用投与（二つ以上の薬剤が、同じ、または別々の処方に含まれる場合）、および個別投与が挙げられる。後者の場合、本発明の抗体の投与は、一つのまたは複数の補助治療剤の投与前、および／または投与後に行うことが可能である。
【０３２０】
併用療法
上述のように、本発明は、抗ＤＬＬ４抗体が、別の治療剤と共に投与される併用療法を提供する。例えば、抗ＤＬＬ４抗体は、各種新生または非新生病態を処置するために、抗癌治療剤、または抗血管形成治療剤と組み合わせて使用される。一実施態様では、新生または非新生病態は、異常な、または有害な血管形成と関連する病的障害によって特徴づけられる。抗ＤＬＬ４抗体は、上記目的のために有効な別の薬剤と、同じ組成物において、または、別々の組成物において、連続的に、または併用的に投与することが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、ＤＬＬ４の複数の阻害剤を投与することも可能である。

【０３２１】
抗ＤＬＬ４抗体の投与は、同時に、例えば、単一組成物として、または、二つ以上の、別々の組成物として、同じまたは異なる投与ルートを用いて行うことが可能である。それとは別に、またはそれに加えてさらに、投与は、継時的に、任意の順序で行うことが可能である。ある実施態様では、二つ以上の組成物の投与の間には、数分から数日、数週から数ヶ月に亘る間隔が存在することが可能である。例えば、抗癌剤が先ず投与され、次いで、ＤＬＬ４阻害剤が投与されてもよい。しかしながら、同時投与、または、最初に抗ＤＬＬ４抗体を投与することも考慮の対象とされる。
【０３２２】
抗ＤＬＬ４抗体と組み合わせて投与される治療剤の有効量は、医師または獣医の裁量に委ねられる。用量投与および調整は、処置される病態について最大の管理を実現するように行われる。さらに、用量は、使用される治療剤の種類、および、処置される特定の患者などの要因に依存する。抗癌剤の適切な用量は、現在使用されるものであるが、抗癌剤および抗ＤＬＬ４抗体の併合作用（協働作用）にしたがって下げることも可能である。ある実施態様では、複数の阻害剤の併用は、単一阻害剤の効力を増強する。「増強する」という用語は、その一般的、または承認用量における治療剤効力の向上を指す。さらに、本明細書の「製薬組成物」という表題のついたセクションを参照されたい。
【０３２３】
通常、抗ＤＬＬ４抗体および抗癌剤は、同じまたは同様の病気に対して好適であって、腫瘍増殖、または癌細胞の増殖などの病的障害を阻止または緩和する。一実施態様では、抗癌剤は、抗血管形成剤である。
【０３２４】
癌と関連する抗血管形成治療は、腫瘍増殖を支える栄養素の補給に必要な腫瘍血管の発達の抑制を目標とした、癌処置戦略である。血管形成は、一次的腫瘍増殖および転移の両方に関与するのであるから、本発明によって提供される血管形成処置は、原発部位における腫瘍の新生増殖を抑制するばかりでなく、二次部位における腫瘍の転移をも阻止することが可能であり、したがって、他の治療剤による腫瘍の攻撃が可能とされる。
【０３２５】
多くの抗癌剤が特定され、当該分野で知られており、例えば、本明細書において列挙されるもの、例えば、「定義」において列挙されるもの、例えば、Ｃａｒｍｅｌｉｅｔ ａｎｄ Ｊａｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ ４０７：２４９－２５７（２０００）；Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ：Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，３：３９１－４００（２００４）；およびＳａｔｏ Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，８：２００－２０６（２００３）に列挙されるものが挙げられる。さらに、米国特許出願公開第２００３００５５００６号明細書を参照されたい。一実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、抗ＶＥＧＦ中和抗体（または断片）、および／または、別のＶＥＧＦ拮抗剤、ＶＥＧＦ受容体拮抗剤、例えば、ただしこれらに限定されないが、可溶性ＶＥＧＦ受容体（ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ニューロピリン（例えば、ＮＲＰ１、ＮＲＰ２））断片、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲを阻止することが可能なアプタマー、中和性抗ＶＥＧＦＲ抗体、ＶＥＧＦＲチロシンキナーゼの低分子量阻害剤（ＲＴＫ）、ＶＥＧＦに対するアンチセンス戦略、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦ受容体に対するリボザイム、ＶＥＧＦの拮抗変異種など；および、それらの任意の組み合わせと組み合わせて使用される。それとは別に、またはそれに加えてさらに、ＶＥＧＦ拮抗剤および他の薬剤の外に、二つ以上の血管形成阻害剤が、患者に対し任意に同時投与されてよい。ある実施態様では、さらに別の、一つ以上の治療剤、例えば、抗癌剤を、抗ＤＬＬ４抗体、ＶＥＧＦ拮抗剤、および抗血管形成剤と組み合わせて投与することが可能である。
【０３２６】
本発明のある局面では、抗ＤＬＬ４抗体との併用腫瘍治療に有用な、その他の治療剤としては、他の癌治療法（例えば、手術、放射線処置（例えば、放射性物質による被爆、または放射性物質の投与）、化学療法、本明細書に列挙され、当該分野で既知の抗癌剤によ

る処置、またはそれらの組み合わせ）が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えてさらに、本明細書に開示される、同じ、または二つ以上の異なる抗原に結合する、二つ以上の抗体を、患者に同時投与することも可能である。場合によって、患者に対し一つ以上のサイトカインを投与することが有利であることがある。

【０３２７】

化学療法剤

ある局面では、本発明は、有効量の、ＤＬＬ４の拮抗剤および／または血管形成抑制剤（単数または複数）および一つ以上の化学療法剤を、癌に対して感受性を持つか、または癌と診断された患者に対し投与することによって、腫瘍増殖または癌細胞の増殖を阻止するか、または抑える方法を提供する。本発明の併用処置法では、種々の化学療法剤を用いてよい。考慮の対象とされる、例示の、非限定的化学療法剤が、本明細書の「定義」に掲載される。

【０３２８】

当業者には理解されるように、化学療法剤の適切な用量は、一般に、該化学療法剤が、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて投与される、臨床治療で既に用いられている用量にほぼ等しい。処置される病態に応じて、用量に変動が起こる可能性がある。処置を担当する医師は、個々の対象患者のために適切な用量を決定することが可能である。

【０３２９】

本発明はさらに、腫瘍増殖または癌細胞増殖の再発を抑制、または阻止するための方法および組成物を提供する。腫瘍増殖の再発、または癌細胞増殖の再発とは、患者は、１種以上の現在利用が可能な処置（例えば、癌治療、例えば、化学療法、放射線治療、手術、ホルモン療法、および／または生物学的療法／免疫療法、抗ＶＥＧＦ療法、特に、特定の癌に対する標準的治療処方）を現在受けているか、またはそれによって治療されるが、治療は、患者を治療するには臨床的には十分でないか、あるいは、患者は、その治療からもはや十分な治療作用を受容することがなく、さらに別の効果的治療を必要とする状態を記述するために使用される。本明細書で用いる場合、この語句はまた、「非反応性／難治性」患者の病態、例えば、治療には反応するが、副作用に苦しむ患者、耐性を発達させる患者、治療に反応しない患者、治療に十分反応しない患者を記述する状態を指すことも可能である。種々の実施態様において、癌は、癌細胞の数が顕著に減少しないか、増加するか、または、大きさ、または癌細胞数においてそれ以上の減少を見せることがなくなった、再発腫瘍増殖、または再発癌細胞増殖である。癌細胞が、再発腫瘍増殖か、または再発癌細胞増殖であるかを決める判断は、上記背景における「再発」または「難治」または「非反応性」に関する、当該分野において認知済みの意味に基づいて、癌細胞に対する処置効果を定量するための、当該分野で既知の任意の方法によってインビボ、またはインビトロで行うことが可能である。抗ＶＥＧＦ処置に対して耐性を持つ腫瘍は、再発腫瘍増殖の一例である。

【０３３０】

本発明は、対象における再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑制する方法であって、対象に再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑制する、一つ以上の抗ＤＬＬ４抗体を投与することによってそれを行う方法を提供する。ある実施態様では、癌治療に次いで拮抗剤を投与することが可能である。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、癌治療と同時に投与される。それとは別に、またはそれに加えてさらに、抗ＤＬＬ４抗体治療は、別の癌治療と交互に行われるが、この治療は、任意の順序で行うことが可能である。本発明はさらに、癌に罹りやすい患者において癌の発症または再発を防ぐために、一つ以上の抑制性抗体を投与する方法を包含する。一般に、対象は、以前に癌治療を受けたことがあるか、または同時に癌治療を受ける。一実施態様では、癌治療は、抗血管形成剤、例えば、ＶＥＧＦ拮抗剤による処置である。抗血管形成剤としては、当該分野で既知のもの、および本明細書の「定義」に見られるものが挙げられる。一実施態様では、抗血管形成剤は、抗ＶＥＧＦ中和性抗体、または断片（例えば、ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、またはＬ

ＵＣＥＮＴＩＳ（登録商標）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ））、Ｙ０３１７、Ｍ４、Ｇ６、Ｂ２０、２Ｃ３など）である。例えば、米国特許第６，５８２，９５９号明細書、同第６，８８４，８７９号明細書、同第６，７０３，０２０号明細書；国際公開第９８／４５３３２号パンフレット；国際公開第９６／３００４６号パンフレット；国際公開第９４／１０２０２号パンフレット；欧州特許第０６６８６８Ｂ１号明細書；米国特許出願公開第２００３０２０６８９９号明細書、同第２００３０１９０３１７号明細書、同第２００３０２０３４０９号明細書、および同第２００５０１１２１２６号明細書；Ｐｏｐｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８８：１４９－１６４（２００４）；および国際公開第２００５０１２３５９号パンフレットを参照されたい。再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を阻止または抑えるために、ＶＥＧＦ拮抗剤および抗ＤＬＬ４抗体と組み合わせて、さらに別の薬剤を投与することが可能である。本明細書の「併用療法」という表題のセクションを参照されたい。

【０３３１】

本発明の抗体（および補助治療剤）は、任意の適切な手段によって、例えば、非経口的、皮下、腹腔内、肺内、および鼻腔内など、および、局所処置が望みであるなら、病巣内、または硝子体内投与によって投与される。非経口的注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。さらに、抗体は、パルス状注入、特に、抗体用量を漸減させることによって好適に投与される。投与は、任意の適切なルートによって、例えば、注入によって、例えば、一部は、投与が一過性かまたは慢性であるかに応じて、静脈内または皮下注入によって行うことが可能である。

【０３３２】

本発明の抗体組成物は、医療実施基準と合致するやり方で処方、用量設定、および投与される。この背景において考慮される要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個別患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与法、投与スケジュール、および開業医には既知の、その他の要因が挙げられる。抗体は、対象とする障害の予防または処置のために現今使用される一つ以上の薬剤と共に任意に処方される。このような、その他の薬剤の有効量は、、処方中に存在する本発明の抗体の量、障害または処置の種類、および、上に述べたその他の要因に依存する。これらは、一般に同じ用量で、かつ、前述の投与ルートを通じて、これまでに使用された用量の約１から９９％として使用される。

【０３３３】

病気の予防または処置のためには、本発明の抗体の適切用量は（単独で使用される場合、または、化学療法剤などの他の薬剤と組み合わせて使用される場合）、処置される病気の種類、病気の重症度および経過、抗体が、予防目的または治療目的のために投与されるのか、以前の治療、患者の臨床歴および抗体に対する反応、および主治医の判断に依存する。抗体は、一時に、または一連の処置時点に亘って患者に適切に投与される。病気の種類および重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇから１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ）の抗体は、例えば、１回以上の個別投与であれ、または連続輸液であれ、患者に対する投与のための、初回候補用量である。一つの典型的な１日当たり用量は、前述の要因に応じて約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲に亘ると考えられる。数日以上に亘る反復投与の場合は、処置は、症状の望みの抑制が起こるまで持続される。抗体の、一つの例示の用量は、約０．０５ｍｇ／ｋｇから約１０ｍｇ／ｋｇの範囲にあると考えられる。したがって、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ、または１０ｍｇ／ｋｇ（または、それらの任意の組み合わせ）の、一つ以上の用量を患者に投与してよい。この用量は、断続的に、例えば、週に１回、または３週間に１回（例えば、患者が、約２回から約２０回、例えば、約６回の抗体投与を受け取るように）投与されてもよい。初回に比較的高い負荷用量、次いで、１回以上の比較的低用量を投与してもよい。例示の投与スケジュールは、約４ｍｇ／ｋｇの初回負荷用量、次いで、約２ｍｇ／ｋｇの抗体から成る週１回の維持投与を含む。しかしながら、他の投与スケジュ

ールが有用な場合もある。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって簡単に監視される。

【０３３４】

本発明の抗ＤＬＬ４抗体は、特異的細胞または組織におけるＤＬＬ４発現を検出するアッセイ（例えば、診断または予後判定アッセイ）において有用である。その際、抗体は、下記のように標識され、不溶の基質に固定される。

【０３３５】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４を検出するための方法であって、サンプルにおいてＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。本明細書で用いる「検出」という用語は、コントロールを参照するか、または参照することのない、定性的および／または定量的（濃度の測定）検出を含む。

【０３３６】

別の局面では、本発明は、ＤＬＬ４発現および／または活性に関連する障害を診断する方法であって、該障害を有する、または有することが疑われる患者から得られた生物サンプルにおいてＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む方法を提供する。ある実施態様では、ＤＬＬ４発現は、発現上昇、または異常（有害）な発現である。ある実施態様では、障害は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である。

【０３３７】

別の局面では、本発明は、検出可能ラベルを含む、本明細書に記載される抗ＤＬＬ４抗体のいずれか一つを提供する。

【０３３８】

別の局面では、本発明は、本明細書に記載される抗ＤＬＬ４抗体のいずれかと、ＤＬＬ４との複合体を提供する。ある実施態様では、複合体は、インビボまたはインビトロに存在する。ある実施態様では、複合体は、癌細胞である。ある実施態様では、抗ＤＬＬ４抗体は、検出可能に標識される。

【０３３９】

いくつかの周知の検出アッセイ法のいずれか一法においてＤＬＬ４を検出するために、抗ＤＬＬ４抗体を使用することが可能である。例えば、ある生物サンプルについて、ＤＬＬ４をアッセイするのに、サンプルを所望の供給源から得ること、サンプルを抗ＤＬＬ４抗体と混ぜ合わせ、抗体に、混合物中に存在するＤＬＬ４と、抗体／ＤＬＬ４複合体を形成させること、および、混合物中に存在する抗体／ＤＬＬ４複合体を検出することによって行う。生物サンプルは、その特定のサンプルのために好適な、当該分野で既知の方法によってアッセイのために調製されてもよい。サンプルを抗体と混ぜ合わせる方法、および、抗体／ＤＬＬ４複合体を検出する方法は、使用されるアッセイの種類にしたがって選ばれる。そのようなアッセイとして、免疫組織化学、競合的およびサンドイッチアッセイ、および立体阻害アッセイが挙げられる。

【０３４０】

ＤＬＬ４の分析法は皆、下記の試薬の一つ以上を使用する：標識ＤＬＬ４類縁体、固定ＤＬＬ４類縁体、標的抗ＤＬＬ４抗体、固定抗ＤＬＬ４抗体、および立体複合体。標識試薬はまた、「トレーサー」とも呼ばれる。

【０３４１】

使用されるラベルは、ＤＬＬ４および抗ＤＬＬ４抗体の結合を妨げないものである限り、いずれの検出可能な官能基であってもよい。イムノアッセイにおける使用のために多くのラベルが知られるが、例えば、直接検出可能な成分、例えば、蛍光色素、化学発光、および放射性ラベルのほか、検出のために反応または誘導体形成しなければならない酵素などの成分が挙げられる。このようなラベルの例としては：

使用されるラベルは、ＤＬＬ４および抗ＤＬＬ４抗体の結合を妨げないものである限り、いずれの検出可能な官能基であってもよい。イムノアッセイにおける使用のために多くのラベルが知られるが、例えば、直接検出してもよい成分、例えば、蛍光色素、化学発光、および放射性ラベルの外、検出のために反応、または誘導体形成しなければならない酵

素などの成分が挙げられる。このようなラベルの例として、例えば、放射性同位元素、^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、および^{131}Ｉ、蛍光発色団、例えば、希土類キレート剤、または、フルオレセインおよびその誘導体、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、蛍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号明細書）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリフォスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロ環オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ、およびキサンチンオキシダーゼ、これらを、過酸化水素を用いて、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の染料前駆体を酸化する酵素と結合させて使用し、ビオチン／アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定なフリーラジカルなどが挙げられる。

【０３４２】

これらのラベルをタンパクまたはポリペプチドに共有的に結合するためには、従来法が利用可能である。前述の蛍光、化学発光、および酵素ラベルによって抗体を標識するためには、例えば、結合剤、例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス－イミデート、ビス－ジアゾチゼドベンジジンなどを使用してよい。例えば、米国特許第３，９４０，４７５号明細書（蛍光定量法）、および同第３，６４５，０９０号明細書（酵素）；Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１４４：９４５（１９６２）；Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４－１０２１（１９７４）；Ｐａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，４０：２１９－２３０（１９８１）；Ｎｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７－４１２（１９８２）を参照されたい。本発明において好ましいラベルは、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびアルカリフォスファターゼである。酵素を含む、このようなラベルの、抗体に対する結合は、イムノアッセイ技術に熟練した当業者にとっては標準的操作手順である。例えば、Ｏ'Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ－ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ Ｕｓｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，”，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｅｄ．Ｊ．Ｊ．Ｌａｎｇｏｎｅ ａｎｄ Ｈ．Ｖａｎ Ｖｕｎａｋｉｓ，Ｖｏｌ．７３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８１），ｐｐ．１４７－１６６を参照されたい。

【０３４３】

ある種のアッセイ法にとっては試薬の固定が必要である。固定は、液中に遊離して存在するＤＬＬ４からの抗ＤＬＬ４抗体の分離をもたらす。これは、通常、抗ＤＬＬ４抗体またはＤＬＬ４類縁体を、例えば、水に不溶の基質また表面に対し吸着させることによって（Ｂｅｎｎｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，米国特許第３，７２０，７６０号明細書）、または、共有結合によって（例えば、グルタルアルデヒド架橋結合を用いて）、または、後で、例えば、免疫沈降によって抗ＤＬＬ４抗体またはＤＬＬ４類縁体を不溶化することによって、実現される。

【０３４４】

サンプルにおけるタンパクの発現は、免疫組織化学および染色プロトコールによって調べてもよい。組織切片の免疫組織化学的染色は、サンプルにおけるタンパクの存在を評価または検出するための信頼性の高い方法であることが示されている。免疫組織化学（“ＩＨＣ”）技術は、一般的には、発色団または蛍光法によってインシトゥーにおいて細胞抗原を探り、可視化するために抗体を利用する。サンプル調製には、哺乳動物（通常は、ヒトの患者）から得られた組織または細胞サンプルを用いてよい。サンプルの例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、癌細胞、例えば、結腸、乳房、前立腺、卵巣、肺、胃、すい臓、リンパ腫、および白血病癌細胞が挙げられる。細胞は、当該分野で既知

の種々の手法によって、例えば、ただしこれらに限定されないが、手術による摘出、吸引、またはバイオプシーによって獲得することが可能である。組織は、新鮮なままでもよいし、凍結させてもよい。一実施態様では、サンプルは固定され、パラフィンなどに包埋される。組織サンプルは、通例法によって固定（すなわち、保存）されてもよい。当業者であれば、固定剤の選択は、そのサンプルが組織学的に染色されるか、または他のやり方で分析されるその目的によって決められることを理解するであろう。さらに、当業者であれば、固定の期間は、組織サンプルのサイズ、および使用される固定剤に依存することを理解するであろう。

【０３４５】

ＩＨＣは、さらに別の技術、例えば、形態学的染色および／または蛍光インシトゥハイブリダイゼーションと組み合わせて行ってもよい。ＩＨＣについては、二つの一般的方法：直接および間接アッセイが利用可能である。第１のアッセイによれば、標的抗原（例えば、ＤＬＬ４）に対する抗体の結合は直接定量される。この直接アッセイは、それ以上抗体相互作用を要することなく可視化することが可能な、標識試薬、例えば、蛍光タグ、または、酵素標識一次抗体を使用する。典型的な間接アッセイでは、未結合一次抗体が抗原に結合し、次に、標識二次抗体が、この一次抗体に結合する。二次抗体が酵素ラベルに結合される場合、発色性または蛍光性基質が加えられ、抗原の可視化を実現する。いくつかの二次抗体は、一次抗体上の異なるエピトープと反応するために信号増幅が起こる。

【０３４６】

免疫組織化学に使用される一次および／または二次抗体は、通常、検出可能な成分によって標識される。数多くのラベルの利用が可能であるが、それらは、一般に、下記の範疇に分類される：

前述の、サンプル調製手順を除外すると、ＩＨＣの前、最中、または後に組織切片についてさらに処理することが望ましい場合がある。例えば、エピトープ回収法では、例えば、クエン酸バッファー中で組織サンプルの加熱を実行してもよい（例えば、Ｌｅｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ａｐｐｌ．Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．４（３）：２０１（１９９６））。

【０３４７】

任意に実行してよいブロッキング工程の後、一次抗体が組織サンプル中の標的タンパク抗原に結合するように、十分な時間、好適な条件下に、組織切片を一次抗体に暴露する。これを実行するための適切な条件は、通例の実験によって決定することが可能である。サンプルに対する抗体の結合の程度は、前述の検出可能なラベルの内のいずれかを用いて定量される。ラベルは、３，３'－ジアミノベンジミド発色団などの発色性基質の化学的変化を触媒する、酵素ラベル（例えば、ＨＲＰＯ）であることが好ましい。酵素ラベルは、一次抗体に特異的に結合する抗体に結合される（例えば、一次抗体は、ウサギポリクローナル抗体で、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である）ことが好ましい。

【０３４８】

このようにして調製されるサンプルは、スライドマウントされ、ガラス被覆される。次に、例えば、顕微鏡を用いてスライド評価を判定するが、当該分野で通例として使用される染色強度基準を用いてもよい。染色強度基準は、下記のように評価してもよい。

【０３４９】

【表２】

染色パターン	スコア
細胞に染色が観察されない。	0
１０%より多い細胞に微かな／かろうじて認識可能な染色が検出される。	1+
１０%より多い細胞に弱から中等の染色が観察される。	2+
１０%より多い細胞に中等から強度の染色が観察される。	3+

通常、ＩＨＣアッセイにおいて染色パターンスコアが約２＋以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。ある実施態様では、染色パターンスコアが約１＋以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。別の実施態様では、染色パターンスコアが約３以上の場合、診断および／または予後判定陽性である。腫瘍または結腸腺癌からの細胞および／または組織をＩＨＣを用いて調べる場合、染色は、一般に、腫瘍細胞および／または組織において（サンプル中に存在する可能性のある支質または周辺組織ではなく）定量または評価される。

【０３５０】

競合またはサンドイッチアッセイと呼ばれる他のアッセイ法も確立されており、診断産業界において広く使用されている。

【０３５１】

競合アッセイは、トレーサーＤＬＬ４類縁体が、少数の抗ＤＬＬ４抗体の抗原結合部位を求めて試験サンプルのＤＬＬ４と競合する能力に依存する。抗ＤＬＬ４抗体は、一般に、競合の前または後に不溶とされ、この抗ＤＬＬ４抗体に結合したトレーサーとＤＬＬ４が、未結合トレーサーおよびＤＬＬ４から分離される。この分離は、傾斜分離（結合パートナーを、事前に不溶とした場合）か、または、遠心（結合パートナーを、競合反応後に沈殿させた場合）によって行う。試験サンプルのＤＬＬ４の量は、マーカー物質の量で測定した結合トレーサーの量に逆比例する。既知量のＤＬＬ４による用量－反応曲線が準備され、試験結果と比較されて、試験サンプル中に存在するＤＬＬ４の量を定量的に決定する。これらのアッセイは、酵素が検出可能マーカーとして使用される場合、ＥＬＩＳＡシステムと呼ばれる。

【０３５２】

「均質」アッセイと呼ばれる、もう一種類の競合アッセイは、相分離を必要としない。このアッセイでは、酵素とＤＬＬ４の複合体が調製され、この複合体は、抗ＤＬＬ４抗体がこのＤＬＬ４に結合すると、抗ＤＬＬ４抗体の存在が、酵素活性を修飾するように使用される。この場合、ＤＬＬ４、または免疫学的に活性なその断片は、二官能性有機架橋によってペルオキシダーゼなどの酵素に結合される。複合体は、抗ＤＬＬ４抗体との使用において、抗ＤＬＬ４抗体の結合が、ラベルの酵素活性を抑制するか、または増強するように選ばれる。この方法自体は、ＥＭＩＴの名の下に広く行われている。

【０３５３】

均質アッセイのための立体障害法では立体複合体が使用される。これらの複合体は、低分子量ハプテンを、小型のＤＬＬ４断片に共有的に連結することによって合成されるが、その連結は、ハプテンに対する抗体が、抗ＤＬＬ４抗体と同時には複合体に事実上結合できないように行われる。このアッセイ手法では、試験サンプル中に存在するＤＬＬ４は、抗ＤＬＬ４抗体に結合し、そうすることによって抗ハプテンが複合体に結合することを可能とする。これは、複合体ハプテンの特徴に変化を、例えば、ハプテンが蛍光発色団の場合、蛍光に変化をもたらす。

【０３５４】

サンドイッチアッセイは、ＤＬＬ４、または抗ＤＬＬ４抗体の定量に特に有用である。継時的サンドイッチアッセイでは、試験サンプルのＤＬＬ４を吸着するために、抗ＤＬＬ４抗体が使用され、試験サンプルは、洗浄などで除去され、第２の、標識抗ＤＬＬ４抗体を吸着するために、結合ＤＬＬ４が使用され、次に、標識抗ＤＬＬ４抗体および結合物質が、残余のトレーサーから分離される。結合トレーサーの量は、試験サンプルのＤＬＬ４に直接比例する。「同時」サンドイッチアッセイでは、試験サンプルは、標識抗ＤＬＬ４を加える前に分離されない。一方の抗体として抗ＤＬＬ４モノクローナル抗体を、他方の抗体として抗ＤＬＬ４ポリクローナル抗体を用いる、継時的サンドイッチアッセイは、ＤＬＬ４に関してサンプルを試験するのに有用である。

【０３５５】

前記は、ＤＬＬ４のための、単に例示の検出アッセイであるにすぎない。ＤＬＬ４の定量のために抗ＤＬＬ４抗体を使用する、現在開発中の、また今後開発されるその他の方法も、本明細書に含まれるバイオアッセイを含め、本発明の範囲内に含まれる。

製造品

本発明のもう一つの局面では、前述の障害の処置、予防、および／または診断に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は、容器、および、該容器の上、またはそれと関連させて、ラベルまたは同封挿入体を含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、病態の処置、予防、および／または診断にそれ自体で有効であるか、または、別の組成物（単数または複数）と組み合わされると有効な組成物を保持するが、無菌のアクセスポート（例えば、容器は、静注液バッグであってもよいし、あるいは、皮下注射針によって貫通することが可能なストッパー付きバイアルであってもよい）を有し得る。組成物における少なくとも一つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベルまたは包装挿入体は、組成物が、癌などの選択病態を処置するために使用されることを示す。さらに、本製造品は、（ａ）その中に、本発明の抗体を含む組成物を有する第１容器；および、（ｂ）さらに別の治療剤を含む組成物をその中に擁する第２容器を含んでもよい。前記さらに別の治療剤は、例えば、化学療法剤、または、抗血管形成剤、例えば、抗ＶＥＧＦ抗体（例えば、ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）などを含んでもよい。本発明のこの実施態様における製造品は、さらに、第１および第２抗体組成物が、癌などの特定の病態を処置するために使用することが可能であることを示す包装挿入体を含んでもよい。それとは別に、またはそれに加えてさらに、製造品はさらに、薬理学的に受容可能なバッファー、例えば、注入用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸バッファー生理的食塩水、リンゲル液、およびデキストロース液を含む、第２（または第３）容器を含んでもよい。該製造品はさらに、商業的およびユーザーの観点から望ましい他の物質、例えば、他のバッファー、希釈液、フィルター、針、およびシリンジなどを含んでもよい。

【０３５６】

下記は、本発明の方法および組成物の実施例である。一般的記述が上に与えられたのであるから、外にも種々の実施態様が実施可能であることが理解されよう。

【実施例】

【０３５７】

実施例

実施例に言及される市販の試薬は、別様に指示しない限り、メーカーの指示にしたがって使用した。下記の実施例、および本明細書全体に亘って、ＡＴＣＣ（登録商標）アクセス番号によって特定される、細胞供給源は、米国基準菌株保存機関、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ２０１０８である。実施例に引用される参考文献は、例にしたがって列挙する。本明細書に引用される参考文献は全て、参照により本明細書に含む。

（実施例１）

材料および方法

本実施例では、下記の材料および方法を使用した。

【０３５８】

ＨＵＶＥＣフィブリンゲルビーズアッセイ。ＨＵＶＥＣフィブリンゲルビーズアッセイの詳細は、既に記載されている（Ｎａｋａｔｓｕ，Ｍ．Ｎ．　ｅｔ　ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ　６６，１０２－１２（２００３））。簡単に言うと、Ｃｙｔｏｄｅｘ（商標）３ビーズ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を、ビーズ当たり３５０－４００　ＨＵＶＥＣでコートした。約２００個のＨＵＶＥＣコート済みビーズを、１２－ウェル組織培養プレートの１ウェルにおいてフィブリンクロット中に埋設した。8×10^{4}ＳＦ細胞を、クロットの上にプレートした。アッセイは、７日目と９日目の間で停止し、免疫染色および画像撮影に備えた。ある実施態様では、ＨＵＶＥＣ新芽を、ビオチン抗ＣＤ３１（クローンＷＭ５９、ｃＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）およびストレプトアビジン－Ｃｙ３で染色することによって可視化した。ＨＵＶＥＣ核染色のために、フィブリンゲルを、２％パラフォルムアルデヒド（ＰＦＡ）中で一晩固定し、４′，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ、Ｓｉｇｍａ）で染色した。Ｋｉ６７染色のために、フィブリンゲルを、１０Ｘトリプシン－ＥＤＴＡで５分間処理し、最上層ＳＦを除去し、ＰＢＳに溶解した１０％ＦＢＳで中和し、４％ＰＦＡ中で一晩固定した。次に、フィブリンゲルを、ＰＢＳＴに溶解した１０％ヤギ血清、４時間でブロックし、ウサギ抗マウスＫｉ６７（直ちに使用が可能な調製品、クローンＳｐ６、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ）と一晩インキュベートし、次いで、抗ウサギＩｇＧ－Ｃｙ３（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）による二次検出を行った。一晩経過インキュベーションは全て４℃で行った。

【０３５９】

マウスの新生児網膜実験。同腹のＣＤ１マウス新生児に、Ｐ１およびＰ３において、ＰＢＳ、またはＹＷ２６．８２（１０ｍｇ／ｋｇ）をｉ．ｐ．注入した。眼球をＰ５に収集し、ＰＢＳに溶解した４％ＰＦＡで一晩固定した。摘出網膜を、ＰＢＳＴに溶解した１０％ヤギ血清で３時間ブロックし、次いで、一次抗体と一晩インキュベートした。一次カクテルは、ビオチニル化イソレクチンＢ４（２５μｇ／ｍｌ、Ｂａｎｄｅｉｒａｅａ　ｓｉｍｐｌｉｃｉｆｏｌｉａ；Ｓｉｇｍａ）、および、下記：ウサギ抗マウスＫｉ６７（１：１、即時使用可能調製品、クローンＳｐ６、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ）、または、マウスＣｙ３－結合抗アルファＳＭＡ（１：２０００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の内の一つを、ＰＢＬＥＣ（１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、０．１ｍＭ　$CaCl_2$、０．１ｍＭ　$MgCl_2$、０．１ｍＭ　$MnCl_2$、ＰＢＳ溶液として、ｐＨ６．８）に溶解した１０％血清と共に含む。次に、網膜をＰＢＳＴにて洗浄し、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ストレプトアビジン（１：２００；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）、およびＣｙ３－抗ウサギＩｇＧ（１：２００；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）から成る、二次抗体併用剤と一晩インキュベートした。染色完了後、網膜を、ＰＢＳに溶解した４％ＰＦＡにて染色後固定した。一晩経過インキュベーションは全て４℃で行った。平坦に登載した網膜の画像を、共焦点蛍光顕微鏡によって捕捉した。

【０３６０】

腫瘍モデル。８から１０週齢のベージュ色雌ヌードマウスを用いた。皮下腫瘍を得るため、マウスに、５０％マトリゲル（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を含む、０．１ｍｌ細胞懸濁液を、右後方横腹に注入した。5×10^{6}ヒト結腸癌ＨＭ７細胞、10×10^{6}結腸癌Ｃｏｌｏ２０５細胞、10×10^{6}ヒト肺癌Ｃａｌｕ６細胞、10×10^{6}ヒト肺癌ＭＶ－５２２細胞、10×10^{6}マウス白血病ＷＥＨＩ－３細胞、10×10^{6}マウスリンパ腫ＥＬ４細胞、10×10^{6}ヒト卵巣癌ＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１細胞、10×10^{6}マウス肺癌ＬＬ２細胞、10×10^{6}白血病／リンパ腫ＥＬ４細胞、または10×10^{6}非小細胞肺癌Ｈ１２２９細胞を、各マウスに注入した。ヒトメラノーマＭＤＡ－ＭＢ－４３５モデルについては、マウスの乳腺脂肪パッドに、５０％マトリゲルを含む、０．１ｍｌの細胞懸濁液（5×10^{6}）を注入した。抗ＤＬＬ４抗体ＹＷ２６．８２をｉ．ｐ．を通じて投与した（１０ｍｇ／ｋｇ体重、週２回）。下記の腫瘍モデルについては、各試験マウスの右横腹の皮下に、腫瘍断片（$1mm^3$）を移植した：非小細胞肺癌ＳＫＭＥＳ－１、ヒト乳癌ＭＸ－１、ヒト結腸直腸癌ＳＷ６２０、およびヒト腺癌ＬＳ１７４Ｔ。腫瘍成長

は、キャリパ測定によって定量した。腫瘍体積（mm^3）は、長さ（ｌ）および幅（ｗ）を測定し、体積（Ｖ＝ｌｗ２／２）を計算することによって決定した。各群には１０から１５匹の動物を含めた。処理群の統計学的比較は、スチューデントの両側ｔ－検定を用いて行った。

【０３６１】

腫瘍の血管標識および免疫組織化学。マウスを、イソフルランによって麻酔した。ＦＩＴＣ－標識Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍレクチン（１５０μｇを１５０μｌの０．９％ＮａＣｌに溶解；Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）をｉ．ｖ．注入し５分間循環させた後、全身還流を行った。血管系を、ＰＢＳに溶解した１％ＰＦＡによって３分間経心臓的に還流した。腫瘍を取り出し、同じ固定液に２時間浸して固定し、次いで、３０％スクロースに一晩インキュベートし、冷却保護に備え、次いで、ＯＣＴに包埋した。切片（４μｍ厚）を、抗マウスＣＤ３１（１：５０、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で染色し、次いで、Ａｌｅｘａ　５９４ヤギ抗ラットＩｇＧ（１：８００、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）で処理した。

【０３６２】

マウス小腸の組織学および免疫組織化学検査。フォルマリン固定およびパラフィン包埋マウス小腸組織を、３μｍ厚に薄切した。小腸の細胞タイプの組織化学的特定は、メーカー（ＰｏｌｙＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の推薦にしたがってアルシアンブルーによって実行した。抗Ｋｉ６７染色のために、切片をあらかじめＴａｒｇｅｔ　Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ液（Ｓ１７００、ＤＡＫＯ）で処理し、ウサギ抗Ｋｉ６７（１：２００、クローンＳＰ６、Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ）と共にインキュベートした。ヤギ抗ウサギ二次抗体、７．５ｇ／ｍｌ（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｓ）は、Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎ　ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅキット（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｓ）によって検出した。Ｋｉ６７染色切片は全て、Ｍａｙｅｒのヘマトキシリンによってカウンターステインした。ＨＥＳ－１染色のため、抗ラットＨＥＳ－１（クローンＮＭ１、ＭＢＬ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）、次いでＴＳＡ－ＨＲＰを用いた。

【０３６３】

ＲＮＡ干渉。ヒトＤＬＬ４を標的とする、ＳＭＡＲＴ　ｐｏｏｌ小型干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）２本鎖、およびＳｉコントロール非標的ｓｉＲＮＡ＃２は、Ｄｈａｒｍａｃｏｎから購入した。ｓｉＲＮＲ２本鎖（５０ｎＭ）のトランスフェクションは、ＯｐｔｉＭＥＭ－１（登録商標）およびＬｉｐｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用い、４０％集密度のＨＵＶＥＣに対して行った。ＦＡＣＳ分析は、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間後に行った。４種の抗ＤＬＬ４　ＳＭＡＲＴ　ｐｏｏｌ　ｓｉＲＮＡの配列は下記の通りである：

【０３６４】

【化６】

CAACTGCCCTTATGGCTTTTT（配列番号６２）（オリゴ１、センス），

AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT（配列番号６３）（オリゴ１、アンチセンス），

CAACTGCCCTTCAATTTCATT（配列番号６４）（オリゴ２、センス），

TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT（配列番号６５）（オリゴ２、アンチセンス），

【０３６５】

【化７】

TGACCAAGATCTCAACTACTT（配列番号６６）（オリゴ３、センス），

GTAGTTGAGATCTTGGTCATT（配列番号６７）（オリゴ３、アンチセンス），

GGCCAACTATGCTTGTGAATT（配列番号６８）（オリゴ４、センス），

TTCACAAGCATAGTTGGCCTT（配列番号６９）（オリゴ４、アンチセンス）．

Ｎｏｔｃｈリガンド：Ｎｏｔｃｈ阻止ＥＬＩＳＡ。９６－ウェルマイクロタイタープレートを、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、０．５μｇ／ｍｌでコートした。このアッセイでは、ＤＬＬ４－ＡＰ（ＤＬＬ４のアミノ酸１－４０４を、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼに融合させたもの）を含む調整媒体を用いた。調整媒体を準備するために、ＤＬＬ４－ＡＰを発現するプラスミドをＦｕｇｅｎ６試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を用いて、２９３細胞に一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションの５日後、調整媒体を収集し、ろ過し、４℃で保存した。０．１５から２５μｇ／ｍｌの力価測定精製抗体を、コートされたｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃに対し、最大達成結合度の５０％結合を付与する希釈度において、ＤＬＬ４－ＡＰ調整媒体とあらかじめ室温で１時間インキュベートした。次に、この抗体／ＤＬＬ４－ＡＰ混合物を、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃコートプレートに加え、室温で１時間置き、その後、プレートを、ＰＢＳ中で数回洗浄した。結合ＤＬＬ４－ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。同じアッセイを、ＤＬＬ１－ＡＰ（ヒトＤＬＬ１、アミノ酸１－４４５）について行った。同様のアッセイを、精製ＤＬＬ４－Ｈｉｓ（Ｃ－末端Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４、アミノ酸１－４０４）、およびＪａｇ１－Ｈｉｓ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）についても行った。結合Ｈｉｓ－標識リガンドを、マウス抗Ｈｉｓ　ｍＡｂ（１μｇ／ｍｌ、Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、ビオチニル化ヤギ抗マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）、およびストレプトアビジン－ＡＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）によって検出した。

【０３６６】

ＲＮＡ抽出およびリアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲ。２－Ｄ培養におけるＨＵＶＥＣからの全ＲＮＡの抽出は、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）をメーカーの指示にしたがって用いて行った。フィブリンゲルにおいて増殖するＨＵＶＥＣから全ＲＮＡを抽出するため、フィブリンゲルを、１０Ｘトリプシン－ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ）で５分間処理し、最上層の線維芽細胞を除去し、次いで、ＰＢＳに溶解した１０％ＦＢＳで中和した。次に、ゲル塊を、組織培養ウェルから取り出し、微小試験管において遠心（１０Ｋ、５分）し、余分の液体を除去した。得られたゲル「ペレット」を、溶解バッファー（ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット）で溶解し、さらに、２－Ｄ培養におけるＨＵＶＥＣと同様に処理した。ＲＮＡの量を、ＲＮＡ６０００ナノチップ、およびＡｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて評価した。７５００　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲ反応を三回実行した。正規化のために、ヒトのＧＡＰＤＨを参照遺伝子として用いた。発現レベルは、３回の別々の定量値から、コントロールに対する、ｍＲＮＡ変化の平均（±ＳＥＭ）倍数として表した。ＶＥＧＦＲ２、ＴＧＦβ２、およびＧＡＰＤＨのための、順行および逆行プライマーおよびプローブ配列は、下記の通り。

【０３６７】

【化８】

TGFb2

順行： GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (配列番号 70)

逆行： CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (配列番号 71)

プローブ:AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (配列番号 72)

VEGFR2

順行： CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (配列番号 73)

逆行： TGC AGT CCG AGG TCC TTT (配列番号 74)

プローブ:CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (配列番号 75)

GAPDH

順行： GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (配列番号 76)

逆行： GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (配列番号 77)

プローブ:CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (配列番号 78)

（実施例２）

ファージ抗ＤＬＬ４抗体の生成

重鎖および軽鎖の相補性決定域（ＣＤＲ）内部に多様性を導入することによって、単一骨組構造（ヒト化抗ＥｒｂＢ２抗体、４Ｄ５）の上に、合成ファージ抗体ライブラリーを構築した（Ｌｅｅ，Ｃ．Ｖ．　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３４０，１０７３－９３（２００４）；Ｌｉａｎｇ，Ｗ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２８１，９５１－６１（２００６））。天然ライブラリーを用いたプレートパンニングを、ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）イムノプレート上に固定したＨｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）に対して行った。４ラウンドの濃縮後、クローンをランダムに取り出し、ファージＥＬＩＳＡを用いて特異的結合因子を特定した。得られたｈＤＬＬ４結合クローンを、Ｈｉｓ標識マウスＤＬＬ４タンパクでさらにスクリーニングして、種間交差クローンを特定した。各陽性ファージクローンについて、重鎖および軽鎖の可変領域を、完全長ＩｇＧ鎖を発現するように修飾されたｐＲＫ発現ベクターにサブクローンした。重鎖および軽鎖構築物を、２９３またはＣＨＯ細胞に同時にトランスフェクションし、その発現抗体を、プロテインＡアフィニティーカラムを用いて血清無添加培地から精製した。精製抗体を、ＤＬＬ４とラットのＮｏｔｃｈ１－Ｆｃの間の相互作用を阻止するかどうかについてＥＬＩＳＡで調べ、完全長ヒトＤＬＬ４、またはマウスＤＬＬ４を発現する安定な細胞系統に対する結合について、ＦＡＣＳによって調べた。アフィニティー熟成については、最初の対象クローンから得られたＣＤＲループ（ＣＤＲ－Ｌ３、－Ｈ１、および－Ｈ２）の、三つの異なる組み合わせを有するファージライブラリーを、ソフトランダム化戦略によって、各選択位置が、約５０：５０の頻度で、非野生型残基に突然変異するか、または野生型として維持されるように構築した（Ｌｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００６，上記）。次に、ヒトおよびマウスのＨｉｓ標識ＤＬＬ４タンパクに対し、厳密性を次第に上昇させながら、４ラウンドの溶液相パンニングを行って高親和性クローンを特定した。

（実施例３）

抗ＤＬＬ４抗体の特徴

抗ＤＬＬ４　Ｍａｂの結合親和性を決めるために、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００による表面プラズモン共鳴（ＳＲＰ）計測を用いた（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）。簡単に言うと、供給業者の指示にしたがって、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシニミド（ＮＨＳ）によって活性化した。抗ＤＬＬ４抗体を、１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ４．８によって５μｇ／ｍｌに希釈し、次いで、５μｌ／分の流速

で注入して約５００反応単位（ＲＵ）の結合抗体を実現した。次に、未反応基をブロックするために１Ｍエタノールアミンを注入した。速度論的測定のために、ヒトまたはマウスのＤＬＬ４－Ｈｉｓ分子の、連続２倍希釈液（０．７ｎＭから５００ｎＭ）を、ＰＢＳにおいて、０．０５％Ｔｗｅｅｎ（商標）２０と共に、２５℃で、２５μｌ／分の流速で注入した。会合速度（ｋｏｎ）および解離速度（ｋｏｆｆ）は、単純な１対１　Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、３．２バージョン）を用いて計算した。平衡解離定数（Ｋｄ）は、ｋｏｆｆ／ｋｏｎとして計算した。この実験結果を表３に示す。抗体ＹＷ２６．８１は、ヒトおよびマウスＤＬＬ４に対して近似のＫｄ値を示し（Ｋｄ値は、それぞれ、０．１ｎＭ５および０．０９ｎＭ）、そのマウスモデルにおける評価を可能にした。

【０３６８】

表３：ヒトおよびマウスＤＬＬ４に対する抗ＤＬＬ４抗体の結合親和性および反応速度変化。“ＮＡ”は、測定が行われなかったことを示す。

【０３６９】

【表３】

クローン	マウスデルタ４　(ECD5.5)			ヒトデルタ４　(ECD5.5)		
	kon/10^5	koff10^{-4}	Kd(nM)	kon/10^5	koff/10^{-4}	Kd(nM)
YW26	0.57	16	28	0.3	7.4	25
YW26.6	4.1	0.61	0.15	2	0.49	0.25
YW26.14	3.3	0.73	0.22	1.8	0.66	0.37
YW26.20	3.3	1	0.3	1.7	0.79	0.46
YW26.34	3.6	0.65	0.18	1.9	0.67	0.35
YW26.82	5.4	0.46	0.09	2.4	0.37	0.15

（実施例４）

抗ＤＬＬ４抗体のさらに詳細な特徴

抗ＤＬＬ４Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２のエピトープマッピング：抗ＤＬＬ４Ｍａｂ２６．８２は、ヒトＤＬＬ４細胞外ドメイン（ＥＣＤ）の、ＥＧＦ様反復列番号２（ＥＧＬ２）中に存在する結合決定基を認識する。ＥＧＬ２は、ヒトＤＬＬ４　ＥＣＤのアミノ酸２５２－２８２を含む。簡単に言うと、ＤＬＬ４　ＥＣＤ突然変異は、アルカリフォスファターゼ融合タンパクとして発現され、抗体に結合する状態で評価される。図１１ａは、Ｃ－末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）融合タンパクとして発現される、一組のＤＬＬ４突然変異の模式図を示す。括弧は、融合タンパク内に含まれるＤＬＬ４配列を示す。該融合タンパクを含む２９３Ｔ細胞調整媒体を、精製抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ（ＹＷ２６．８２，０．５μｇ／ｍｌ）をコートした９６－ウェルマイクロタイタープレートにおいて試験した。結合ＤＬＬ４．ＡＰは、１－Ｓｔｅｐ　ＰＮＰＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）を基質として用い、ＯＤ　４０５ｎｍ吸光度測定によって検出した。Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ＤＬＬ４　ＥＧＬ２ドメインを含む構築物には結合したが、ＤＬＬ４　ＥＧＬ２ドメインを欠く構築物には結合しなかった。このことは、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ヒトＤＬＬ４　ＥＣＤのＥＧＬ２ドメイン中のエピトープを認識することを明らかにした。

【０３７０】

Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、マウスおよびヒトのＤＬＬ４に対し選択的に結合する。９６－ウェルのＮｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐプレートを、表示（１μｇ／ｍｌ）の精製組み換えタンパクでコートした。表示の濃度におけるＹＷ２６．８２の結合をＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。結合抗体は、ＴＭＢを基質として用い、抗ヒト抗体ＨＲＰ複合体、およびＯＤ　４５０ｎｍ吸光度測定によって検出した。抗ＨＥＲ２および組み換えＥｒ

ｂＢ２－ＥＣＤを、アッセイコントロールとして用いた（図１１ｂ）。この実験の結果を図１１ｂに示す。Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ヒトおよびマウスのＤＬＬ４には結合したが、ヒトのＤＬＬ１およびヒトのＪＡＧ１には検出可能となるほどには結合しなかった。これらの結果は、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２が、ＤＬＬ４に選択的に結合することを示す。

【０３７１】

さらに、ベクター、完全長ＤＬＬ４、Ｊａｇ１、またはＤＬＬ１によって一過性にトランスフェクションした２９３細胞のＦＡＣＳ分析も、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２がＤＬＬ４に選択的に結合することを示した。図１１ｃに示すように、ＹＷ２６．８２の著明な結合は、ＤＬＬ４トランスフェクション細胞にのみ検出された（上段パネル）。著明な結合は、ＤＬＬ１またはＪａｇ１トランスフェクション細胞には検出されなかった。Ｊａｇ１およびＤＬＬ１の発現は、それぞれ、組み換えラットＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、中段パネル）、および組み換えラットＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（ｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ、下段パネル）の結合によって確認された。ＹＷ２６．８２、ｒｒＮｏｔｃｈ１－Ｆｃ、またはｒｒＮｏｔｃｈ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）は、２μｇ／ｍｌで使用し、次いで、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を与えた。

【０３７２】

競合実験は、Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２が、ＮｏｔｃｈとＤＬＬ４との相互作用を効果的に、かつ選択的に阻止するが、他のＮｏｔｃｈリガンドに対してはそうしないことを示した。図１１ｄに示すように、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、ＤＬＬ１－ＡＰの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－ＡＰの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～１２ｎＭであった（左パネル）。抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、コートされたｒＮｏｔｃｈ１に対する、Ｊａｇ１－Ｈｉｓの結合は阻止しなかったが、ＤＬＬ４－Ｈｉｓの結合は阻止し、ＩＣ５０計算値は～８ｎＭであった（右パネル）。

【０３７３】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）において内因的に発現されたＤＬＬ４に対する、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２の特異的結合。コントロールまたはＤＬＬ４特異的ｓｉＲＮＡでトランスフェクションしたＨＵＶＥＣのＦＡＣＳ解析。２μｇ／ｍｌのＹＷ２６．８２を用い、その後、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＰＥ（１：５００，Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｅＲｅｓｅａｒｃｈ）で処理した。この実験の結果を図１１ｅに示す。結合は、トランスフェクションされないＨＵＶＥＣ（コントロール）および、コントロールｓｉＲＮＡによってトランスフェクションされたＨＵＶＥＣに観察された。対照的に、ＤＬＬ４　ｓｉＲＮＡでトランスフェクションされたＨＵＶＥＣでは、結合が著明に低下した。これらの実験は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２は、ＨＵＶＥＣにおいて内因的に発現されたＤＬＬ４に特異的に結合することを示す。

（実施例５）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビトロにおいて内皮細胞の増殖を増した

同時培養されるヒトの皮膚芽（ＳＦ）細胞の存在下に、フィブリンゲルにおいて増殖するヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）は、明瞭な腔様構造を持つ新芽を生成する（Ｎａｋａｔｓｕ，Ｍ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ　６６，１０２－１２（２００３））。抗ＤＤＬ４抗体ＹＷ２６．８２の添加は、新芽の長さおよび数を著明に増した（図７ａ）。タンパク複合体のγ－セクレターゼ活性によって触媒される、Ｎｏｔｃｈのタンパク分解処理は、Ｎｏｔｃｈ活性化時の必須の工程である（Ｂａｒｏｎ，Ｍ．Ｓｅｍｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　１４，１１３－９（２００３））。興味深いことに、γ－セクレターゼ阻害剤ジベンザゼピン（ＤＢＺ）（ｖａｎ　Ｅｓ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９５９－６３（２００５）；Ｍｉｌａｎｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ　Ｓｃｉ　８２，３４１－５８（２００４））は、ＨＵＶＥＣの発芽に対し同じ作用を及ぼした。これらの二つの処理の機序ははっきりと異なるのであるから、発芽増強は、明らかにＮｏｔｃｈシグナル伝達が原因である。Ｋｉ６７染色は、ＥＣ発芽の増強は、細胞増殖の上昇によることを明らかにした（図７ｂ）。元のフィブリンア

ッセイでは、ＨＵＶＥＣ発芽、および、それに続く腔形成は、同時培養されたＳＦ細胞によって支持された。ＳＦ細胞を、調整した培地で置換しても、抗ＤＬＬ４　ＭａｂおよびＤＢＺのいずれも、ＨＵＶＥＣ発芽を依然として強化することが可能であった（図１ｃ）。これは、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達におけるＥＣの自律的役割を支持する。逆の実験において、固定ＤＬＬ４タンパクによってＮｏｔｃｈを活性化すると、著明な増殖抑制がもたらされた（図７ｅ）。これらの所見は、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の活性化状態は、ＥＣ増殖と密接な関連のあることを示唆する。

（実施例６）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビボにおいて内皮細胞増殖を増した

生後間もないマウスの網膜は、明瞭に定められる一連の事象としてステレオタイプな血管パターンを発達させる（Ｓｔｏｎｅ，Ｊ．＆Ｄｒｅｈｅｒ，Ｚ．Ｊ Ｃｏｍｐ Ｎｅｕｒｏｌ ２５５，３５－４９（１９８７）；Ｇｅｒｈａｒｄｔ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １６１，１１６３－７７（２００３）；Ｆｒｕｔｔｉｇｅｒ，Ｍ．Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ ４３，５２２－７（２００２））。新生児網膜の増殖ＥＣにおけるＤＬＬ４の、顕著で、ダイナミックな発現は、網膜の血管発達の制御におけるＤＬＬ４の可能な役割を示唆する（Ｃｌａｘｔｏｎ，Ｓ．＆Ｆｒｕｔｔｉｇｅｒ，Ｍ．Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒ Ｐａｔｔｅｒｎｓ ５，１２３－７（２００４））。ＹＷ２６．８２の全身輸送によって、網膜血管に深刻な変化が引き起こされた。網膜にＥＣの大量の蓄積が起こり、原始的な血管形態を持つシート様構造が生成された（図７ｄ）。ＥＣにおけるＫｉ６７標識の著明な増加が観察された。これは、ＥＣ増殖の上昇を示す（図７ｈ）。したがって、マウス新生児においてＤＬＬ４遮断によって網膜ＥＣがこのように過剰増殖表現型を取ることは、インビトロ所見を確実なものとする。

（実施例７）

上皮細胞増殖の制御におけるＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈの必須の役割

ＶＥＧＦは、ＥＣの、いくつかの基本的面を調節する（Ｆｅｒｒａｒａ，Ｎ．Ｅｘｓ、２０９－３１（２００５）；Ｃｏｕｌｔａｓ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４３８，９３７－４５（２００５））。しかしながら、ＶＥＧＦシグナル伝達が、どのようにして複雑な血管形成過程、例えば、動静脈（ＡＶ）分化および階層的血管組織、明らかに、別の高度に統制されたシグナル伝達経路を必要とする事象たちに組み込まれるかは、比較的理解されていない。ゼブラフィッシュにおける遺伝学的実験から、ＶＥＧＦは、動脈内皮の分化の際、Ｎｏｔｃｈ経路の上流で活動することが示唆されている（Ｌａｗｓｏｎ，Ｎ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １２８，３６７５－８３（２００１））。我々は、ＶＥＧＦの、ＨＵＶＥＣ刺激は、ＤＬＬ４の表面発現の増加をもたらす（データ示さず）ことを見出した。これは、ＶＥＧＦ刺激によってＤＬＬ４ ｍＲＮＡが上方調整されることを報ずる最近の報告と一致する（Ｐａｔｅｌ，Ｎ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６５，８６９０－７（２００５））。興味深いことに、ＤＬＬ４それ自体は、Ｎｏｔｃｈ活性化後上方調整された（図１２）。これは、ＤＬＬ４が、それによってＶＥＧＦシグナル伝達をＮｏｔｃｈ経路に効果的に中継するポジティブフィードバック機構のあることを示唆する。簡単に言うと、ＤＢＺ（０．０８μＭ）の非存在下、または存在下に、Ｃ－末端固定Ｈｉｓ標識ヒトＤＬＬ４（アミノ酸１－４０４）によって、ＨＵＶＥＣを刺激した。刺激３６時間後、内因性ＤＬＬ４発現を、抗ＤＬＬ４抗体によるＦＡＣＳ分析によって調べた。

【０３７４】

注目すべきことに、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達を阻止することによって得られる、ＥＣの過剰増殖は、依然としてＶＥＧＦ依存性であった。３－Ｄフィブリンゲル培養において、ＶＥＧＦ　Ｍａｂによる処理は、ＤＢＺの存在下、非存在下のいずれにおいても、ＥＣ発芽の大部分を中絶した（図７ｆ）。これは、過剰増殖行動の一部は、ＶＥＧＦシグナル伝達の強化によるとする可能性を示唆する。実際、ＮｏｔｃｈをＹＷ２６．８２またはＤＢＺによって遮断すると、ＶＥＧＦＲ２の上方調整がもたらされる（図７ｇ）。したがって、ＶＥＧＦは、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ経路の上流で作用するが、一方、ＤＬＬ４／Ｎｏｔ

ｃｈは、ＶＥＧＦＲ２発現をネガティブに調整することによってその反応を微調整することが可能である。

（実施例８）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、内皮細胞分化を阻止し、動脈の発達を阻止した

ＥＣ増殖の上昇の外に、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈへの拮抗作用は、フィブリンゲルにおいてＥＣ新芽の急激な形態的変化をもたらした。多細胞の腔様構造の多くが消失した（図８ａ）。これは、欠陥性のＥＣ分化を示唆する。Ｍａｂ　ＹＷ２６．８２処理網膜では、放射状に交互に分枝する動脈および静脈の特徴的パターンが大きく破壊された。網膜動脈と関連する、抗α平滑筋アクチン（ＡＳＭＡ）染色は完全に消失した（図８ｃ）。この所見は、ＤＬＬ４＋／－胚における、動脈の欠陥性発達と驚くほど近似していた。これらの所見は、異なる角度からではあるが、ＥＣ分化制御におけるＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈの必須の役割に照明を当てる。

（実施例９）

ＴＦＧβ発現は、Ｎｏｔｃｈの活性化状態とリンクされる

Ｎｏｔｃｈ経路同様、ＴＧＦβシグナル伝達も、状況依存性であり、細胞の分化、増殖、および成長抑制に対し、多様な、しばしば反対の作用を及ぼす。さらに、ＴＧＦβ経路は、従来から、血管過程への関与が示されている（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００）；Ｏｓｈｉｍａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　１７９，２９７－３０２（１９９６）；Ｌａｒｓｓｏｎ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｅｍｂｏ　Ｊ　２０，１６６３－７３（２００１））。例えば、アクチビン受容体様キナーゼ１（ＡＬＫ１）、ＥＣ特異的Ｉ型ＴＧＦβ受容体の欠乏によって、卵黄嚢における原始的ＥＣネットワーク、および動静脈の機能不全（ＡＶＭ）がもたらされるが、これは、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達欠損を有するマウスによって共有される表現型である（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００）；Ｉｓｏ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｖａｓｃ　Ｂｉｏｌ　２３，５４３－５３（２００３））。これがきっかけとなって、我々は、これら二つの経路の間の、可能な接続の研究に導かれた。我々は、ＴＦＧβ２の発現が、Ｎｏｔｃｈの活性化状態と緊密にリンクすることを見出した（図８ｂ）。これは、ＴＧＦβ経路は、Ｎｏｔｃｈ経路の下流で活動する可能性のあることを示唆する。以上まとめると、我々の所見は、「シグナル伝達ルーター」として活動するＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ軸が、ＤＬＬ４発現を制御することによってＶＥＧＦシグナル伝達を組み込み、ＴＧＦβ経路と連結してＥＣ分化を増強するとするモデルを支持する。

（実施例１０）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、インビボにおいて腫瘍増殖を抑制した

腫瘍の血管形成時の、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達の可能な役割に直接取り組むために、我々は、前臨床腫瘍モデルにおいて、ＤＬＬ４遮断の腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた（図９ａ－ｄ）。ＨＭ７、Ｃｏｌｏ２０５、およびＣａｌｕ６異種移植腫瘍モデルにおいて（図９ａ－ｃ）、ＹＷ２６．８２処理は、腫瘍定着（腫瘍サイズが≧２５０ｍｍ^3）後に開始した。３種のモデル全てにおいて、コントロールと処理群の間の増殖速度における解離が、投与の３日後には明白となった。処理群の腫瘍体積は、２週間の処理に亘って静止したままであった。皮下の腫瘍ばかりでなく、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、マウスの乳腺脂肪パッドにおいて増殖する腫瘍も抑制した。ＭＤＡ－ＭＢ－４３５腫瘍モデルでは、処理は、腫瘍細胞注入の１４日後に開始した。コントロールと処理群の間の腫瘍増殖曲線の差は、投与後６日以内に明白となり、処理が続くにつれて次第に顕著になった（図９ｄ）。

【０３７５】

我々はさらに、前臨床腫瘍モデルにおいて、ＤＬＬ４および／またはＶＥＧＦ遮断の、種々の腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた（図９ｅ－ｆ；ｉ－ｐ）。ＭＶ－５２２およびＷＥＨＩ３異種移植腫瘍モデルでは、ＹＷ２６．８２処理および／または抗ＶＥＧＦ処理を、腫瘍定着後に開始した（腫瘍サイズが≧２５０ｍｍ^3）。ＭＶ－５２２モデルでは、ＹＷ

２６．８２および抗ＶＥＧＦ処理のいずれも、それぞれ腫瘍増殖を抑制したが、二つの処理の組み合わせがもっとも効果的であった。ＷＥＨＩ３モデルでは、抗ＶＥＧＦ処理は、腫瘍増殖にまったく作用を示さなかったが、一方、ＹＷ２６．８２は、腫瘍増殖の有意な抑制を示した。ＳＫ－ＯＶ－３Ｘ１、ＬＬ２、ＥＬ４、Ｈ１２９９、ＳＫＭＥＳ－１、ＭＸ－１、ＳＷ６２０、およびＬＳ１７４Ｔモデルでは、ＹＷ２６．８２処理（５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ、週２回）、および／または抗ＶＥＧＦ処理（５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ、週２回）を、腫瘍定着後に行った。これらのモデルそれぞれにおいて、ＹＷ２６．８２処理は、単独で、腫瘍増殖を抑制した。さらに、併用処理を試験した、これらのモデル全てにおいて、ＹＷ２６．８２は、抗ＶＥＧＦと組み合わされると効力の増強を示した。

（実施例１１）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、腫瘍内皮細胞の増殖を増した

腫瘍増殖抑制に鑑み、我々は、血管組織学実験のために、ＥＬ４マウスリンパ腫腫瘍モデルを用いた。我々は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理が、内皮細胞密度において目覚しい増加をもたらすことを見出した（図９ｇ）。逆に、抗ＶＥＧＦは、正反対の作用を及ぼした（図９ｇ）。ただし、両処理は、このモデルにおいて同様の効力を示した。

（実施例１２）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、腫瘍血管の還流を阻害した

ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈ経路のインビトロにおける遮断は、ＥＣによる腔様構造の形成を阻害するので（図８ａ）、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂによる処理が、腫瘍血管において同様の作用をもたらし、効率的血流に影響を及ぼすかを調べた。Ｍａｂ処置により腫瘍血管のレクチン標識の著しい減少が生じることが、ＦＩＴＣ－レクチンを用いた全身灌流により示された（図９ｈ）。注目すべきことに、ＡＬＫ－１欠損マウスにおける動静脈機能不全が、異常な血液循環を引き起こすことが示された（Ｕｒｎｅｓｓ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２６，３２８－３１（２０００））。胚網膜、および早期新生児網膜のいずれにおいても、ＡＶ分化においてＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達が決定的役割を担っているとすれば、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、腫瘍ＥＣの細胞の運命を決する特殊化に影響を及ぼし、方向性に欠陥を持つ血流を引き起こすことが可能と考えられる。実際、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理Ｃｏｌｏ２０５腫瘍では、ＥＣの高密度が、生存可能な腫瘍細胞の低含量と相関する領域があった。これは、低劣な血管機能を意味する。この血管の欠陥に関して理解を深めるには、血管画像技術を利用した今後の実験が必要とされる。

（実施例１３）

マウス小腸のホメオスタシスにおいてＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈは省略可能である

Ｎｏｔｃｈの包括的阻害に関する大きな不安は、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達が、生後の自己更新システムのホメオスタシスの制御において広範な役割を担っているのであるから、Ｎｏｔｃｈの阻害は有害である可能性のあることである。例えば、Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、小腸における、未分化の、腺窩前駆細胞の維持に必要とされる（ｖａｎ　Ｅｓ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９５９－６３（２００５）；Ｆｒｅ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４３５，９６４－８（２００５））。実際、全てのＮｏｔｃｈ活性を無差別に阻止すると考えられるγ－セクレターゼ阻害剤は、腺窩区画内部における杯細胞の大量増加のためにげっ歯類では有害な副作用をもたらす（Ｍｉｌａｎｏ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ　Ｓｃｉ　８２，３４１－５８（２００４）；Ｗｏｎｇ，Ｇ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７９，１２８７６－８２（２００４））。我々は、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂで処理したマウスの小腸を、免疫組織化学的分析によって調べた。ＤＢＺ処理とは対照的に、６週間の処理後、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理群と、コントロール群の間には、上皮性腺窩細胞の分化、または増殖プロフィールにおいて差は特定されなかった（図１０）。さらに、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂは、急激に分裂する転移増幅（ＴＡ）集団において、Ｎｏｔｃｈ標的遺伝子ＨＥＳ－１の発現を変えなかった（図１０）。これらの結果は、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、大部分、血管系に限局されるとする考えを支持する。

（実施例１４）

抗ＤＬＬ４抗体による処理は、成体の網膜の血管には影響しない
　ＤＬＬ４の阻止は、新生マウスにおける網膜血管の発達に対しては深刻な影響を及ぼすが、抗ＤＤＬ４抗体の投与は、成体の網膜血管に対し目に見える影響を与えない（図８ｄ）。したがって、ＤＬＬ４／Ｎｏｔｃｈシグナル伝達は、活発な血管形成中には決定的重要性を有するが、正常な血管維持における役割の重要性はより低い。この予想に一致して、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂ処理の進行時、１０ｍｇ／ｋｇを週に２回最大８週間投与した場合、腫瘍負荷マウスにおいて、外見上体重減少または死亡例は観察されなかった。腫瘍モデルでは、抗ＤＬＬ４　Ｍａｂと抗ＶＥＧＦは、腫瘍血管に対し正反対の作用を示す。これは、活動機序の非重複性を示唆する。
【０３７６】
　前記において、本発明が、例示に基づき、理解の明確性のためにやや詳細に説明されたわけであるが、これらの記述および実施例が、本発明の範囲限定するものと考えてはならない。
【手続補正２】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
　単離抗ＤＬＬ４抗体であって：
　（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
　（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
　（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
　（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＴＧＴＶＴ（配列番号１８）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
　（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、
　（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＹＩＳＰＮＳＧＦＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
　（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
　（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、
　を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。
【請求項２】
　単離抗ＤＬＬ４抗体であって：
　（ａ）下記から成る群から選ばれる、少なくとも、１、２、３、４、または５個の超可変領域（ＨＶＲ）配列：
　（ｉ）Ａ１～Ａ１１が、ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１０）である、配列Ａ１～Ａ１１を含むＨＶＲ－Ｌ１、
　（ｉｉ）Ｂ１～Ｂ７が、ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号１１）である、配列Ｂ１～Ｂ７を含むＨＶＲ－Ｌ２、
　（ｉｉｉ）Ｃ１～Ｃ９が、ＱＱＳＹＮＧＰＳＴ（配列番号１５）である、配列Ｃ１～Ｃ９を含むＨＶＲ－Ｌ３、
　（ｉｖ）Ｄ１～Ｄ１０が、ＧＦＴＦＴＤＮＷＩＳ（配列番号１）である、配列Ｄ１～Ｄ１０を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｖ）Ｅ１～Ｅ１８が、ＧＶＩＮＰＮＳＧＡＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）である、配列Ｅ１～Ｅ１８を含むＨＶＲ－Ｈ２、
（ｖｉ）Ｆ１～Ｆ１５が、ＶＹＹＣＡＲＤＮＦＧＧＹＦＤＹ（配列番号９）である、配列Ｆ１～Ｆ１５を含むＨＶＲ－Ｈ３；および、
（ｂ）少なくとも一つの変異ＨＶＲであって、配列番号１～１８に示される配列の少なくとも一残基の修飾を含む該変異ＨＶＲ配列、
を含む、単離抗ＤＬＬ４抗体。
【請求項３】
ＨＶＲ－Ｌ３変異種が、下記の位置：９１（ＳまたはW）、９２（ＹまたはＦ）、９３（Ｔ、Ｎ、またはＳ）、９４（ＴまたはＧ）、９５（Ｐ、Ｑ、Ａ、またはＴ）、および／または９６（Ｐ、Ｓ、Ａ、またはＶ）の、任意の組み合わせにおいて、１～６個（１、２、３、４、５、または６個）の置換を含む、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項４】
ＨＶＲ－Ｈ２変異種が、下記の位置：５０（Ｖ、Ｌ、またはＹ）、５２（ＮまたはＳ）、５２ａ（ＰまたはＳ）、または５３（Ｎ、Ｑ、Ｔ、またはＩ）の、任意の組み合わせにおいて、１～４個（１、２、３、または４個）の置換を含む、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項５】
１、２、３、４、５、または６個のＨＶＲを含む単離ＤＬＬ４抗体であって、各ＨＶＲは、配列番号１～１８から成る群から選ばれる配列を含むか、該配列から成るか、または該配列から事実上成り、配列番号１０はＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号１１はＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８は、ＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号１または２は、ＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３、４、５、６、７、または８は、ＨＶＲ－Ｈ２に対応し、配列番号９は、ＨＶＲ－Ｈ３に対応する、単離ＤＬＬ４抗体。
【請求項６】
請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１４、２、３、および９を含む、抗体。
【請求項７】
請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１５、１、５、および９を含む、抗体。
【請求項８】
請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１６、１、６、および９を含む、抗体。
【請求項９】
請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１７、１、７、および９を含む、抗体。
【請求項１０】
請求項５に記載の抗体であって、該抗体が、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それぞれ、順に、配列番号１０、１１、１８、１、８、および９を含む、抗体。
【請求項１１】
骨組構造配列の少なくとも一部が、ヒトの共通骨組構造配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の抗体。
【請求項１２】
請求項１または２に記載の抗体であって、前記修飾が、置換、挿入、または欠失である

、抗体。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのκサブグループ共通骨組構造配列を含む、抗体。
【請求項１４】
請求項１～１２のいずれかに記載の抗体であって、該抗体が、ヒトのサブグループＩＩＩ重鎖共通骨組構造配列を含む、抗体。
【請求項１５】
請求項１４に記載の抗体であって、該抗体が、位置７１、７３、または７８の一つ以上において置換を含む、抗体。
【請求項１６】
請求項１５に記載の抗体であって、前記置換が、Ｒ７１Ａ、Ｎ７３Ｔ、または、Ｎ７８Ａの内の一つ以上である、抗体。
【請求項１７】
請求項１～１６のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
【請求項１８】
請求項１７に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１９】
前記ベクターが発現ベクターである、請求項１８に記載のベクター。
【請求項２０】
請求項１８または１９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項２１】
前記宿主細胞が原核細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２２】
前記宿主細胞が真核細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２３】
前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２４】
抗ＤＬＬ４抗体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）請求項１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）該抗体を回収すること、を含む方法。
【請求項２５】
抗ＤＬＬ４免疫複合体を作製する方法であって、該方法が、（ａ）請求項１９に記載のベクターを、適切な宿主細胞において発現すること、および、（ｂ）前記抗体を回収すること、を含む方法。
【請求項２６】
前記宿主細胞が原核細胞である、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記宿主細胞が真核細胞である、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２８】
ＤＬＬ４の検出のための方法であって、該方法が、生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
【請求項２９】
ＤＬＬ４発現に関連する障害の診断を補助するための方法であって、該障害を有するか、または有することが疑われる患者から得た生物サンプルにおいて、ＤＬＬ４－抗ＤＬＬ４抗体複合体を検出することを含む、方法。
【請求項３０】
前記抗ＤＬＬ４抗体が、検出可能に標識される、請求項２８～２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】

請求項１～１６のいずれかに記載の抗ＤＬＬ４抗体を含む組成物。
【請求項３２】
請求項１７～１９のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組成物。
【請求項３３】
前記組成物が担体をさらに含む、請求項３１または３２に記載の組成物。
【請求項３４】
腫瘍、癌、または細胞増殖性障害を処置するための組成物であって、請求項１～１６のいずれかに記載の抗体を含む、組成物。
【請求項３５】
前記腫瘍、癌、または細胞増殖性障害が、結腸癌、肺癌、または乳癌である、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
抗血管形成剤をさらに含む、請求項３４または３５に記載の組成物。
【請求項３７】
前記抗血管形成剤が、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）の拮抗剤である、請求項３６に記載の組成物。
【請求項３８】
前記ＶＥＧＦ拮抗剤が、抗ＶＥＧＦ抗体である、請求項３７に記載の組成物。
【請求項３９】
前記抗ＶＥＧＦ抗体が、ベバシズマブである、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
有効量の化学療法剤をさらに含む、請求項３４～３９のいずれかに記載の組成物。
【請求項４１】
血管形成に関連する病的状態を有する被験体において抗血管形成剤の効力を強化する組成物であって、該抗血管形成剤に加えて、請求項１～１６のいずれかに記載の抗体を含む、組成物。
【請求項４２】
血管形成に関連する前記病的状態が、腫瘍、癌、および／または細胞増殖性障害である、請求項４１に記載の組成物。
【請求項４３】
血管形成に関連する前記病的状態が、眼内血管新生症である、請求項４１に記載の組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/070513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 C12N15/13 C12N5/12 A61K39/395 A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU ZHAO-JUN ET AL: "Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAY 2006, vol. 20, no. 7, May 2006 (2006-05), pages 1009-1011, XP002491745 ISSN: 1530-6860 the whole document	28
Y		1-27, 29-43

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 2008	27/08/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ferreira, Roger

6

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is critical for tumor growth and *angiogenesis*." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721 & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X abstract	1-43
Y	PATEL NILAY S ET AL: "Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 8690-8697, XP002452160 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document	1-43
Y	WO 2005/012359 A (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; GERBER HANSPETER [US]; LIANG WE) 10 February 2005 (2005-02-10) cited in the application abstract claims 1-69	1-43
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-43
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	1-43

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REHMAN AASIA O ET AL: "Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 16, no. 6, May 2006 (2006-05), pages 293-300, XP002457721 ISSN: 0962-8924 the whole document	
A	WILLIAMS CASSIN KIMMEL ET AL: "Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function" BLOOD, vol. 107, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 931-939, XP002457722 ISSN: 0006-4971 the whole document	
A	MAILHOS CAROLINA ET AL: "Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 69, no. 2-3, December 2001 (2001-12), pages 135-144, XP002452161 ISSN: 0028-0836 the whole document	
A	LIU ZHAO-JUN ET AL: "REGULATION OF NOTCH1 AND DLL4 BY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS FOR MODULATING ARTERIOGENESIS AND ANGIOGENESIS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 23, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 14-25, XP009083465 ISSN: 0270-7306 the whole document	
A	DORSCH MARION ET AL: "Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease" BLOOD 15 SEP 2002,, vol. 100, no. 6, 15 September 2002 (2002-09-15), pages 2046-2055, XP002484537 the whole document	

-/--

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1083-1087, XP002457725 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-43
P,X	NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1032-1037, XP002457724 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-43
P,X	LOBOV I B ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 9, February 2007 (2007-02), pages 3219-3224, XP002457726 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-43
P,X	US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22) the whole document	1-43
P,X	WO 2007/028110 A (VASGENE THERAPEUTICS INC [US]; GILL PARKASH [US]; DUARTE ANTONIO [PT];) 8 March 2007 (2007-03-08) the whole document	1-43
E	WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document	1-43
T	SAINSON R C A ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395, XP002457727 ISSN: 1471-4914	

-/--

6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth" NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM, vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331, XP002457728 ISSN: 1474-175X 1474-1768	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/070513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005012359 A	10-02-2005	AU 2004262006 A1	10-02-2005
		BR PI0412637 A	26-09-2006
		CA 2533297 A1	10-02-2005
		EP 1648939 A2	26-04-2006
		JP 2007526756 T	20-09-2007
		KR 20060067950 A	20-06-2006
		MX PA06001319 A	04-05-2006
		US 2005106667 A1	19-05-2005
US 2006134121 A1	22-06-2006	NONE	
WO 2007028110 A	08-03-2007	AU 2006287228 A1	08-03-2007
		CA 2621226 A1	08-03-2007
		EP 1928486 A2	11-06-2008
WO 2007070671 A	21-06-2007	AU 2006326417 A1	21-06-2007
		US 2008107648 A1	08-05-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N 5/00	A	4H045
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12N 5/00	B	
A61K 39/395	*(2006.01)*	C12P 21/02	C	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K 39/395	E	
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K 39/395	T	
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P 35/00		
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61K 45/00		
A61P 15/00	*(2006.01)*	A61P 1/04		
A61P 27/02	*(2006.01)*	A61P 11/00		
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P 15/00		
G01N 33/53	*(2006.01)*	A61P 27/02		
		A61P 35/02		
		G01N 33/53	D	

(31)優先権主張番号 60/866,767
(32)優先日 平成18年11月21日(2006.11.21)
(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ヤン, ミンホン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティ, ナンタケット ストリート ４１１
(72)発明者 ウー, ヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティ, ブライス ストリート １１６０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA44 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA11 DA02 DA03 DA06 EA03 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA14
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA05 DA13 DA14
4B065 AA26X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA25 CA44 CA46
4C084 AA19 MA16 MA55 MA66 NA05 NA14 ZA331 ZA332 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 AA26 BB31 BB36 BB41 BB43 BB44 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA28 EA50 EA51 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	使用抗DLL4抗体和抗DLL4抗体的方法		
公开(公告)号	JP2009539384A	公开(公告)日	2009-11-19
申请号	JP2009514511	申请日	2007-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ヤンミンホン ウーヤン		
发明人	ヤン, ミンホン ウー, ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K39/395 A61P35/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P35/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K45/06 A61K2039/505 A61K2039/507 A61P1/04 A61P11/00 A61P15/00 A61P27/02 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/74 C07K2317/76 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/02.C A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P35/02 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA16 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA26 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/811349 2006-06-06 US 60/811357 2006-06-06 US 60/866772 2006-11-21 US 60/866767 2006-11-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了抗DLL4抗体，以及包含这些抗体的组合物和使用这些抗体的方法。

Lone 26.20

VH

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGVIKPNSGATEYADSV
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:54)

VL

QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYKGPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:55)

Lone 26.14

VH

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFRDNWISWVRQAPGKGLEWVGVIKPNSGGTDYADSV
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:56)

VL

QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVKGPATFGQGTEVEIKR (SEQ ID NO:57)

Lone 26.82

VH

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGXISPNSGFTYYADSV
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (SEQ ID NO:58)

VL

QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

FIG. 6