

(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2008-505182
(P2008-505182A)

(43) 公表日 平成20年2月21日(2008.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-520391 (P2007-520391)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月30日 (2005. 6. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月5日 (2007. 3. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/023413
 (87) 国際公開番号 W02006/014335
 (87) 国際公開日 平成18年2月9日 (2006. 2. 9)
 (31) 優先権主張番号 60/585, 132
 (32) 優先日 平成16年7月2日 (2004. 7. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

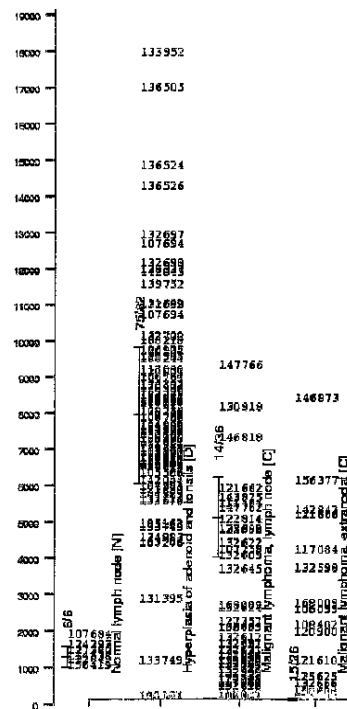
(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 02, サン マテオ, タリータウン
 ストリート 1400

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非ホジキンリンパ腫の治療のための組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の非ホジキンリンパ腫の治療に有用な組成物と、同用途のためにその組成物を使用する方法に関するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法であって、細胞を、細胞成長を阻害する U N Q 7 3 3 アンタゴニストに接触させる方法。

【請求項 2】

非ホジキンリンパ腫を有する哺乳動物の治療的処置方法であって、該哺乳動物に治療的に有効な量の U N Q 7 3 3 アンタゴニストを投与することにより、リンパ腫を有効に治療的処置する方法。

【請求項 3】

非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法であって、該リンパ腫に U N Q 7 3 3 アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を阻害する方法。 10

【請求項 4】

非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法であって、U N Q 7 3 3 を発現する細胞及び / 又は U N Q 7 3 3 に応答する細胞に U N Q 7 3 3 アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を阻害する方法。

【請求項 5】

非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法であって、該リンパ腫中に存在する細胞に U N Q 7 3 3 アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を阻害する方法。

【請求項 6】

U N Q 7 3 3 の発現又は活性の増大に関連する細胞増殖障害の治療又は予防方法であって、そのような処置が必要な被験者に対して U N Q 7 3 3 アンタゴニストの有効量を投与する方法。 20

【請求項 7】

U N Q 7 3 3 アンタゴニストが U N Q 7 3 3 ポリペプチドに結合する、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

U N Q 7 3 3 アンタゴニストが非ホジキンリンパ腫細胞上の U N Q 7 3 3 に結合する、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

U N Q 7 3 3 アンタゴニストが U N Q 7 3 3 を発現する細胞及び / 又は U N Q 7 3 3 に応答する細胞の死を引き起こす、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 10】

U N Q 7 3 3 アンタゴニストが抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の U N Q 7 3 3 ポリペプチドへの結合が、このポリペプチドを発現する細胞及び / 又はポリペプチドに応答する細胞の成長を阻害する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

細胞が癌細胞であって、U N Q 7 3 3 アンタゴニストが、U N Q 7 3 3 を発現する細胞及び / 又は U N Q 7 3 3 に応答する細胞の死を引き起こす、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 13】

細胞が癌細胞であって、アンタゴニストの U N Q 7 3 3 ポリペプチドへの結合が、このポリペプチドを発現する細胞及び / 又はポリペプチドに応答する細胞の死を引き起こす、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

U N Q 7 3 3 アンタゴニストが抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子であって、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の U N Q 7 3 3 ポリペプチドへの結合が、このポリペプチドを発現する細胞及び / 又はポリペプチドに応答する細胞の死 50

を引き起こす、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

UNQ733 アンタゴニストが UNQ733 の活性を抑制する、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

UNQ733 タンパク質の酵素的プロセッシングを調節することにより、アンタゴニストが UNQ733 の活性を抑制する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

UNQ733 タンパク質の酵素的プロセッシングが、UNQ733 を切断するプロタンパク質転換酵素を抑制することにより調節される、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

アンタゴニストがモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体又は一本鎖抗体である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

アンタゴニストを成長阻害剤又は細胞障害剤に抱合させる、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

被験者に対して化学療法剤の投与も行う、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

アンタゴニストが、CHO 細胞又は細菌細胞中で生成された結合オリゴペプチド又は抗体を含む、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 22】

細胞増殖障害が癌であって、UNQ733 アンタゴニストが抗 UNQ733 抗体、UNQ733 結合オリゴペプチド、UNQ733 結合無機又は有機小分子である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 23】

アンタゴニストが、UNQ733 ポリペプチドを発現する細胞及び / 又は UNQ733 に応答する細胞を直接死滅させるか、又はその成長を阻害する、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 24】

アンタゴニストが、UNQ733 ポリペプチドの細胞成長増強活性をアンタゴナイズする、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

細胞増殖障害が非ホジキンリンパ腫である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

細胞増殖障害が過形成である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

過形成が患部の非悪性扁桃腺組織である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 28】

対象の非ホジキンリンパ腫の診断方法であって、対象のリンパ腫起源の細胞を含む組織細胞からなる試験試料及び同じ組織由来の既知の細胞からなるコントロール試料中の UNQ733 のレベルを決定し、試験試料中の UNQ733 のレベルがコントロール試料より高い場合にリンパ腫の存在が示される方法。

【請求項 29】

個体が非ホジキンリンパ腫に罹患する危険を有するかどうかを決定する方法であって、該個体の対象のリンパ腫起源の細胞を含む組織細胞からなる試験試料及び同じ組織由来の既知の細胞からなるコントロール試料中の UNQ733 のレベルを決定し、試験試料中の

50

UNQ733のレベルがコントロール試料より高い場合に個体がリンパ腫に罹患する危険を有することが示される方法。

【請求項30】

UNQ733のレベルは試験試料中のUNQ733RNAのレベルに基づいて決定する、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項31】

UNQ733のレベルは試験試料中のUNQ733ポリペプチドのレベルに基づいて決定する、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項32】

UNQ733のレベルは試験試料中のUNQ733タンパク質活性のレベルに基づいて決定する、請求項28又は29に記載の方法。

10

【請求項33】

UNQ733ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子に試料を曝し、試料中のUNQ733ポリペプチドに対する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の結合を決定する、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項34】

抗体、UNQ733結合オリゴペプチド、又はUNQ733結合無機小分子又は有機小分子を、検出可能に標識する及び/又は固体支持体に取り付ける、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

非ホジキンリンパ腫の治療用の生物学的活性剤をスクリーニングする方法であって、候補剤を、プロモーターに作用可能にリンクさせたUNQ733をコードする統合された導入遺伝子を含むゲノムを持つトランスジェニック哺乳動物と混合し、該導入遺伝子により該哺乳動物を非ホジキンリンパ腫に罹患させ、該哺乳動物の非ホジキンリンパ腫に対する該薬剤の影響を決定する方法。

20

【請求項36】

非ホジキンリンパ腫の治療用の生物学的活性剤をスクリーニングする方法であって、候補剤を、各細胞がプロモーターに作用可能にリンクするUNQ733をコードする統合された導入遺伝子を含んでいるトランスジェニック哺乳動物の細胞培養物と混合し、該導入遺伝子により該哺乳動物を非ホジキンリンパ腫に罹患させ、トランスジェニック哺乳動物の細胞培養物に対する該薬剤の影響を決定する方法。

30

【請求項37】

候補剤が、抗体又はその断片、オリゴペプチド、或いは無機小分子又は有機小分子である、請求項35又は36に記載の方法。

【請求項38】

宿主中の非ホジキンリンパ腫を標的とした薬剤の使用方法であって、宿主に対し、UNQ733に結合する分子にリンクされた形態の前記治療剤を投与することにより、宿主中のリンパ腫を標的として薬剤を使用する方法。

【請求項39】

UNQ733に結合する分子が、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である、請求項38に記載の方法。

40

【請求項40】

UNQ733に結合する分子が、インビボ又はインビトロで細胞上に位置するUNQ733に特異的に結合する能力を有する、請求項38に記載の方法。

【請求項41】

UNQ733に結合する分子が抗体である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

抗体を、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーマ、又はそれらの子孫によって製造する

50

、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

抗体が、ATCC 寄託番号 PTA - 6026、PTA - 6027、PTA - 6028、PTA - 6029、PTA - 6030、PTA - 6031、PTA - 6032、PTA - 6033 又は PTA - 6034 の抗体と同じ UNQ 733 上のエピトープに結合する、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

抗体が、UNQ 733 に対する結合について、ATCC 寄託番号 PTA - 6026、PTA - 6027、PTA - 6028、PTA - 6029、PTA - 6030、PTA - 6031、PTA - 6032、PTA - 6033 又は PTA - 6034 の抗体と競合する、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 5】

UNQ 733 が無細胞環境内において、インビボ又はインビトロでの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

容器及び容器内に収容される組成物を備えた製造品であって、組成物が UNQ 733 アンタゴニストを含む製造品。

【請求項 4 7】

非ホジキンリンパ腫の治療的処置のための組成物の使用法を記載した、容器に貼付されるラベル、及び/又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を備える、請求項 4 6 に記載の製造品。

20

【請求項 4 8】

UNQ 733 アンタゴニストを含む組成物を備えたキットであって、場合によっては非ホジキンリンパ腫の治療のための組成物の使用方法に関する指示を更に含むキット。

【請求項 4 9】

UNQ 733 ポリペプチドに結合する分子を含む組成物であって、非ホジキンリンパ腫に罹患していると思われる個体由来の試験試料中の UNQ 733 ポリペプチドの検出に適している組成物。

【請求項 5 0】

結合分子が、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である、請求項 4 9 に記載の組成物。

30

【請求項 5 1】

結合分子が、検出アッセイにおいて UNQ 733 に対する結合能を有する抗体である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

検出アッセイが、ウェスタンブロット、免疫沈降又は免疫染色である、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

抗体が、ATCC 寄託番号 PTA - 6026、PTA - 6027、PTA - 6028、PTA - 6029、PTA - 6030、PTA - 6031、PTA - 6032、PTA - 6033 又は PTA - 6034 のハイブリドーマによって製造される、請求項 4 9 に記載の組成物。

40

【請求項 5 4】

抗体が、ATCC 寄託番号 PTA - 6026、PTA - 6027、PTA - 6028、PTA - 6029、PTA - 6030、PTA - 6031、PTA - 6032、PTA - 6033 又は PTA - 6034 のハイブリドーマによって製造される抗体と同じ UNQ 733 上のエピトープに結合する、請求項 4 9 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

抗体が、UNQ 733 に対する結合について、ATCC 寄託番号 PTA - 6026、PTA - 6027、PTA - 6028、PTA - 6029、PTA - 6030、PTA - 6

50

031、PTA-6032、PTA-6033 又は PTA-6034 のハイブリドーマによって製造された抗体と競合する、請求項49に記載の組成物。

【請求項56】

更に担体を含む、請求項49に記載の組成物。

【請求項57】

容器及び容器内に収容される組成物を備えた製造品であって、組成物が、UNQ733ポリペプチドに結合する分子を含み、且つ非ホジキンリンパ腫に罹患していると思われる個体由来の試験試料中のUNQ733ポリペプチドの検出に適している、製造品。

【請求項58】

非ホジキンリンパ腫の検出のための組成物の使用法を記載した、容器に貼付されるラベル、及び/又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を備える、請求項57に記載の製造品。

10

【請求項59】

結合分子が、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である、請求項57に記載の製造品。

【請求項60】

結合分子が、検出アッセイにおいてUNQ733に対する結合能を有する抗体である、請求項59に記載の製造品。

【請求項61】

検出アッセイが、ウェスタンブロット、免疫沈降又は免疫染色である、請求項60に記載の製造品。

20

【請求項62】

抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーマによって製造される、請求項59に記載の製造品。

【請求項63】

抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーマによって製造される抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する、請求項59に記載の製造品。

30

【請求項64】

抗体が、UNQ733に対する結合について、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーマによって製造される抗体と競合する、請求項59に記載の製造品。

【請求項65】

UNQ733ポリペプチドに結合する分子を含む組成物を備えたキットであって、場合によっては非ホジキンリンパ腫の検出のための組成物の使用方法に関する指示を更に備えるキット。

40

【請求項66】

結合分子が抗体である、請求項65に記載のキット。

【請求項67】

抗体が、検出アッセイにおいてUNQ733に対する結合能を有する、請求項66に記載のキット。

【請求項68】

検出アッセイが、ウェスタンブロット、免疫沈降又は免疫染色である、請求項67に記載のキット。

【請求項69】

抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、

50

P T A - 6 0 2 9、P T A - 6 0 3 0、P T A - 6 0 3 1、P T A - 6 0 3 2、P T A - 6 0 3 3 又は P T A - 6 0 3 4 のハイブリドーマによって製造される、請求項 6 6 に記載のキット。

【請求項 7 0】

抗体が、A T C C 寄託番号 P T A - 6 0 2 6、P T A - 6 0 2 7、P T A - 6 0 2 8、P T A - 6 0 2 9、P T A - 6 0 3 0、P T A - 6 0 3 1、P T A - 6 0 3 2、P T A - 6 0 3 3 又は P T A - 6 0 3 4 のハイブリドーマによって製造される抗体と同じ U N Q 7 3 3 上のエピトープに結合する、請求項 6 6 に記載のキット。

【請求項 7 1】

抗体が、U N Q 7 3 3 に対する結合について、A T C C 寄託番号 P T A - 6 0 2 6、P T A - 6 0 2 7、P T A - 6 0 2 8、P T A - 6 0 2 9、P T A - 6 0 3 0、P T A - 6 0 3 1、P T A - 6 0 3 2、P T A - 6 0 3 3 又は P T A - 6 0 3 4 のハイブリドーマによって製造される抗体と競合する、請求項 6 6 に記載のキット。

10

【請求項 7 2】

非ホジキンリンパ腫が、B 細胞リンパ腫、広汎性大 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、悪性リンパ腫、悪性 T 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫又は粘膜関連リンパ組織リンパ腫である、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

非ホジキンリンパ腫が、B 細胞リンパ腫、広汎性大 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、悪性リンパ腫、悪性 T 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫又は粘膜関連リンパ組織リンパ腫である、請求項 4 9 ないし 5 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

発明の分野

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

【0 0 0 2】

発明の背景

30

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

リンパ球、白血球、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞等の血液の細胞要素が生成されるプロセスである血球新生の間に生成される細胞に関する癌は、造血性癌と呼ばれている。血液及びリンパ組織に見られ、免疫応答に重要なリンパ球は、それぞれ液性免疫及び細胞免疫を媒介する、B リンパ球（B 細胞）及び T リンパ球（T 細胞）という 2 種類に大きく分類される。

40

【0 0 0 3】

B 細胞は骨髄で成熟し、それらの細胞表面で抗原結合性抗体を発現する骨髄から放出される。まず、ナイーブ B 細胞は、その膜結合性抗体が特異的な抗原と遭遇すると、急速に分割し始め、その子孫は記憶 B 細胞及び「形質細胞(plasma cell)」と称されるエフェクター細胞に分化する。記憶 B 細胞はより長い寿命を持ち、最初の親細胞と同じ特異性を有する膜結合性抗体を発現し続ける。形質細胞は膜結合性抗体を産出しないが、代わりに分泌可能な形態の抗体を産出する。分泌抗体は液性免疫の主要なエフェクター分子である。

T 細胞は、未成熟な T 細胞の増殖及び分化の環境となる胸腺で成熟しする。T 細胞が成

50

熟する間、T細胞では、T細胞レセプターを産生する遺伝子再編成と、成熟T細胞の細胞表面の表現型の決定を助けるポジティブ及びネガティブ選択が行われる。成熟T細胞の特徴的な細胞表面マーカーは、CD3、即ちT細胞レセプター複合体と、コアレセプターのCD4又はCD8である。

【0004】

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

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

哺乳動物の癌治療は上記のような進歩を見ているが、それぞれ哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性の細胞成長及び/又は生存を有効に抑制するためのさらなる治療薬に対する需要は依然大きい。本発明は、多種多様な非ホジキンリンパ腫に異常に高いレベルで発現するポリペプチドを開示するものであり、このポリペプチドを非ホジキンリンパ腫の診断及び治療における診断的及び/又は治療的標的として使用するための方法及び組成物を提供する。

【0005】

発明の開示

本発明は、対応する正常な細胞種類と比較した場合に、非ホジキン腫瘍によって、特異的に、異なって、及び/又は高いレベルで発現される細胞ポリペプチド（及びそのコード化核酸、変異体又は断片）の同定に関する。興味深く且つ重要なことに、この細胞ポリペプチドは、B細胞及びT細胞リンパ腫を含む広範囲の非ホジキンリンパ腫に亘って高いレベルで発現される。また、本発明の一部は、非ホジキンリンパ腫の種類特定のサブセットに関し、ポリペプチドが差次的に制御されることを（本明細書に記載のように）実質的

に明らかにすることに基づいている。これにより、必要に応じて、非ホジキンリンパ腫の広いカテゴリを集合的に構成する幅広い腫瘍種類のアレイの中から選択されたサブセットに対する治療的アプローチを非常に有利に調整することができる。このポリペプチドを本明細書ではUNQ733ポリペプチドと呼ぶ。このポリペプチドは、哺乳動物の癌治療の有効な標的として機能すると考えられる。

従って、一態様において、本発明は、非ホジキンリンパ腫細胞の成長を抑制する方法であって、細胞を、細胞成長を抑制するUNQ733アンタゴニストに接触させる方法を提供する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストはUNQ733ポリペプチドに結合する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは非ホジキンリンパ腫細胞上のUNQ733に結合する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストはUNQ733を
10 発現する細胞及び/又はUNQ733に应答する細胞の死を引き起こす。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である。一実施形態では、UNQ733ポリペプチドに対する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の結合は、このポリペプチドを発現する細胞及び/又はこのポリペプチドに应答する細胞の成長を抑制する。一実施形態では、細胞は癌細胞であり、UNQ733アンタゴニストはUNQ733ポリペプチドを発現する及び/又はUNQ733ポリペプチドに应答する細胞の死を引き起こす。一実施形態では、細胞は癌細胞であり、UNQ733ポリペプチドに対するアンタゴニストの結合は、このポリペプチドを発現する細胞及び/又はこのポリペプチドに应答する細胞の死を引き起こす。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子であり
20 、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子のUNQ733ポリペプチドに対する結合は、このポリペプチドを発現する細胞の死を引き起こす。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、例えばUNQ733タンパク質の酵素的プロセッシングを調整することにより（例えば、UNQ733を切断するプロタンパク質転換酵素を抑制することにより）、UNQ733の活性化を抑制する。一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、UNQ733結合オリゴペプチド及び無機小分子及び有機小分子に結合するUNQ733は、場合によっては、成長阻害剤又は毒素等の細胞障害剤に抱合させることができ、それらの薬剤には例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位元素、核酸分解酵素等が含まれる。本発明の方法の一部の
30 実施形態では、被験者に化学療法剤も投与する。本発明の方法に使用される抗体及びUNQ733結合オリゴペプチドは、CHO細胞及び細菌細胞を含む任意の適切な宿主細胞中で作成できる。

【0006】

別の態様では、本発明は、非ホジキンリンパ腫を有する哺乳動物の治療的処置方法であって、UNQ733アンタゴニストの治療的有効量をこのような哺乳動物に投与し、よってこの腫瘍を有効に治療する方法を提供する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストはUNQ733ポリペプチドに結合し、よってこの腫瘍を有効に治療する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、例えばUNQ733タン
40 パク質の酵素的プロセッシングを調節することにより（例えば、UNQ733を切断するプロタンパク質転換酵素を抑制することにより）、UNQ733の活性化を抑制する。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、UNQ733結合オリゴペプチド及びUNQ733結合無機小分子又は有機小分子は、場合によっては成長阻害剤又は毒素などの細胞障害剤に抱合させてもよく、それら薬剤には例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位元素、核分解酵素等が含まれる。本発明の方法の一部の実施形態では、被験者に化学療法剤の投与も行う。本発明の方法に用いられる抗体及びUNQ733結合オリゴペプチドは、例えばCHO細胞及び細菌細胞を含む任意の適切な宿主細胞中において製造できる。

10

20

30

40

50

一態様において、本発明は、リンパ腫にUNQ733アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を抑制する、非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法を提供する。一態様では、本発明は、UNQ733を発現する細胞及び/又はUNQ733に応答する細胞にUNQ733アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を抑制する、非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法を提供する。一態様では、本発明は、非ホジキンリンパ腫中に存在する及び/又は隣接する細胞にUNQ733アンタゴニストを投与することによりリンパ腫の成長を抑制する、非ホジキンリンパ腫の成長阻害方法を提供する。一実施形態では、前記細胞は非ホジキンリンパ腫細胞ではなく(例えばT細胞又はB細胞でなく)、例えば、前記細胞は間質細胞である。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは非ホジキンリンパ腫細胞上のUNQ733ポリペプチドに結合する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、UNQ733を発現する非ホジキンリンパ腫細胞及び/又はUNQ733に応答する非ホジキンリンパ腫細胞の死を引き起こす。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である。一実施形態では、UNQ733ポリペプチドに対する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の結合は、このポリペプチドを発現する及び/又はこのポリペプチドに応答する非ホジキンリンパ腫細胞の成長を抑制する。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子であり、UNQ733ポリペプチドに対する抗体、オリゴペプチド又は有機小分子の結合は、このポリペプチドを発現する及び/又はこのポリペプチドに応答する非ホジキンリンパ腫細胞の死を引き起こす。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体、UNQ733結合オリゴペプチド及びUNQ733結合無機小分子又は有機小分子は、場合によっては成長阻害剤又は毒素などの細胞障害剤に結合させてもよく、それら薬剤には例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位元素、核分解酵素等が含まれる。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、例えばUNQ733タンパク質の酵素的プロセッシングを調節することにより(例えば、UNQ733を切断するプロタンパク質転換酵素を抑制することにより)、UNQ733の活性化を抑制する。本発明の方法の一部の実施形態では、化学療法剤も投与する。本発明の方法に用いられる抗体及びUNQ733結合オリゴペプチドは、例えばCHO細胞及び細菌細胞を含む任意の適切な宿主細胞中で生成することができる。

10

20

30

【0007】

別の態様において、本発明は、UNQ733の発現又は活性の増大に関連する細胞増殖障害の治療法又は予防法であって、そのような治療を必要とする被験者に対し、有効量のUNQ733アンタゴニストを投与する方法を提供する。一実施形態では、細胞増殖障害は癌であり、UNQ733アンタゴニストは抗UNQ733抗体、UNQ733結合オリゴペプチド、UNQ733結合無機小分子又は有機小分子である。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは、例えばUNQ733タンパク質の酵素的プロセッシングを調節することにより(例えば、UNQ733を切断するプロタンパク質転換酵素を抑制することにより)、UNQ733の活性化を抑制する。細胞増殖障害の効果的な治療又は予防は、UNQ733ポリペプチドを発現する細胞及び/又はUNQ733ポリペプチドに応答する細胞を直接死滅させること又はその成長を阻害すること、或いはUNQ733ポリペプチドの活性を増強する細胞成長をアンタゴナイズすることにより行うことができる。一実施形態では、細胞増殖障害は非ホジキンリンパ腫である。一実施形態では、細胞増殖障害は過形成であり、一実施形態ではこれは罹患した非悪性扁桃腺組織である。

40

一態様では、本発明は、対象とする非ホジキンリンパ腫の診断方法であって、対象とするリンパ腫起源の細胞を含む組織細胞からなる試験試料中と、同じ組織由来の既知の細胞からなるコントロール試料中のUNQ733のレベルを決定し、コントロール試料と比較して試験試料中のUNQ733のレベルが高い場合、リンパ腫の存在が示される方法を提供する。別の態様では、本発明は、非ホジキンリンパ腫に罹患する危険を有する個体を決定する方法であって、前記個体由来の対象とするリンパ腫起源の細胞を含む組織細胞から

50

なる試験試料中と、同じ組織由来の既知の細胞からなるコントロール試料中のUNQ733のレベルを決定し、コントロール試料と比較して試験試料中のUNQ733のレベルが高い場合、その個体がリンパ腫の危険を有することが示される方法を提供する。本発明の方法の一実施形態では、UNQ733のレベルは、試験試料中のUNQ733 RNAのレベルに基づいて決定する。本発明の方法の一実施形態では、UNQ733のレベルは、試験試料中のUNQ733ポリペプチドのレベルに基づいて決定する。本発明の方法の一実施形態では、UNQ733のレベルは、試験試料中のUNQ733のレベルタンパク質活性に基づいて決定する。一部の実施形態では、本方法は、UNQ733ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子に試料を曝すこと、及び試料中におけるUNQ733ポリペプチドに対する抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の結合を決定することを含む。本発明の方法に用いられる抗体、UNQ733結合オリゴペプチド、又はUNQ733結合無機小分子又は有機小分子は、場合によっては、検出可能に標識する、固体支持体に取り付ける等してもよい。

10

20

30

40

50

【0008】

一態様において、本発明は、非ホジキンリンパ腫の治療用の生物活性剤のスクリーニング方法であって、候補剤を、プロモーターに作用可能にリンクしたUNQ733をコードする、統合した導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック哺乳動物と混合することにより前記導入遺伝子によって前記哺乳動物を非ホジキンリンパ腫に罹患させ、前記哺乳動物の非ホジキンリンパ腫に対する前記薬剤の影響を決定する方法を提供する。また別の態様では、本発明は、非ホジキンリンパ腫の治療用の生物活性剤のスクリーニング方法であって、候補剤を、トランスジェニック哺乳動物細胞の培養物と混合し、前記培養物の各細胞が、プロモーターに作用可能にリンクするUNQ733をコードする統合した導入遺伝子を含むことにより、前記導入遺伝子により前記哺乳動物を非ホジキンリンパ腫に罹患させ、トランスジェニック哺乳動物の細胞培養物に対する前記候補剤の影響を決定する方法を提供する。これら方法の一実施形態では、候補剤は、抗体、又は抗体断片、オリゴペプチド、或いは無機小分子又は有機小分子である。

本発明のまた別の態様は、UNQ733を発現する非ホジキンリンパ腫細胞及び/又はUNQ733に応答する非ホジキンリンパ腫細胞に、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子を結合させる方法であって、UNQ733ポリペプチドへの抗体、オリゴペプチド、或いは無機小分子又は有機小分子の結合に適した条件下において、前記細胞に前記抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子を接触させ、それを結合させる方法を目的としている。一実施形態では、細胞上のUNQ733に対する前記抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子の結合は、UNQ733の生物学的機能を阻害した。一実施形態では、前記抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子は、細胞への結合について、UNQ733と競合しない。一実施形態では、前記抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子は、細胞に対するUNQ733の結合を阻害しない。一実施形態では、前記抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子は、細胞に結合したUNQ733に結合し、遊離（結合していない）UNQ733の細胞への結合を阻害する。一実施形態では、UNQ733結合分子は抗体である。一実施形態では、抗体は、3E7 . 9 . 20 (ATCC 寄託番号PTA - 6026)、3F10 . 11 . 2 (ATCC 寄託番号PTA - 6027)、3H1 . 4 . 8 (ATCC 寄託番号PTA - 6028)、4A9 . 12 . 12 (ATCC 寄託番号PTA - 6029)、5A8 . 11 . 6 (ATCC 寄託番号PTA - 6030)、5F2 . 6 . 14 (ATCC 寄託番号PTA - 6031)、9D6 . 11 . 15 (ATCC 寄託番号PTA - 6032)、10G10 . 15 . 16 (ATCC 寄託番号PTA - 6033)又は12H4 . 11 . 3 (ATCC 寄託番号PTA - 6034)と命名される。一実施形態では、抗体は、3E7 . 9 . 20 (ATCC 寄託番号PTA - 6026)、3F10 . 11 . 2 (ATCC 寄託番号PTA - 6027)、3H1 . 4 . 8 (ATCC 寄託番号PTA - 6028)、4A9 . 12 . 12 (ATCC 寄託番号PTA - 6029)、5A8 . 11 . 6 (ATCC 寄託番号PTA - 6030)、5F2 . 6 . 14 (ATCC 寄託番号PTA - 6031)、9D6 . 11 . 15 (ATCC 寄託番号

PTA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA - 6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA - 6034)と命名される抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は、UNQ733への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA - 6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA - 6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA - 6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA - 6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA - 6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA - 6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA - 6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA - 6034)と命名される抗体と競合する(例えば、UNQ733が無細胞環境に位置する場合、インピボ又はインピトロにおける分泌細胞であるか、或いは細胞に結合する(インピボ又はインピトロ))。

10

【0009】

一態様において、本発明は、宿主中の非ホジキンリンパ腫を治療剤の標的とする方法であって、宿主に対し、UNQ733に結合する分子にリンクする形態の前記治療剤を投与することにより、宿主のリンパ腫を薬剤の標的とする方法を提供する。UNQ733に結合する分子は、インピボでUNQ733タンパク質に特異的に結合できるあらゆる分子とすることができ、例えば抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子とすることができる。一実施形態では、UNQ733に結合する分子は、例えば、UNQ733が非ホジキンリンパ腫細胞の表面に結合している場合、細胞上に位置するUNQ733に特異的に結合できる分子(インピトロ又はインピボ)である。一実施形態では、分子は抗体である。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA - 6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA - 6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA - 6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA - 6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA - 6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA - 6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA - 6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA - 6034)と命名される。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA - 6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA - 6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA - 6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA - 6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA - 6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA - 6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA - 6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA - 6034)と命名された抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は、UNQ733への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA - 6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA - 6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA - 6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA - 6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA - 6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA - 6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA - 6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA - 6034)と命名された抗体と競合する(例えば、UNQ733が無細胞環境に位置する場合、インピボ又はインピトロの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している(インピトロ又はインピボ))。一実施形態では、治療剤は、多特異性(例えば二重特異性)抗体の形態でUNQ733に結合する分子にリンクさせる。

20

30

40

本発明の他の実施形態は、非ホジキンリンパ腫の治療的処置に有用な薬物の調製における(a)UNQ733ポリペプチド(プロタンパク質転換酵素によるプロセッシングを受けている又は受けていない、単独で又は組合せて)、(b)プロセッシングを受けている又は受けていないUNQ733ポリペプチドをコードする核酸又はその核酸を含むベクター又

50

は宿主細胞、(c)抗UNQ733ポリペプチド抗体、(d)UNQ733結合オリゴペプチド、(e)UNQ733結合無機小分子又は有機小分子、又は(f)UNQ733タンパク質を切断するインビボ酵素のインヒビター(プロタンパク質転換酵素)の使用法を目的とする。

【0010】

一態様では、本発明は、本明細書に開示する本発明の方法において有用なUNQ733結合分子を提供する。例えば、UNQ733結合分子は、UNQ733に結合してUNQ733がそのレセプターに結合することを阻害する分子(抗体等)とすることができる。別の実施例においては、UNQ733結合分子は、細胞に結合しているUNQ733に結合する分子(抗体等)とすることができる。一実施形態では、結合分子は、細胞に結合しているが、UNQ733が細胞に結合することを阻害しないUNQ733に結合する。また別の実施例では、UNQ733結合分子は、前記UNQ733が細胞に結合している場合にのみ、UNQ733に結合する分子(抗体など)とすることができる。一実施形態では、結合分子は、第一のUNQ733ポリペプチドが細胞に結合しているが、第二のUNQ733ポリペプチドが細胞に結合することを阻害しない場合にのみ、第一のUNQ733ポリペプチドに結合する。一部の実施形態では、本発明のUNQ733結合分子を、治療剤(例えば、本明細書において後述で詳細に説明するような毒素等)に抱合させると有利である。一態様では、本発明は、UNQ733アンタゴニストを含む組成物であって、非ホジキンリンパ腫を有する被験者への投与に適した組成物を提供する。一実施形態では、本組成物は治療的に有効な量のUNQ733アンタゴニストを含有する。一実施形態では、本組成物は担体を更に含み、この担体は一部の実施形態では製薬的に許容可能な担体である。一実施形態では、UNQ733アンタゴニストは抗体である。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名される。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は、UNQ733(例えば、UNQ733が無細胞環境にある場合、インビボ又はインビトロの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している(インビトロ又はインビボ))への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と競合する。

【0011】

また別の態様において、本発明は、容器及び容器に収容された組成物を供える製造品であって、組成物が本明細書に記載のUNQ733アンタゴニストを含む製造品を提供する。本製造品は、場合によっては、非ホジキンリンパ腫の治療的処置のための組成物の使用法に言及した、容器に貼付されたラベル、及び/又は容器内に含まれるパッケージ挿入物

10

20

30

40

50

を更に含んでもよい。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載のUNQ733アンタゴニストを含む組成物を備えたキットであって、場合によっては、非ホジキンリンパ腫の治療のための組成物の使用方法に関する指示書を含むキットを提供する。

【0012】

一態様において、本発明は、UNQ733ポリペプチド結合分子を含む組成物であって、非ホジキンリンパ腫を有すると思われる個体由来の試験試料中のUNQ733ポリペプチドの検出に適した組成物を提供する。一実施形態では、結合分子は、抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である。一実施形態では、結合分子は、ウェスタンプロット、免疫沈降及び/又は免疫染色等の検出アッセイにおいてUNQ733に対する結合能を有する抗体である。一実施形態では、分子は抗体である。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名されたものである。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は、UNQ733(例えば、UNQ733が無細胞環境にある場合、インビボ又はインビトロの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している(インビトロ又はインビボ))への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と競合する。一実施形態では、本組成物は更に担体を含む。

【0013】

また別の態様において、本発明は、容器及び容器に収容された組成物を備えた製造品であって、組成物がUNQ733ポリペプチド結合分子を含み、非ホジキンリンパ腫を有すると思われる個体由来の試験試料中のUNQ733ポリペプチドを検出するのに適している製造品を提供する。場合によっては、本製造品は、非ホジキンリンパ腫を検出するための組成物の使用方法に言及した、容器に貼付されるラベル、及び/又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を更に含んでもよい。一実施形態では、本発明は、UNQ733ポリペプチド結合分子を含む組成物を備えたキットであって、場合によっては、非ホジキンリンパ腫の検出のための本組成物の使用方法に関する指示書をさらに備えたキットを提供する。一実施形態では、結合分子は、ウェスタンプロット、免疫沈降及び/又は免疫染色等の検出アッセイにおいてUNQ733に対する結合能を有する抗体である。一実施形態では、分子は抗体である。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号P

10

20

30

40

50

TA - 6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名される。一実施形態では、抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は、UNQ733(例えば、UNQ733が無細胞環境にある場合、インピボ又はインピトロの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している(インピトロ又はインピボ))への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と競合する。

10

【0014】

20

本明細書に記載するように、本発明の抗体は、本発明の方法に使用するのに適したあらゆる形態をとることができる。例えば、本発明の抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体とすることができる。一実施形態では、本発明の抗体は、本発明の抗体3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体のヒト化形態又はキメラ形態である。一実施形態では、本発明の抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と同じUNQ733上のエピトープに結合するヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。一実施形態では、本発明の抗体は、UNQ733(例えば、UNQ733が無細胞環境にある場合、インピボ又はインピトロの分泌タンパク質であるか、或いは細胞に結合している(インピトロ又はインピボ))への結合について、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)及び/又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体と競合するヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体である。一実施形態では、本発明の抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号P

30

40

50

TA - 6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体の高頻度可変領域、高頻度可変ループ及び/又は相補性決定領域(CDR)配列のうちの、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は全てを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、3E7.9.20(ATCC寄託番号PTA-6026)、3F10.11.2(ATCC寄託番号PTA-6027)、3H1.4.8(ATCC寄託番号PTA-6028)、4A9.12.12(ATCC寄託番号PTA-6029)、5A8.11.6(ATCC寄託番号PTA-6030)、5F2.6.14(ATCC寄託番号PTA-6031)、9D6.11.15(ATCC寄託番号PTA-6032)、10G10.15.16(ATCC寄託番号PTA-6033)又は12H4.11.3(ATCC寄託番号PTA-6034)と命名された抗体の可変領域の一方又は両方、或いはその一部を含む。

10

【0015】

一部の実施形態では、本発明の方法及び組成物は、(特に断らない限り)B細胞リンパ腫、広汎性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、(特に断らない限り)悪性リンパ腫、悪性T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫又は粘膜内リンパ組織リンパ腫である非ホジキンリンパ腫を目的とする。

当業者には、本明細書を一読することにより、本発明の更に別の実施形態が明らかであろう。

20

【0016】

本発明の実施モード

I. 定義

ここで使用される「UNQ733ポリペプチド」及び「UNQ733タンパク質」という用語は、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片(ここでさらに定義される)を包含する。ここに記載されているUNQ733ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「UNQ733ポリペプチド」及び「UNQ733タンパク質」という用語は、また、ここに記載のUNQ733ポリペプチドの変異体を含む。

30

「天然配列UNQ733ポリペプチド」には、天然由来のUNQ733ポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。一実施形態では、天然配列UNQ733ポリペプチドは、配列番号2(図18参照)のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、天然配列UNQ733ポリペプチドは、シグナルペプチドを欠くアミノ酸配列を含む。一実施形態では、天然配列UNQ733ポリペプチドは、配列番号3(図18参照)のアミノ酸配列を含む。また別の実施形態では、天然配列UNQ733ポリペプチドは、プロタンパク質転換酵素による配列番号2の配列の酵素的切断の結果得られるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、天然配列UNQ733ポリペプチドは、配列番号4(図18参照)のアミノ酸配列を含む。このような天然配列UNQ733ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。

40

「天然配列UNQ733ポリペプチド」という用語には、特に、特定のUNQ733ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。天然配列UNQ733はまた、Marshall等、J. Immunol. (2002), 169:2381-2389; PCT公開番号WO9931117; 及びPCT公開番号WO02/08288に報告されている。

【0017】

「UNQ733ポリペプチド変異体」とは、UNQ733ポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような天然配列UNQ733ポリペプチド配列のいずれかと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なUNQ733ポリペ

50

チドを意味する。このようなUNQ733ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN末端又はC末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたUNQ733ポリペプチドが含まれる。通常、UNQ733ポリペプチド変異体は、ここに開示する天然配列UNQ733ポリペプチド配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常、UNQ733変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、UNQ733変異体ポリペプチドは、天然UNQ733ポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然UNQ733ポリペプチド配列に比較して2、3、4、5、6、7、8、9、又は10以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

ここで同定したUNQ733ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のUNQ733ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0018】

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

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アライメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアライメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なる

と認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「UNQ733」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「UNQ733」は対象の仮想UNQ733ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「UNQ733」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。

「UNQ733変異体ポリヌクレオチド」又は「UNQ733変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、UNQ733ポリペプチド、好ましくは活性UNQ733ポリペプチドをコードし、ここに開示する天然配列UNQ733ポリペプチド配列をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、UNQ733変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する天然配列UNQ733ポリペプチド配列をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0019】

通常、UNQ733変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、1-73、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

ここに開示されるUNQ733核酸配列(天然配列UNQ733ポリペプチド、例えば図17の配列番号1の核酸配列をコードする)に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のUNQ733核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレ

10

20

30

40

50

ーディングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0020】

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

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、「UNQ733 DNA」が対象となる仮想的UNQ733核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「UNQ733 DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮想ヌクレオチドを表して、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「UNQ733 DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

他の実施形態では、UNQ733変異体ポリヌクレオチドとは、UNQ733ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに記載のUNQ733ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションすることができる。UNQ733変異体ポリペプチドは、UNQ733変異体ポリヌクレオチドによってコードされているものであり得る。

【0021】

「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び/又は回収された分子/化合物（ポリペプチド等）を意味する。その自然環境の汚染成分とは、その分子/化合物（ポリペプチド等）の治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。一部の実施形態では、ポリペプチド又はオリゴペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも10-15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)例えばクーマシーブルー又は銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下で、ゲル電気泳動、例えばSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、UNQ733ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

「単離された」ポリペプチドは、ポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から同定され、分離されたポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸分子である。単離されたポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞中に存在する特異的なポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸分子とは区別される。しかし、ポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置又は染色体外の位置にある、ポリペプチド又はオリゴペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチド又はオリゴペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

【0022】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール

配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

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

【0023】

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

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温を用いる、例えば、50 で、0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42 で、50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウム；又は(3)42 で、50%ホルムアミド、5×SSC (0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液中で終夜ハイブリダイゼーション、42 で、0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中にて10分間の洗浄、ついで55 で、EDTAを含む0.1×SSCからなる10分間高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

【0024】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば、温度、イオン強度及び% SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェント条件の一例は、20%ホルムアミド、5×SSC (150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20 mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37 での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中にて約37 - 50 でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じ

10

20

30

40

50

て、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

「エプトータグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したUNQ733ポリペプチド又は抗UNQ733抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエプトータグを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエプトータグと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～50のアミノ酸残基(好ましくは、約10～20の残基)を有する。タグポリペプチドの例には、ポリヒスチジン及びヒトの胎盤アルカリホスファターゼ等の検出可能なマーカーが含まれる。

10

【0025】

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるUNQ733ポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するUNQ733ポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生UNQ733ポリペプチドが保持する抗原性エプトータグに対する抗体の生成を誘発する能力以外の、天然又は天然発生UNQ733ポリペプチドによって引き起こされる生物機能(阻害又は刺激)を意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生UNQ733ポリペプチドが保持する抗原性エプトータグに対する抗体の生成を誘発する能力を意味する。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然UNQ733ポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全にブロック、阻害、又は中和する任意の分子が含まれる。適切なアンタゴニスト分子には、特にアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然UNQ733ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子又は無機小分子等が含まれる。UNQ733ポリペプチドのアンタゴニストを同定する方法は、UNQ733ポリペプチドと候補アンタゴニスト分子を接触させ、そして通常はUNQ733ポリペプチドに関連している一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することが含まれ得る。

20

【0026】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え(小さく)させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従ってUNQ733アンタゴニストの治療量を投与された後に、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び/又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被験体又は哺乳動物は、非ホジキンリンパ種に関して成功裏に「治療された」ことになる: 癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失; 腫瘍の大きさの減少; 軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害(すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止); 腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止); 腫瘍成長のある程度の阻害; 及び/又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の緩和; 疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。UNQ733アンタゴニストが生存癌細胞の成長を防ぐ及び/又は死滅させることができる範囲において、それは細胞増殖抑制及び/又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができ

30

40

。疾患における成功裏の治療及び改善を評価することに関する上記のパラメーターは、医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。癌治療では、有効性は、例えば、病気の進行までの時間(TTP)の算定及び/又は反応速度(RR)を確かめることによって測定できる。転移は、ステージング試験によって、骨のスキャン及び骨への広がりを確かめるためのカルシウムレベル及び他の酵素に関する試験によって確かめることができる。CTスキャンは、また、領域の骨盤及びリンパ節への広がりを探索することで行うことができる。胸のX線、及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を、それぞれ肺及び肝臓への転移を探索するために用いる。疾患をモニタリングする他

50

の常套的方法には、経直腸的超音波断層法（TRUS）及び経直腸的針生検（TRNB）が含まれる。

【0027】

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

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

【0028】

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

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

【0029】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機又は無機小分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施形態では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティークロマトグラフィークラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4275149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばUNQ733ポリペプチド、それらに対する抗体又はUNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

【0030】

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

ここに開示するUNQ733アンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【0031】

「治療的有效量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的なUNQ733アンタゴニストの量を指す。癌の場合、アンタゴニストの治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある

10

20

30

40

50

程度まで減速及び好ましくは停止)し;腫瘍成長をある程度まで阻害し;及び/又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。アンタゴニストが存在する癌細胞の成長を妨げ及び/又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び/又は細胞障害性であり得る。

UNQ733アンタゴニストの「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのUNQ733アンタゴニストの「成長阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【0032】

UNQ733アンタゴニストの「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのUNQ733アンタゴニストの「細胞障害性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗UNQ733ポリペプチドモノクローナル抗体(アンタゴニスト、結合及び/又は中和抗体を含む)、多エピトープ(polyepitopic)特異性を持つ抗UNQ733ポリペプチド抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗UNQ733ポリペプチド抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗UNQ733ポリペプチド抗体の断片(下記を参照)を包含する。「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

【0033】

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

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、 μ 及びアイソタイプに対しては4つの C_H ドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 V_L と V_H は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

【0034】

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。Ig A、Ig D、Ig E、Ig G及びIg Mという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び λ と呼ばれる重鎖を有する。さらに γ 及び μ のクラスは、C_H配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1及びIg A 2が発現する。

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

【0035】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、V_Lにおいては、およそ残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及びV_Hにおいては、およそ1-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3);Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、V_Lにおいては、およそ残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)、及びV_Hにおいては、およそ26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3);Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0036】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又

は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物学的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0037】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、及びFv断片;ダイアボディ(diabodies);直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2;Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな $(Fab')_2$ 断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。 $(Fab')_2$ 抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0038】

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

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

【0039】

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

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるよ

10

20

30

40

50

うに、 V_H と V_L ドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体の V_H 及び V_L ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号;国際公開93/11161号;及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0040】

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

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

【0041】

「UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド」はここで記載される様なUNQ733ポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、1-73、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドは、ここに記載される様なUNQ733ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、

同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，81:3998-4002 (1984)；Geysen等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，82:178-182 (1985)；Geysen等，in Synthetic Peptides as Antigens，130-149 (1986)；Geysen等，J. Immunol. Meth.，102:259-274 (1987)；Schoofs等，J. Immunol.，140:611-616 (1988)，Cwiria,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol.，222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol.，2:668参照)。

「UNQ733ポリペプチド結合有機又は無機小分子」とは、ここに記載されるようなUNQ733ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機又は無機小分子である。小分子UNQ733アンタゴニストは好ましくは有機小分子である。UNQ733ポリペプチド結合有機分子は既知の方法(例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照)を用いて同定され、化学的に合成されうる。UNQ733ポリペプチド結合有機小分子は通常、約2000ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なUNQ733ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機小分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機小分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照)。

【0042】

対象の抗原、例えばUNQ733ポリペプチドと「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施形態では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器(FACS)分析又は放射免疫沈降(RIA)によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子の結合の約10%よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合にとって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、あるいはそれ以上のKdを持つ分子によって示されうる。一実施形態では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

「UNQ733ポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプ

チド又は他の有機又は無機小分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子は、UNQ733ポリペプチドを発現又は過剰発現する非ホジキンリンパ腫細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。UNQ733ポリペプチドは、細胞の表面上に結合しているか、細胞外の環境に存在し得る。好ましい成長阻害抗UNQ733ポリペプチド抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機又は無機小分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、約20%より多く、好ましくは約20%から約50%、好ましくは50%よりも多く(例えば、約50%から約100%)でUNQ733ポリペプチド発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施形態では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は約0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約100 mg/kg 体重の抗UNQ733ポリペプチド抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

10

【0043】

「アポトーシスを誘発する」UNQ733アンタゴニストは、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)等により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、UNQ733ポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は非ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(PS)転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核/クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発するUNQ733アンタゴニストは、未処理細胞の約2~50倍、好ましくは約5~50倍、最も好ましくは約10~50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである。

20

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

30

【0044】

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

40

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載す

50

るものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIレセプターには、FcRIIA(「活性型レセプター」)及びFcRIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRn(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994))も含まれる。

10

【0045】

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

20

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

【0046】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には、調節されない細胞数の増大(通常細胞成長と呼ばれる)を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。細胞数の増大は、細胞増殖の異常な増大、細胞死の異常な減少、或いは細胞増殖と細胞死の量のアンバランスに起因し得る。癌の例には、これらに限定されるものではないが、造血性癌又は血液関係の癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫又はリンパ様悪性腫瘍、並びに、脾臓の癌及びリンパ節の癌が含まれる。

30

本明細書で使用する「非ホジキンリンパ腫」又は「NHL」という用語は、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系癌を意味する。通常、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫には前記細胞が不在であることにより区別することができる。本明細書で使用する用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例は、従来技術に既知の分類方式、例えばColor Atlas of Clinical Hematology第3版; A. Victor Hoffbrand及びJohn E. Pettit(編)(Harcourt Publishers Limited 2000)(特に図11.57、11.58及び/又は11.59参照)に記載の改訂版Euro-pean-American Lymphoma (REAL)方式に従って当業者(腫瘍学者または病理学者)によって認識されるあらゆるものを含む。具体的な例としては、限定するものではないが、再発性又は抵抗性NHL、前線低悪性度NHL、第III/IV期NHL、化学療法に抵抗性のNHL、前駆体Bリンパ芽球性白血病及び/又はリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病及び/又は前リンパ球性白血病及び/又は小リンパ球リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、immunocytoma及び/又はリンパ形質細胞性リンパ腫、周辺帯B細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯-MALTリンパ腫、結節周辺帯リンパ

40

50

腫、有毛細胞白血病、プラズマ細胞腫及び／又は形質細胞骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性NHL、衛星細胞リンパ腫、follicle centerリンパ腫（濾胞性）、中悪性度拡散性NHL、広汎性大B細胞リンパ腫、高悪性度NHL（高悪性度前線NHL及び高悪性度再発性NHLを含む）、自己幹細胞移植後の又は自己肝細胞移植に抵抗性のNHL再発、一次縦隔大B細胞リンパ腫、一次浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度非切断小細胞性NHL、巨大病変NHL、パーキットリンパ腫、前駆体（周辺性）T細胞リンパ芽球性白血病及び／又はリンパ腫、成人T細胞リンパ腫及び／又は白血病、T細胞慢性リンパ球性白血病及び／又は前リンパ球性白血病、大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／又はセザリー症候群、結節外ナチュラルキラー／T細胞（鼻腔型）リンパ腫、超疾患型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、皮下脂肪組織炎様T細胞リンパ腫、皮膚（皮膚性）リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管動原体リンパ腫、腸T細胞リンパ腫、末梢T細胞（特に断らない限り）リンパ腫及び血管免疫芽細胞性T細胞リンパ腫が挙げられる。

10

【0047】

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

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。本明細書で使用する「癌」、「癌性」、「細胞増殖障害」、「増殖障害」及び「腫瘍」という用語は、互いに排他的なものではない。

20

【0048】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機小分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、UNQ733ポリペプチドを発現するものであり、UNQ733ポリペプチドを特異的に発現するか又は過剰発現する種類の細胞である。この細胞は、特定の細胞種類の癌性細胞又は正常細胞とすることができる。UNQ733ポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。その細胞は癌細胞、例えば、B細胞又はT細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害（ADCC）又は補体依存性障害（CDC）によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清（すなわち、補体の無い）を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機小分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロビジウム（PI）、トリパンブルー（Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995)）又は7AADの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機小分子は、BT474細胞でのPI取り込みアッセイで、PI取り込みを誘導するものである。

30

「UNQ733ポリペプチド発現細胞」は、例えば分泌形態で内因性又は形質移入されたUNQ733ポリペプチドを発現する。UNQ733ポリペプチドの発現は、検出又は予後アッセイにおいて、細胞の表面内及び／又は上に存在する、及び／又は細胞により分泌されるUNQ733タンパク質のレベルを評価することによって定量されうる（例えば、UNQ733ポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えDNA技術を用いて調製することができる単離されたUNQ733ポリペプチドに対して調製した抗UNQ733ポリペプチド抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；FACS分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、UNQ733ポリペプチドコード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（FISH；1998年10月公開の国際公開98/45479を参照せよ）、サザンブロットティング、ノーザンブロットティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、例えばリアルタイム定量PCR（RT-PCR）を介して、細胞のUNQ733ポリペプチドコード化核酸又はmRNAのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッ

40

50

セイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、UNQ733ポリペプチドの発現を研究してもよい(同じく、例えば、1990年6月12日に発行の米国特許第4933294号; 1991年4月18日に公開の国際公開91/05264; 1995年3月28日に発行の米国特許第5401638号; Sias等, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ)。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

10

【0049】

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

20

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

【0050】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド(ピンクリスチン、ピンプラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルピシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

30

【0051】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤; プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類; ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類; アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類; アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン); 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)); ラパチョーネ; ラパコール; コルヒチン; ベツリン酸; カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCMTIN(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、スコボ

40

50

レクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む); プリオスタチン; カリ
 スタチン; C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナロ
 グを含む); ポドフィロトキシシン; ポドフィリン酸(podophyllinic acid); テニボシド;
 クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8); ドラスタチン;
 ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む); エロイ
 テロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン; スポンギスタチン; クロランブシル、
 クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラ
 ムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド
 、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレド
 ニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード 10
 などのナイトロジェンマスタード; カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フ
 オテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレ
 アス(nitrosureas); 抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(c
 alicheamicin)、特にカリケアマイシン 1 I 及びカリケアマイシン I 1 (例えばAgnew
 Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照); ダイネマイシン(dynemicin) A を含む
 ダイネマイシン; エスペラマイシン; 並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色
 素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アク
 チノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチ
 ノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィ
 リン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトル
 ビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ド
 キソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロ
 リノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン
 、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイト
 マイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オ
 リボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピ
 ユーロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプト
 ニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン
 (zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin); 代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フ
 ルオロウラシル(5-FU); 葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレ
 キセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate); プリン
 アナログ、例えばフルダラピン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チ
 オグアニン; ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、
 6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキ
 シフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine); アンドロ
 ゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオ
 スタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone); 抗副腎剤、例えばアミノ
 グルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えば
 フロリン酸(frolinic acid); アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレ
 プリン酸; エニルウラシル; アムサクリン(amsacrine); ベストラブシル(bestrabucil);
 40
 ビサントレン(bisantrene); エダトラキセート(edatraxate); デフォファミン(defofamin
 e); デメコルシン(demecolcine); ジアジコン(diaziquone); エルフォルニチン(elfornit
 hine); 酢酸エリプチニウム(elliptinium); エポチロン(epothilone); エトグルシド(eto
 glucid); 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダミン(lonidamine); メイ
 タンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(a
 nsamitocine); ミトグアゾン(mitoguazone); ミトキサントロン; モピダモール(mopidamo
 l); ニトラクリン(nitracrine); ペントスタチン; フェナメット(phenamet); ピラルピシ
 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; P S K (登録商標)多糖
 複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR); ラゾキサン(razoxane); リゾキシシン; シ
 ゾフィラン; スピロゲルマニウム(spirogermanium); テニューアゾン酸(tenuazonic acid) 50

; トリアジコン(triaziquone); 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine)); ウレタン; ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標)); ダカーバジン; マンノムスチン(mannomustine); ミトブロニトール; ミトラクトール(mitolactol); ピボプロマン(pipobroman); ガシトシン(gacytosine); アラビノシド(「A r a - C」); チオテパ; タキソイド類、例えばT A X O L(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、A B R A X A N ETMパクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びT A X O T E R E(登録商標)ドキシタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル; ゲムシタピン(gemcitabine) 10
 (G E M Z A R(登録商標)); 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン; ビンブラスチン(VELBAN(登録商標)); プラチナ; エトポシド(V P - 1 6); イホスファミド; マイトキサントロン; ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標)); オキサリプラチン; ロイコボピン(leucovovin); ビノレルピン(N A V E L B I N E(登録商標)); ノバントロン(novantrone); エダトレキサート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロナート(ibandronate); トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2 0 0 0; ジフルオロメチロールニチン(D M F O); レチノイン酸のようなレチノイド; カペシタピン(capecitabine)(XELODA(登録商標)); 上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体; 並びに上記のうち 20
 2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるC H O P、及び5-FU及びロイコボピン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATINTM)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節物質(S E R M)を含み、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(raloxifene)、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びF A R E S T O N(登録商標)トレミフェン; 抗プロゲステロン; エストロゲンレセプター 30
 下方調節剤(ERD); 卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、例えばLUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)酢酸ロイプロリド等の黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(tripterelin); その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド; 並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害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、M E G A S E(登録商標)酢酸メゲストロール、A R O M A S I N(登録商標)エキセメスタン、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール、R I V I S O R(登録商標)ボロゾール、F E M A R A(登録商標)レトロゾール、及びA R I M I D E X(登録商標)アナストロゾールである。 40
 加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロネ酸、NE-58095、ZOMETA(登録商標)ゾレドロネ酸/ゾレドロネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロネート、ARE DIA(登録商標)パミドロネ酸、SKELID(登録商標)チルドロネ酸、又はACTONEL(登録商標)リセドロネ酸、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体); アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C - 、R a f、及びH - R a s、及び上皮成長因子レセプター(EGF-R); THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばA L L O V E C T I N(登録商標)ワクチン、L E U V E C T I N(登録商標)ワクチン、及びV A X I D(登録商標)ワクチン; 50

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(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0052】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、UNQ733ポリペプチドを発現する非ホジキンリンパ腫細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期でUNQ733発現細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化する。

「ドキソルピシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルピ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-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0053】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエーターとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン; 副甲状腺ホルモン; チロキシン; インシュリン; プロインシュリン; レラクシン; プロレラクシン; 糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体化ホルモン(LH); 肝臓成長因子; 線維芽成長因子; プロラクチン; 胎盤ラクトゲン; 腫瘍壊死因子-及び-; ミューラー阻害因子; マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド; インヒビン; アクチビン; 血管内皮成長因子; インテグリン; トロンボポエチン(TPO); NGF-等の神経成長因子; 血小板成長因子; TGF-及びTGF-等のトランスフォーミング成長因子(TGFs); インシュリン様成長因子-I及びII; エリスロポエチン(EPO); 骨誘発因子; インターフェロン-、-、及び-等のインターフェロン; コロニー刺激因子(CSFs)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF); 顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF); 及び顆粒球-CSF(G-CSF); インターロイキン(ILs)、例えばIL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12; 腫瘍壊死因子、例えばTNF-及びTNF-; 及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び/又は

その治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【 0 0 5 4 】

表 1

```

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

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

```

表 1 (続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */
#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINS0       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

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

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

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

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

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

```

表 1 (続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"
static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};
static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};
main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

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

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

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

```

表 1 (続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;     /* keep track of delx */
    int       *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;           /* score for each type */
    int       ins0, ins1;     /* insertion penalties */
    register  id;           /* diagonal index */
    register  ij;           /* jmp index */
    register  *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;       /* index into seqs */
    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

表 1 (続き)

```

...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];
  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

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

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */
  id = xx - yy + len1 - 1;
  if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
}
...nw

```

表 1 (続き)

```

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

tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}

(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);

(void) free((char *)col1);
}

```

表 1 (続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
#include "nw.h"
#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */
extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

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

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

```

表 1 (続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char   outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }
    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表 1 (続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
        * do we have more of this sequence?
        */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
            * are we at next gap for this seq?
            */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                * we need to merge all gaps
                * at this location
                */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

40

dumpblock

表 1 (続き)

```

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

...putline
int          i;
register char *px;

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

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

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

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

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '!';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '!';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

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

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

stripname

10

表 1 (続き)

```

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

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jmps */
FILE *fj;
int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                cleanup
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */

    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

表 1 (続き)

```

...getseq
py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}
/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

表 1 (続き)

```

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

```

表 1 (続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int ix;
    char *mktemp();
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

【 0 0 5 5 】

表 2

UNQ733 ポリペプチド	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	
	(長さ = 15 アミノ酸)	30
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	
	(長さ = 12 アミノ酸)	
<p>% アミノ酸配列同一性 =</p> <p>(ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)</p> <p>÷ (UNQ733 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) = 5 ÷ 15 = 33.3%</p>		
		40

表 3

UNQ733 ポリペプチド

XXXXXXXXXX

(長さ = 10 アミノ酸)

比較タンパク質

XXXXXXYYYYYYZZYZ

(長さ = 15 アミノ酸)

10

% アミノ酸配列同一性 = (ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷ (UNQ733 ポリペプチドの全アミノ酸残基の数) = 5 ÷ 10 = 50%

表 4

UNQ733 DNA

NNNNNNNNNNNNNNN

(長さ = 14 nucleotides)

20

比較 DNA

NNNNNNLLLLLLLLLLL

(長さ = 16 nucleotides)

% 核酸配列同一性 = (ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数) ÷ (UNQ733 ポリペプチド DNA 配列の全ヌクレオチドの数) = 6 ÷ 14 = 42.9%

30

表 5

UNQ733 DNA

NNNNNNNNNNNNNN

(長さ = 12 nucleotides)

比較 DNA

NNNNLLLLVV

(長さ = 9 nucleotides)

% 核酸配列同一性 = (ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数) ÷ (UNQ733 ポリペプチド DNA 配列の全ヌクレオチドの数) = 4 ÷ 12 = 33.3%

40

【 0 0 5 6 】

I I . 本発明の組成物及び方法

A . 抗 U N Q 7 3 3 抗体

一実施形態では、本発明は、ここで治療及び / 又は診断薬としての用途が見出され得る抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

1 . ポリクローナル抗体

50

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原(特に、合成ペプチドが用いられる場合)を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒターへ、二重官能性又は誘導體形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、 SOCl_2 、又はR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=NRを用いて結合させることができる。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 μg 又は5 μg (それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導體に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0057】

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞(融合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0058】

好ましい融合のパートナーである骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生に

ついて検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

【0059】

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

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー(例えばプロテインA又はプロテインG-セファロースを用いる)又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

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

【0060】

更なる実施形態では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, *Nature*, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991)及びMarks等, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

抗体をコードするDNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(C_H及びC_L)の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4,816,567号;Morrison等, *Proc.Nat.Acad.Sci.,USA*, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0061】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-UNQ733抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

10

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者 [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

20

【0062】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びHAMMA反応(ヒト抗-マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと同様に最も近いヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体のために受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

30

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

40

50

【 0 0 6 3 】

ヒト化抗UNQ733ポリペプチド抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤(類)と結合していてもよい抗体断片、例えばFabであつてもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷IgG1抗体であつてもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Ruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm)); 同5545807号; 及び国際公開第97/17852号を参照されたい。

【 0 0 6 4 】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

【 0 0 6 5 】

4. 抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも、抗体断片を用いることに利点がある。より小さな大きさの断片によって迅速なクリアランスが可能となり、固形腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂断片

を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、 $F(a b')$ ₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含む $F a b$ 及び $F(a b')$ ₂が、米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施形態では、選択する抗体は単鎖 $F v$ 断片($s c F v$)である。国際公開93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。 $F v$ 及び $s F v$ は、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。 $s F v$ 融合タンパク質は、 $s F v$ のアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

10

20

30

40

50

【0066】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、本明細書に記載のUNQ733ポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のポリペプチドに対する結合部位とUNQ733ポリペプチド結合部位とが結合しうる。あるいは、抗UNQ733ポリペプチド抗体は、UNQ733ポリペプチドを発現する細胞及び/又はUNQ733ポリペプチドに結合する細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、 $F c R I(C D 6 4)$ 、 $F c R I I(C D 3 2)$ 及び $F c R I I I(C D 1 6)$ 等の $I g G(F c R)$ に対する $F c$ レセプター、又はT細胞レセプター分子(例えば $C D 3$)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はUNQ733ポリペプチドを発現する及び/又はUNQ733ポリペプチドに結合する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はUNQ733ポリペプチド結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えば $F(a b')$ ₂二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗- $E r b B 2$ /抗- $F c R I I I$ 抗体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗- $E r b B 2$ /抗- $F c R I$ 抗体が開示されている。二重特異性抗- $E r b B 2$ /抗- $F c R I I I$ 抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5821337号は、二重特異性抗- $E r b B 2$ /抗- $C D 3$ 抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTraunecker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0067】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ 領域を含む $I g$ 重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域($C_H 1$)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランス

フェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

この手法の好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 1 - 7:210 (1986)を参照されたい。

【0068】

米国特許第5731168号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

【0069】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再変換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

最近の進歩により、大腸菌からのF a b'-SH断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びEr b B2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0070】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体の F a b' 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより V_L に V_H を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

【0071】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びHIV感染の治療のために[国際公開第91/00360; 国際公開第92/200373; 欧州特許第03089号]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製できると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

20

【0072】

7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ を有し、ここで $VD1$ は第1の可変ドメインであり、 $VD2$ は第2の可変ドメインであり、 Fc はFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、 $X1$ 及び $X2$ はアミノ酸又はポリペプチドを表し、 n は0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は： $VH-CH1$ -柔軟なリンカー- $VH-CH1-Fc$ 領域鎖；又は $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2~約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

30

40

【0073】

8. エフェクター機能の加工

50

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性 (ADCC) 及び/又は補体依存細胞障害性 (CDC) を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で—又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性 (ADCC) を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0074】

9. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫コンジュゲート、又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に関する。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrgios及び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)、論理的に腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwinら., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pincheiraら. (ed.s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowlandら., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowlandら., (1986)、上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213; Liuら., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lodeら (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinmanら (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

【0075】

ゼバリン(ZEVALIN) (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン(ibrutumomab tiuxetan), Biogen/Idc) は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1モノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリ

ンカーキレート剤にて結合した抗体 - 放射性同位体コンジュゲートである(Wisemanら (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wisemanら (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼパリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhucD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。
 ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuc242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、CanAgを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第II相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタチン(MMAE)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体cBR96(癌細胞上のルイスYに特異的)及びcAC10(血液系悪性腫瘍上のCD30に特異的)(Doroninaら (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

10

20

30

40

50

【0076】

このような免疫コンジュゲート(免疫コンジュゲート)の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI, PAPII, 及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcicin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコセセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vittita等、Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MXDTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセセン(tricothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0077】

メイタンシン及びメイタンシノイド

一実施態様では、本発明の抗UNQ733ポリペプチド抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ*Maytenus serrata*から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導體及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。

10

【0078】

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

20

30

【0079】

抗UNQ733ポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)

抗UNQ733ポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗UNQ733ポリペプチド抗体を化学的に結合させることにより調製される。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール

40

50

類似体である。

例えば、米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号又は欧州特許第 0 4 2 5 2 3 5 B 1 号、及び Char i 等, *Cancer Research*, 52 : 127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【 0 0 8 0 】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダート H C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供される N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(S P P)及び N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)(Carlsson 等, *Biochem. J.* 173 : 723-737[1978])が含まれる。

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

【 0 0 8 1 】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖 D N A 破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第 5 7 1 2 3 7 4 号、同 5 7 1 4 5 8 6 号、同 5 7 3 9 1 1 6 号、同 5 7 6 7 2 8 5 号、同 5 7 7 0 7 0 1 号、同 5 7 7 0 7 1 0 号、同 5 7 7 3 0 0 1 号、同 5 8 7 7 2 9 6 号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N-アセチル- 1^I 、P S A G 及び 1^I (Hinman 等, *Cancer Research*, 53 : 3336-3342(1993)、Lode 等 *Cancer Research*, 58 : 2925-2928(1998)及び上述した American Cyanamid の米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬である Q F A である。カリケアマイシン及び Q F A は双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【 0 0 8 2 】

他の細胞障害剤

本発明の抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、B C N U、ストレプトゾイシン、ピンクリスチン及び 5-フルオロウラシル、米国特許第 5 0 5 3 3 9 4 号、同 5 7 7 0 7 1 0 号に記載されており、集合的に L L - E 3 3 2 8 8 複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第 5 8 7 7 2 9 6 号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合性

活性断片、外毒素 A 鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン(modeccin) A 鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(P A P I、P A P I I 及び P A P - S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcun)、クロチン、サパオナリア(*Saponaaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【0083】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗UNQ733抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0084】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, *Cancer Research*, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤:市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC

10

20

30

40

50

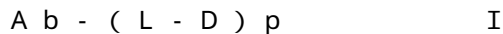
、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyI-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467 - 498頁を参照。

【0085】

抗体薬剤コンジュゲートの調製

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態および試薬を用いて調製されうる:(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応;及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。

10



抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む:(i)N末端アミノ基、(ii)側鎖アミノ基、例えばリシン、(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糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およびリンカー試薬により共有結合を形成することができる:(i)活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物;(ii)アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド;(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。

20

【0086】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基を用いて反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミノ基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

30

40

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む:反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリアルヒドラジド基:(i)活性エステル(例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物);(ii)アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド;(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基、が含まれる。

【0087】

別法として、抗UNQ733ポリペプチド抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク

50

質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0088】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗UNQ733ポリペプチド抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したりリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

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

【0089】

B. UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド

本発明のUNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドはここで記載される様なUNQ733ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、1-73、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なUNQ733ポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する(例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号; PCT公開第W

10

20

30

40

50

084/03506号、及びWO84/03564号; Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照)。

【0090】

この点において、バクテリオファージ(ファージ)ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である (Scott, J.K. 及び Smith G. P. (1990) Science 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体(又はランダムクローンcDNA)の大きなライブラリーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド (Cwirla, S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) 又はタンパク質 (Lowman, H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.等 (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) ライブラリーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている (Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、及び同第5663143号。

【0091】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム (WO95/34683; 米国特許第5627024号)、T4ファージディスプレイシステム (Ren等 Gene, 215:439 (1998); Zhu等 Cancer Research, 58(15):3209-3214 (1998); Jiang等, Infection & Immunity, 65(11):4770-4777 (1997); Ren等, Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5:1833 (1996); Efimov等, Virus Genes, 10:173 (1995) 及び T7ファージディスプレイシステム (Smith及びScott, Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993); 米国特許第5766905号) も知られている。

【0092】

現在、基礎的なファージディスプレイ構想の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラリーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり (WO98/14277) 及びファージディスプレイライブラリーは二分子相互作用 (WO98/20169; WO98/20159) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO98/20036) を分析及び制御するために使用されている。WO97/35196は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO97/46251は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを

単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) タンパク質 A の親和性タグとしての使用も報告されている (Li 等, (1998) Mol Biotech., 9:187)。WO 97/47314 は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法は WO 97/09446 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第 5498538 号、同第 5432018 号、及び WO 98/15833 に記載されている。

ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニングの方法は、米国特許第 5723286 号、同第 5432018 号、同第 5580717 号、同第 5427908 号、同第 5498530 号、同第 5770434 号、同第 5734018 号、同第 5698426 号、同第 5763192 号、及び同第 5723323 号に記載される。

【0093】

C. UNQ733 ポリペプチド結合有機小分子

UNQ733 ポリペプチド結合小分子とは、好ましくは、UNQ733 ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。UNQ733 ポリペプチド結合有機小分子は既知の方法 (例えば PCT 公開第 WO 00/00823 及び WO 00/39585 号参照) を用いて同定され、化学的に合成されうる。UNQ733 ポリペプチド結合有機小分子は通常、約 2000 ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約 1500、750、500、250 又は 200 ダルトンの大きさであり、ここに記載されるような UNQ733 ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機小分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機小分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する (例えば PCT 公開第 WO 00/00823 及び WO 00/39585 号参照)。UNQ733 ポリペプチド結合有機小分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N 置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【0094】

D. 所望の特性を有する抗 UNQ733 ポリペプチド抗体、UNQ733 ポリペプチド結合オリゴペプチド及び UNQ733 ポリペプチド結合有機小分子のスクリーニング

UNQ733 ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び小分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は他の小分子をさらに選択することができる。

本発明の抗 UNQ733 抗体、オリゴペプチド又は他の小分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又は UNQ733 ポリペプチド遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかで UNQ733 ポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及び UNQ733 ポリペプチド形質移入細胞は、数日間 (例えば、2 - 7)、種々の濃度の本発明の抗 UNQ733 ポリペプチドモノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の小分子で処理し、クリスタル・バイオレット又は MTT で染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方法は、本発明の抗 UNQ733 ポリペプチド抗体、UNQ733 ポリペプチド結合オリゴペプチド又は UNQ733 ポリペプチド結合小分子の存在又は非存在下で処理した細胞の ³H-チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、

10

20

30

40

50

DNAへ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。腫瘍細胞は、UNQ733ポリペプチドを過剰発現するものとして行うことができる。抗UNQ733ポリペプチド抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機小分子は、ある実施形態では約0.5から30µg/mlの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約25-100%、より好ましくは約30-100%、そしてさらにより好ましくは約50-100%又は70-100%のUNQ733ポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約0.5から30µg/ml又は0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後1-10日で確かめられる。約1µg/kgから約100mg/kg体重での抗UNQ733ポリペプチド抗体の投与が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月、好ましくは約5から30日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

10

20

30

40

50

【0095】

細胞死を誘発する抗UNQ733ポリペプチド抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機小分子を選択するために、例えばヨウ化プロビジウム(PI)、トリパンブルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。PI取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。UNQ733ポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗UNQ733ポリペプチド抗体(例えば約10µg/ml)、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機小分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために35mmのストレーナキャップ付き12x75チューブ(チューブ当たり1ml、処理グループ当り3チューブ)に等分する。次いで、チューブへPI(10µg/ml)を与える。サンプルをFACSCAN(登録商標)フローサイトメータとFACSCONVERT(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析してもよい。PI取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗UNQ733ポリペプチド抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機小分子は、細胞死誘発抗UNQ733ポリペプチド抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機小分子として選択することができる。

関心のある抗体が結合したUNQ733ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機小分子をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗UNQ733ポリペプチド抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機小分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、UNQ733ポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【0096】

E. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/01145を参照)を活性化酵素へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュ

ゲートすることによって、A D E P Tにおいて使用することができる。例えば国際公開 8 8 / 0 7 3 7 8 及び米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号を参照されたい。

A D E P T に有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性 5-フルオロシトシンを抗癌剤 5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシン B 及び L)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用な D-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリン V アミダーゼ又はペニシリン G アミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを変換させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗 U N Q 7 3 3 抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換え D N A 技術を使用して作成することができる(Neuberger 等, Nature 312:604-608[1984])。

【 0 0 9 7 】

F . 抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体変異体

ここに記載した抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体に加えて、抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体変異体も調製できると考えられる。抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体変異体は、コード化 D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することによって、及び/又は所望の抗体を合成することによって調製できる。当業者は、アミノ酸変化がグリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などの抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体の翻訳後プロセスを変え得るのを理解するであろう。

ここに記載した抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体の変異は、例えば、米国特許第 5 3 6 4 9 3 4 号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体の一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗 U N Q 7 3 3 ポリペプチド抗体の配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 1 から 5 のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を、親配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

10

20

30

40

50

【0098】

抗UNQ733ポリペプチド抗体及びUNQ733ポリペプチド断片がここで提供されている。そのような断片は、例えば完全長天然抗体又はタンパク質と比較した時に、N末端又はC末端で切断しているか、又は内部残基を欠いている可能性がある。ある断片は、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの所望される生物学的活性にとって必修ではないアミノ酸残基を欠く。

抗UNQ733抗体及びUNQ733ポリペプチド断片は、多くの従来技術のいずれかによって調製してもよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法には、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基で確定した部位でタンパク質を切断することが知られた酵素によってタンパク質を処理することで、又は適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによって抗体又はポリペプチド断片を生成することが含まれる。さらにその他の好適な技術には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、所望の抗体又はポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することが含まれる。DNA断片の所望の末端を確定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、抗UNQ733抗体及びUNQ733ポリペプチド断片は、ここに開示した天然抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

10

【0099】

特定の実施形態では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

20

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; 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

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は分子疎水性、又は(c)側鎖の高を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。アミノ酸は、それらの側鎖特性の類似性に従ってグループ分けすることができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp.73-75, Worth Publisher, New York (1975)):

(1) 無極性: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 無電荷極性: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K), Arg (R), His (H)

或いは、共通の側鎖特性に基づいて天然に発生する残基をグループ分けすることができる:

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- (2) 中性親水性： Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) 酸性： Asp, Glu;
- (4) 塩基性： His, Lys, Arg;
- (5) 鎖の方向に影響する残基： Gly, Pro;
- (6) 芳香性： Trp, Tyr, Phe

【0101】

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発[Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、抗UNQ 733ポリペプチド抗体又はUNQ 733ポリペプチド変異体DNAを作成することもできる。

【0102】

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

抗UNQ 733ポリペプチド抗体又はUNQ 733ポリペプチドの適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、概してセリンと置換され得る。逆に、抗UNQ 733抗体又はUNQ 733ポリペプチドの安定性(特に、抗体がFv断片のような抗体断片)を向上させるために、それにシステイン結合(複数でも)を加えてもよい。

【0103】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位(例えば、6-7部位)を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトUNQ 733ポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができ

10

20

30

40

50

る。

抗UNQ733抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で周知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、そして抗-UNQ733抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘発による、天然ソースからの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）又は調製が含まれる。

【0104】

G. 抗UNQ733抗体及びUNQ733ポリペプチドの修飾

抗UNQ733ポリペプチド抗体及びUNQ733ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型には、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えば抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドを、抗UNQ733抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0105】

本発明の範囲内に含まれる抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここで意図される「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分を欠失させること（内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、又は化学及び/又は酵素的手法でグリコシル化を欠失させることのいずれか）、及び/又は天然配列抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。更には、この語句には、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的な変化が含まれる。

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化とは、典型的にはN-結合又はO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O-結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖をヒドロキシアミノ酸へ付与することを指す。

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの配列へ一つ又は複

10

20

30

40

50

数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について）。抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって、場合によっては改変され得る。

【0106】

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。そのような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行された国際公開87/05330、及びAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981) に記載されている。

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)によって、そしてEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド共有結合的修飾の他の型は、抗体又はポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。また、抗体又はポリペプチドは、例えばコアセルベーション法によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル）に、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで捕捉することができる。このような技術はRemington's *Pharmaceutical Sciences*, 16版, A. Oslo編(1980)に開示されている。

また、本発明の抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドを含むキメラ分子が形成される方法で修飾されてもよい。

【0107】

一実施形態では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp

等, *BioTechnology*, 6:1204 1 - 70 (1988)] ; K T 3 エピトープペプチド [Martin等, *Science*, 255:192-194 (1992)] ; -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)] ; 及び T 7 遺伝子 10 タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

それに換わる実施形態では、キメラ分子は抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態 (「イムノアドヘシン」とも呼ばれる) については、そのような融合体は I g G 分子の F c 領域であり得る。I g 融合体は、好ましくは I g 分子内の少なくとも 1 つの変換領域に換えて抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドの可溶化 (膜貫通ドメイン欠失又は不活性化) 形態を含む。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合体は、I g G 分子のヒンジ、C H₂ 及び C H₃、又はヒンジ、C H₁、C H₂ 及び C H₃ 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第 5 4 2 8 1 3 0 号を参照のこと。

【 0 1 0 8 】

H . 抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドを産生させる方法に関する。勿論、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドを調製することができると考えられている。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部分を、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生成してもよい [例えば、Stewart 等, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., サン フランシスコ, カリフォルニア (1969) ; Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) 参照]。手動技術又は自動を使用することによってインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (フォスター シティー, カリフォルニア) を用いて、製造者の指示によって実施してもよい。抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて所望する抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドを生成させてもよい。

【 0 1 0 9 】

1 . 抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドをコードする D N A の単離

抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドをコードする D N A は、抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチド m R N A を保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された c D N A ライブラリーから得ることができる。従って、ヒト抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチド D N A は、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリーから簡便に得ることができる。また抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法 (例えば、自動核酸合成) により得ることもできる。

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (少なくとも約 20 - 80 塩基のオリゴヌクレオチド等) によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる c D N A 又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えば Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は、P C R 法を使用するものである [Sambrook 等, 上掲 ; Dieffenbach 等, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【 0 1 1 0 】

c D N A ライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十

10

20

30

40

50

分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識ATPのような放射線標識、ピオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら、に示されている。

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

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

【0111】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド生成のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及び上掲のSambrook等に見出すことができる。

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315(1983)及び1989年6月29日公開の国際公開89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【0112】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31446);大腸菌X1776(ATCC31537);大腸菌株W3110(ATCC27325)及びK5772(ATCC53635)である。

他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチルス (*B. subtilis*) 及びバチルス・リチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 deg P ompT kan^r* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 deg P ompT rbs7 ilvG kan^r* を有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性 *deg P* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

10

20

【0113】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、治療用の抗体が細胞傷害剤 (例えば、毒素) と結合し、その免疫コンジュゲートそのものが腫瘍細胞の破壊において有効性を示す場合など、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が不要な場合に、細菌で産生させることができる。完全長抗体は、血液循環でより長い半減期を有する。大腸菌での産生が、より迅速でより費用効率的である。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号 (Carter等)、米国特許第5789199号 (Joly等)、及び翻訳開始部位 (TIR) 及び発現と分泌を最適化するシグナル配列を記載している米国特許第5840523号 (Simmons等) を参照のこと。これら特許は、ここに参考文献として取り入れられている。発現の後、抗体は、大腸菌細胞ペーストから可溶性分画へ分離し、例えば、アイソタイプによってプロテインA又はGカラムを介して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現させた抗体を精製するための工程と同じようにして行うことができる。

30

【0114】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開の欧州特許第139383号)；クリユイペロミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4943529号；Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばクリユイペロミセスラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvincourt等, *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983])、クリユイペロミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12424)、クリユイペロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16045)、クリユイペロミセス・ウケラミイ (*K. wickeramii*) (ATCC 24178)、クリユイペロミセス・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56500)、クリユイペロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36906；Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、クリユイペロミセス・テモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びクリユイペロミセス・マルキシアナス (*K. marxianus*)；ヤロウイア (*yarrowia*) (欧州特許第402226号)

40

50

; ピシア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号; Sreekrishna等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号); アカパンカビ (Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第394538号); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピシア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotulula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

10

【0115】

グリコシル化抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から由来のものである。非脊椎動物細胞の例には、植物細胞、例えば綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの細胞培養と同様に、ショウジョウバエS2及びヨトウ(*spodoptera*) Sf9等の昆虫細胞が含まれる。多くのバキュロウイルス株及び変異体、及びヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*) (幼虫(caterpillar))、ネッタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主に対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。種々のトランスフェクション用のウイルス株、例えばオートグラファ・カルフォルニカ(*Autographa californica*) NPVのL-1変異株、カイコNPVのBm-5株が公に入手でき、このようなウイルスは、本発明に係るウイルスとして、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。

20

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40(COS-7, ATCC CRL1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株; ヒト胚芽腎細胞株(293又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された293細胞, Graham等, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR (CHO, Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞(CV1 ATCC CCL70); アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト頸管腫瘍細胞(HELA, ATCC CCL2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞(Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝臓癌細胞(Hep G2)である。

30

40

宿主細胞は、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド生成のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘発し、形質転換体を選出し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修正した通常の栄養培地で培養される。

【0116】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドをコードする核酸(例えば、cDN

50

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

UNQ733ポリペプチドは直接的に組換え手法によって生成されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクリユイベロミセス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0117】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばパシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingsman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【0118】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物

10

20

30

40

50

宿主との使用に適したプロモーターは、 λ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第36,776号]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]又は他の糖分解酵素 [Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

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

【0119】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開の英国特許第2211504号)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強される。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:6

10

20

30

40

50

20-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第 1 1 7 0 6 0 号; 及び欧州特許第 1 1 7 0 5 8 号に記載されている。

【 0 1 2 0 】

4 . 宿主細胞の培養

本発明の抗 U N Q 7 3 3 抗体又は U N Q 7 3 3 ポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)の F 1 0 (シグマ)、最小必須培地((MEM),シグマ)、R P M I - 1 6 4 0 (シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第 4 7 6 7 7 0 4 号; 同 4 6 5 7 8 6 6 号; 同 4 9 2 7 7 6 2 号; 同 4 5 6 0 6 5 5 号; 又は同 5 1 2 2 4 6 9 号; 国際公開第 9 0 / 0 3 4 3 0 号; 国際公開第 8 7 / 0 0 1 9 5 号; 又は米国特許再発行第 3 0 9 8 5 号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えば H E P E S)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、p H等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

20

【 0 1 2 1 】

5 . 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、m R N A の転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(D N A 分析)、又はインサイットハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、D N A 二本鎖、R N A 二本鎖、及び D N A - R N A ハイブリッド二本鎖又は D N A - タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

30

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列 U N Q 7 3 3 ポリペプチドに対して、又はここで提供される D N A 配列をベースとした合成ペプチドに対して、又は U N Q 7 3 3 D N A に融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

40

【 0 1 2 2 】

6 . 抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドの精製

抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X 1 0 0)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

抗 U N Q 7 3 3 抗体及び U N Q 7 3 3 ポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される: すなわち、イオン交換カラムでの分画; エタノール沈殿; 逆相 H P L C; シリカ又は

50

カチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及び抗UNQ733抗体及びUNQ733ポリペプチドのエピトプタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗UNQ733抗体又はUNQ733ポリペプチドの性質に依存する。

【0123】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 [1983])。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等, *EMBO J.* 5: 15671575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約2.5 - 4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0 - 0.25M塩)で実施される。

【0124】

I. 製薬製剤

本発明に係る抗UNQ733抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド、UNQ733ポリペプチド結合有機又は無機小分子及び/又はUNQ733ポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th版, Osol, A. 編. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防

10

20

30

40

50

腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及びノ又はトゥイーン(TWEEN)（登録商標）、プルロニクス(PLURONICS)（登録商標）、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは5-200mg/mlの間、好ましくは10-100mg/mlの間の濃度の抗体で構成される。

10

【0125】

ここでの製剤は、また、治療すべき特定の徴候の必要に応じて一以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。例えば、抗UNQ733抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド又はUNQ733ポリペプチド結合有機又は無機小分子に加えて、1つの製剤に、例えば、UNQ733ポリペプチド上の異なるエピトープと結合する第二抗UNQ733抗体、又は特定の癌の成長に影響を与える成長因子のような何らかの他の標的に対する抗体を含めることは望ましい。あるいは、又はさらに、この組成物は、更に化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗-ホルモン剤、及びノ又は心臓保護剤を含んでもよい。このような分子は、意図する目的にとって有効な量の組み合わせで適切に存在する。

20

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

40

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過により容易に達成される。

【0126】

J. 抗UNQ733抗体、UNQ733ポリペプチド結合オリゴペプチド及びUNQ733ポリペプチド結合有機/無機小分子を用いる治療

癌におけるUNQ733ポリペプチド発現を定量するために、種々の検出アッセイが利用可能である。一実施形態では、UNQ733ポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学(IHC)によって分析される。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイへ供してもよいし、次のようなUNQ733ポリペプチド染色強度基準と合致させてもよい：

50

スコア 0 - 染色が観察されないか、又は膜染色が腫瘍細胞の 10%未満で観察される。

スコア 1 + - わずかに / 弱く認知できる程度の膜染色が腫瘍細胞の 10%を越えて検出される。細胞はそれらの膜の一部のみが染色される。

スコア 2 + - 弱いないしは中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の 10%を越えて観察される。

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

UNQ733ポリペプチド発現に関して0又は1+スコアの腫瘍は、UNQ733が過剰発現していないことを特徴としうるものであるのに対し、2+又は3+スコアの腫瘍はUNQ733ポリペプチドが過剰発現していることを特徴としうる。

【0127】

別に、又は付加的に、FISHアッセイ、例えばINFORM(登録商標)(Ventana, Arizonaから販売)又はPATHVISION(登録商標)(Vysis, Illinois)を、ホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織で実施して、腫瘍におけるUNQ733ポリペプチド過剰発現の程度(生じているならば)を測定してもよい。

UNQ733ポリペプチド過剰発現又は増幅は、インビボ検出アッセイを使用して評価することができ、例えば検出される分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体又は蛍光標識)が付けられた分子(例えば抗体、オリゴペプチド又は有機小分子)を投与し、標識の局在化について患者を外部スキャンニングする。

上に記載したように、本発明の抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機小分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、UNQ733ポリペプチドを発現している癌の染色にとって有用である(例えば、ラジオイメージングで)。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からUNQ733ポリペプチド発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機小分子は、また、例えば、ELISA又はウェスタンブロットにおいて、インビトロでUNQ733ポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からUNQ733ポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【0128】

現在、癌の段階に応じて、癌の治療には、次の治療：外科手術による癌組織の除去、放射線治療、及び化学治療の一つ、又はそれらを組合せたものが含まれる。抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機小分子による治療は、特に、化学治療における副作用や毒素に対する耐性がない老年の患者、及び放射線治療の有用性に限界がある転移性疾患において所望されている。本発明の腫瘍標的化抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、疾患の初期診断時及び再発中におけるUNQ733ポリペプチド発現癌の緩和に有用である。治療用途に関しては、抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、単独で、あるいは例えば、ホルモン、抗血管形成、又は放射線標識された化合物と共に、又は外科手術、寒冷療法、及び/又は放射線治療と組み合わせてもよく、使用してもよい。抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子による治療は、従来の治療の前又は後のいずれかに連続させて、他の形態の従来の治療と共に実施することができる。化学療法剤、例えばタキソテレ(登録商標)(ドセタキセル)、タキソール(登録商標)(パルクタキセル)、エストラムスチン及びミトキサントロンは、癌、特に危険性の少ない患者の癌治療に使用される。癌を治療又は緩和するための本発明の方法において、上述した一又は複数の化学療法剤による治療と組合せて、癌患者に抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を投与することができる。特に、パルクタキセル及び改変誘導体との組合せ治療が考えられる(例えば、欧州特許第0600517号を参照のこと)。抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は治療的有効量の化学療法剤と共に投与されるであろう。他の実施形態では、抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は化学療法剤、例えばパルクタキセルの活性及び効力を高めるための化学治療と組合せて投与される。医師用卓上参考書(PDR)には、種々の癌治療に使用されるこれらの薬剤の用量が開示されている。治療的に有効な上述の化学

10

20

30

40

50

療法剤の投薬計画及び用量は、治療される特定の癌、疾患の程度、及び当該技術分野の医師によく知られている他の因子に依存し、医師が決定することができる。

【0129】

特定の一実施形態では、細胞障害剤に結合した抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有する毒素コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、UNQ733タンパク質に結合した免疫コンジュゲートは細胞によりインターナリゼーションし、結果として、それが結合した癌細胞の殺傷性における免疫コンジュゲートの治療的効果が向上する。好ましい実施形態では、細胞障害剤は、癌細胞内の核酸を標的とするか、又はこれに干渉する。このような細胞障害剤の例は、上述されており、メイタンシノイド、カリケマイシン、リボヌクレアーゼ及びDNAエンドヌクレアーゼを含む。

抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子又はその免疫コンジュゲートは、公知の方法、例えばボラス、もしくは一定時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所的、又は吸入経路により、ヒトの患者に投与される。抗体、オリゴペプチド又は有機小分子の静脈内又は皮下投与が好ましい。

他の治療計画を抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の投与と組合せてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の医薬製剤を使用する同時投与、及び好ましくは両方(又は全ての)活性剤が同時にその生物学的活性を働かせる時間があるいずれかの順での連続投与が含まれる。このような組合せ治療により、結果として相乗的治療効果が生じることが好ましい。

【0130】

また、特定の癌に関連した他の腫瘍抗原に対する抗体の投与と共に、抗UNQ733抗体又は抗体類、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の投与を組合せることが望ましい。

他の実施形態では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗UNQ733抗体(又は抗体類)、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と一又は複数の化学療法剤又は成長阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素及びヒドロキシ尿素タキサン類(hydroxyureataxanes)(例えばパクリタキセル及びドキセタキセル)及び/又はアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service編 M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。

抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、抗ホルモン化合物;例えばタモキシフェン等の抗-エストロゲン化合物;抗-プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第616812号を参照);又は抗アンドロゲン、例えばフルタミドを、このような分子に対して既知の用量で組合せてもよい。治療される癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン治療を受け、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子(及び場合によってはここに記載した他の薬剤)を患者に投与してもよい。

【0131】

しばしば、心臓保護剤(治療に関連する心筋の機能不全を防止又は低減するため)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも有益なことである。上述した治療疾患に加えて、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子治療の前、同時又は治療後に、外科的に癌細胞を取り除くか、及び/又は放射線治療を施してもよい。上述した任意の同時投与される薬剤の適切な用量は現在使用されている量であり、抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と薬剤の組合せ作用(相乗作用)に応じてより少なくしてもよい。

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の適切な用量は、上記のよう

10

20

30

40

50

な治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重1kg当たり約1µgないし50mg(例えば0.1-15mg/kg/用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約4mg/kgの初期負荷量、続いて1週間に約2mg/kgの維持用量の抗UNQ733抗体を投与することからなっておりよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1µg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

10

20

30

40

50

【0132】

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

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために:インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4892538号及び第5283187号参照)。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0133】

現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はアデノ関連ウイルス)、及び脂質ベースの系(例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである)での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等、Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第93/25673号及びそこに引用された参考文献も参照。

本発明の抗UNQ733抗体は、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫コンジュゲート、及びそれらの機能的断片が含まれる。融合抗体において、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗体はFc領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なFc領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ADCC)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞障害性を誘発し得る。また、副作用及び治療による合併症を最小にするようにエフェクター機能を除去又は低減することが望ましい場合には、所定の他のFc領域が使用される。

一実施形態では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか

、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗UNQ733抗体の生物学的特徴を有する抗体、特にインビボ腫瘍ターゲティング及び任意の細胞増殖阻害又は細胞障害特性を含むものが考察される。

上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【0134】

本抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、哺乳動物におけるUNQ733ポリペプチドを発現するリンパ腫、特に非ホジキンリンパ腫、或いは一又は複数のリンパ腫の徴候の緩和に有用である。本発明の方法では、非ホジキンリンパ腫に関連する転移性の腫瘍の徴候を治療及び/又は緩和するのにUNQ733アンタゴニストを用いる。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子UNQ733アンタゴニストは、哺乳動物においてUNQ733ポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。一実施形態では、抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、インビボ又はインビトロでUNQ733ポリペプチドに結合し、UNQ733ポリペプチドを発現するか及び/又は、UNQ733ポリペプチドに応答する腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の成長を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗UNQ733抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞成長阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗UNQ733抗体に付与することができる。一部の実施形態では、この細胞障害剤又は成長阻害剤は、小分子である。一部の実施形態では、毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体を使用される。

10

20

【0135】

本発明は、本発明の抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と担体を含む組成物を提供する。癌の治療のために、組成物はその治療の必要性に応じて患者に投与することができ、ここで組成物は免疫コンジュゲート又は裸の抗体として存在する一又は複数の抗UNQ733抗体を含むし得る。さらなる実施形態においては、組成物は、他の療法剤、例えば化学療法剤を含む成長阻害剤又は細胞障害剤とこれらの抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を組合せて含むこともできる。また本発明は、本発明の抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子と担体を含む製剤も提供する。一実施形態では、製剤は製薬的に許容可能な担体を含む治療用製剤である。

30

本発明の他の態様は、抗UNQ733抗体をコードする単離された核酸分子である。H及びL鎖、特に高頻度可変領域残基をコードする核酸、天然配列抗体及び変異体をコードする鎖、該抗体の修飾体及びヒト化形態を含む。

本発明は、抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における非ホジキンリンパ腫の治療又はリンパ腫の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、UNQ733ポリペプチドを発現する細胞及び/又はUNQ733ポリペプチドに応答する細胞の成長を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

40

本発明は少なくとも一つの抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むキット又は製造品も提供する。抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むキットは、例えばUNQ733ポリペプチド細胞殺傷アッセイ、細胞からのUNQ733ポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、UNQ733ポリペプチドの単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むことができる。インビトロにおけるUNQ733ポリペプチドの検出及び定量化、例えばELISA又はウェスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は

50

有機/無機小分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【0136】

K. 製造品及びキット

本発明の他の実施形態は、非ホジキンリンパ腫等の抗UNQ733ポリペプチド発現癌の治療に有用な物質を含有する製造品である。この製造品は容器と容器に付与又は添付されるラベル又はパッケージ挿入物を含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの多様な材料から形成されてよい。容器は、癌の状態の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌の治療のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、癌患者に抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子組成物を投与する際の注意書きをさらに含む。製造品はさらに、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(BWFI)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

種々の目的、例えばUNQ733ポリペプチド発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのUNQ733ポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。UNQ733ポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗UNQ733抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むことが可能である。インビトロにおけるUNQ733ポリペプチドの検出及び定量化、例えばELISA又はウエスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも一つの本発明の抗UNQ733ポリペプチド抗体、オリゴペプチド又は有機/無機小分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

【0137】

L. UNQ733ポリペプチド及びUNQ733-ポリペプチドコード核酸 - 特定の形態及び用途

UNQ733ポリペプチドをコードする核酸配列(又はそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAプローブの生成において種々の用途を有している。また、UNQ733ポリペプチドコード化核酸は、ここに記載される組換え技術によるUNQ733ポリペプチドの調製に有用であり、これらUNQ733ポリペプチドは、例えば、ここで記載の抗UNQ733抗体の調製において用途を見出し得る。

完全長天然配列UNQ733遺伝子又はその一部は、完全長UNQ733cDNAの単離又はここに開示した天然UNQ733配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のcDNA(例えば、UNQ733の天然発生変異体又は他の種からのUNQ733をコードするもの)の単離のために、cDNAライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約20~約50塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列UNQ733ポリペプチドのプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から判定され得る。例えば、スクリーニング法は、UNQ733ポリペプチド遺伝子

のコード化領域を周知のDNA配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、 ^{32}P 又は ^{35}S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明のUNQ733ポリペプチド遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意のEST配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

10

【0138】

UNQ733ポリペプチドコード核酸の他の有用な断片には、標的UNQ733ポリペプチドmRNA(センス)又はUNQ733ポリペプチドDNA(アンチセンス)配列と結合できる一本鎖核酸配列(RNA又はDNAのいずれか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、UNQ733DNAのコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)及びvan der Kroel等(BioTechniques 6:958, 1988)に記載されている。

20

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。そのような方法は、本発明に含まれている。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、UNQ733タンパク質の発現を阻止するのに用いられ、それらUNQ733タンパク質は、哺乳動物での癌の誘導を担い得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格(又は他の糖結合、国際公開91/06629に記載のもの等)を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが(つまり、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

30

【0139】

アンチセンス結合の好適な遺伝子内部位には、遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の翻訳開始/開始コドン(5'-AUG/5'-ATG)又は終結/停止コドン(5'-UAA、5'-UAG及び5'-UGA/5'-TAA、5'-TAG及び5'-TGA)を含む領域が含まれる。これらの領域は翻訳開始又は終結コドンから何れかの方向(つまり5'又は3')に約25から約50の近接ヌクレオチドを包含するmRNA又は遺伝子の一部を意味する。アンチセンス結合のための他の好適な領域には、イントロン;エキソン;イントロン-エキソン接合部;翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域であるオープンリーディングフレーム(ORF)又は「コード領域」;5'-5'トリホスフェート結合を介してmRNAの5'-最末端残基に結合したN7-メチル化グアノシン残基を含み、5'キャップ構造自体と同様にキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドを含むmRNAの5'キャップ;翻訳開始コドンから5'方向のmRNAの部分で、mRNA又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳開始コドンと5'キャップ部位の間のヌクレオチドを含む5'の未翻訳領域(5'UTR);及び翻訳終結コドンから3'方向のmRNAの部分で、mRNA又は遺伝子上の対応するヌクレオチドの3'末端と翻訳停止コドンの間のヌクレオチドを含む、3'未翻訳領域(3'UTR)が含まれる。

40

UNQ733ポリペプチドの発現を阻害するのに有用な好適なアンチセンス化合物の特定の例には、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには骨格にリン原子を保持しているものと骨格にリン原子を有していないものが含まれる。この明細書の目的のために、また当該

50

分野でしばしば引用されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドはまたオリゴヌクレオチドであると考えられることができる。好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えばホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネートで、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むもの、ホスフィネート、ホスホルアミデートで、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むもの、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェートで通常の3'-5'結合を持つもの、これらの2'-5'結合類似体、及び一又は複数のヌクレオチド間結合が3'から3'、5'から5'又は2'から2'結合である逆転された極性を持つものが含まれる。逆転した極性を持つ好適なオリゴヌクレオチドは単一の3'から3'結合を最も3'側のヌクレオチド間結合、つまり、非塩基性(abasic)でありうる単一の逆転ヌクレオチド残基(核酸塩基がないか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する)を含む。様々な塩、混合された塩及び遊離の酸形態がまた含まれる。リン含有結合の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許3 6 8 7 8 0 8 ; 4 4 6 9 8 6 3 ; 4 4 7 6 3 0 1 ; 5 0 2 3 2 4 3 ; 5 1 7 7 1 9 6 ; 5 1 8 8 8 9 7 ; 5 2 6 4 4 2 3 ; 5 2 7 6 0 1 9 ; 5 2 7 8 3 0 2 ; 5 2 8 6 7 1 7 ; 5 3 2 1 1 3 1 ; 5 3 9 9 6 7 6 ; 5 4 0 5 9 3 9 ; 5 4 5 3 4 9 6 ; 5 4 5 5 2 3 3 ; 5 4 6 6 6 7 7 ; 5 4 7 6 9 2 5 ; 5 5 1 9 1 2 6 ; 5 5 3 6 8 2 1 ; 5 5 4 1 3 0 6 ; 5 5 5 0 1 1 1 ; 5 5 6 3 2 5 3 ; 5 5 7 1 7 9 9 ; 5 5 8 7 3 6 1 ; 5 1 9 4 5 9 9 ; 5 5 6 5 5 5 5 ; 5 5 2 7 8 9 9 ; 5 7 2 1 2 1 8 ; 5 6 7 2 6 9 7 及び5 6 2 5 0 5 0 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

10

20

30

40

50

【0140】

リン原子をそこに含まない好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格は短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間結合、又は一又は複数の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオチド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合(ヌクレオチドの糖部分から部分的に形成される)を有するもの; シロキサノ骨格; スルフィド、スルホキッド及びスルホン骨格; ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格; メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格; リボアセチル骨格; アルケン含有骨格; スルファメート骨格; メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格; スルホネート及びスルホンアミド骨格; アミド骨格; 及び混合N、O、S及びCH₂成分部分を有する他のものが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許5 0 3 4 5 0 6 ; 5 1 6 6 3 1 5 ; 5 1 8 5 4 4 4 ; 5 2 1 4 1 3 4 ; 5 2 1 6 1 4 1 ; 5 2 3 5 0 3 3 ; 5 2 6 4 5 6 2 ; 5 2 6 4 5 6 4 ; 5 4 0 5 9 3 8 ; 5 4 3 4 2 5 7 ; 5 4 6 6 6 7 7 ; 5 4 7 0 9 6 7 ; 5 4 8 9 6 7 7 ; 5 5 4 1 3 0 7 ; 5 5 6 1 2 2 5 ; 5 5 9 6 0 8 6 ; 5 6 0 2 2 4 0 ; 5 6 1 0 2 8 9 ; 5 6 0 2 2 4 0 ; 5 6 0 8 0 4 6 ; 5 6 1 0 2 8 9 ; 5 6 1 8 7 0 4 ; 5 6 2 3 0 7 0 ; 5 6 6 3 3 1 2 ; 5 6 3 3 3 6 0 ; 5 6 7 7 4 3 7 ; 5 7 9 2 6 0 8 ; 5 6 4 6 2 6 9 及び5 6 7 7 4 3 9 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、糖とヌクレオチド間結合の双方、つまりヌクレオチド単位の骨格が新規な基と置換される。ベース単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を持つことが示されているオリゴヌクレオチド擬態体はペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。PNA化合物の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許5 5 3 9 0 8 2 ; 5 7 1 4 3 3 1 ; 及び5 7 1 9 2 6 2 が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。PNA化合物の更なる教示はNielsen等, Science, 1991, 254,

1497-1500に見出すことができる。

好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオネート骨格及び/又はヘテロ原子骨格、特に $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られる]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、及び上で参照した米国特許第5489677号に記載された $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [ここで天然ホスホジエステル骨格は $-O-P-O-CH_2-$ と表される]及び上で参照された米国特許第5602240号のアミド骨格を含む。また好ましいものは上で参照した米国特許第5034506号のモルホリノ骨格構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0141】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一又は複数の置換糖部分を含みうる。好適なオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む：OH；F；O-アルキル、S-アルキル、又はN-アルキル；O-アルケニル、S-アルケニル又はN-アルケニル；O-アルキニル、S-アルキニル又はN-アルキニル；又はO-アルキル-O-アルキルを含み、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は非置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルでありうる。特に好ましいものは $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、ここでn及びmは1から約10である。他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む： $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラキル、O-アルカリル又はO-アラキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善する基、オリゴヌクレオチドの薬理的性質を改善する基、及び同様な性質を持つ他の置換基。好適な修飾は2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2'-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている2'-O-CH₂CH₂OCH₃) (Martin等, Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504)、つまりアルコキシアルコキシ基を含む。更に好適な修飾は、以下の実施例に記載されているように2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、つまり2'-DMAOEとしても知られている $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られている)、つまり2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)を含む。

更に好適な修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'又は4'炭素原子に結合され二環糖部分を形成する固定核酸(Locked Nucleic Acids: LNAs)を含む。結合は好ましくはnが1又は2である2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン($-CH_2-$)_n基である。LNAs及びその製造方法は国際公開98/39352及び国際公開99/14226に記載されている。

他の好適な修飾は2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-アリル(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-アリル(2'-O-CH₂-CH=CH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾はアラビノ(上)位置又はリボ(下)位置においてでありうる。好適な2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾はまたオリゴヌクレオチドの他の位置、特に3'末端ヌクレオチドの糖の3'位又は2'-5'結合オリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位になすことができる。オリゴヌクレオチドはまたペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬態体を有しうる。そのような修飾糖構造の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許4981957；5118800；5319080；5359044；5393878；5446137；5466786；5514785；5519134；5567811；5576427；5591722；5597909；5610300；5627053；5639873；5646265；5658873；567

10

20

30

40

50

0633; 5792747; 及び5700920が含まれ、その各々は出典明示により全体がここに取り込まれる。

【0142】

オリゴヌクレオチドにはまた核酸塩基(当該分野ではしばしば単に「塩基」と称される)の修飾又は置換が含まれる。ここで使用される場合、「未修飾の」又は「天然の」核酸塩基にはプリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)及びピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-プロピル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロポニル(-C(CH₃)₂-CH₂-C(CH₃)₂-H)ウラシル及びシトシン及び他のピリミジン塩基のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(ブソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン類及びグアニン類、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル類及びシトシン類、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが含まれる。更なる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン類、例えばフェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)が含まれる。修飾核酸塩基にはまたプリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンが含まれる。更なる核酸塩基には米国特許第3687808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858-859頁, Kroschwitz, J.I.編 John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、及びEnglisch等, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613に開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のある種のもは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及びO-6置換プリンで、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含むものが含まれる。5-メチルシトシン置換は0.6-1.2

だけ核酸二重安定性を増大させることが知られており(Sanghvi等, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278)、より詳細には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、好適な塩基置換である。修飾核酸塩基の製造を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許3687808; 並びに米国特許4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5645985; 5830653; 5763588; 6005096; 5681941及び5750692が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0143】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを亢進する一又は複数の部分又はコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合させることを含む。本発明の化合物は第1級又は第2級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合したコンジュゲート基を含む。本発明のコンジュゲート基には、

介入物（インターカレーター）、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬理的性質を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、カチオン脂質、リン脂質、カチオン性リン脂質、ピオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が含まれる。この発明の文脈における薬理的性質を増強する基には、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を亢進し、及び/又はRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを補強する基が含まれる。この発明の文脈における薬物動態学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込み、分散、代謝又は排出を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には限定されるものではないが、脂質分子、例えばコレステロール部分（Letsinger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556）、コール酸（Manoharan等、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1063）、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan等、Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660-306-309; Manoharan等、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser等、Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基（Saison-Behmoaras等、EMBOJ., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov等、FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等、Biochimie, 1993, 75, 49-54）、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム 1, 2 -ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート（Manoharan等、Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea等、Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783）、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖（Manoharan等、Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973）、又はアダマンタン酢酸（Manoharan等、Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654）、パルミチル部分（Mishra等、Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237）、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた活性な薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロsporin、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗菌剤又は抗生物質にコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲート及びその製造方法は米国特許出願第09/334130号（1999年6月15日出願）及び米国特許4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5241136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928及び5688941に記載され、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【0144】

与えられた化合物の全ての位置を一様に修飾する必要はなく、実際、一を超える上述の修飾を単一化合物中に又はオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオチドにさえ導入することができる。本発明はまたキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈における「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、それぞれが少なくとも一のもの

10

20

30

40

50

マー単位、つまりオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドからなる2以上の化学的に区別される領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的にはオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞性取り込み、及び/又は標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾されている少なくとも一の領域を含む。オリゴヌクレオチドの更なる領域はRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドを切断可能な酵素の基質となりうる。例を挙げると、RNAアーゼHはRNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。故に、RNAアーゼHの活性化はRNA標的の開裂を生じ、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効果を大きく向上させる。従って、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をしばしば得ることができる。本発明のキメラアンチセンス化合物は上述の二以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及び/又はオリゴヌクレオチド擬態体の複合構造体として形成されてもよい。好適なキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性を付与するために3'末端に少なくとも一の2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)とRNAアーゼH活性を付与するために少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ領域を含む。このような化合物はまた当該分野においてハイブリッド又はギャプマー(gapmers)とも呼ばれている。好適なギャプマーは少なくとも4の隣接した2'-H糖を持つ少なくとも一の領域で分離した3'末端と5'末端2'修飾糖(好ましくは2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)の領域を持ち、好ましくはホスホロチオネート骨格結合を含む。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 及び5700922が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

本発明において使用されるアンチセンス化合物は固相合成のよく知られた技術によって簡便かつ常套的に製造することができる。そのような合成のための装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, Calif.)を含む幾つかのメーカーによって販売されている。当該分野で知られているそのような合成のための任意の他の手段を付加的に又は別に使用してもよい。オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオネート及びアルキル化誘導体を調製するために類似の技術を使用することはよく知られている。本発明の化合物は、また、取り込み、分散及び/又は吸収を補助するための他の分子、分子構造又は化合物混合物、例えばリポソーム、レセプター標的分子、経口、直腸、局所適用又は他の製剤と、混合、カプセル化、コンジュゲート又はその他、組み合わせられてもよい。そのような取り込み、分散及び/又は吸収を補助する製剤の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第5108921; 5354844; 5416016; 5459127; 5521291; 5543158; 5547932; 5583020; 5591721; 4426330; 4534899; 5013556; 5108921; 5213804; 5227170; 5264221; 5356633; 5395619; 5416016; 5417978; 5462854; 5469854; 5512295; 5527528; 5534259; 5543152; 5556948; 5580575; 及び5595756が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

【0145】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNAトラ

10

20

30

40

50

ンスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(国際公開90/13641参照)を含む。

【0146】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【0147】

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、通常は少なくとも約5ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約6、7、8、9、10、11、1-73、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の10%を加えるか又は減じたものを意味する。

また、プローブをPCR技術に用いて、密接に関連したUNQ733ポリペプチドコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、UNQ733ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、そのUNQ733ポリペプチドをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイトハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

【0148】

UNQ733ポリペプチドをアッセイに使用して、UNQ733ポリペプチドとの結合性相互作用に関与する他のタンパク質又は分子を同定することができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、

10

20

30

40

50

このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、結合性相互作用のペプチド又は小分子阻害剤のスクリーニングに用いることができる。スクリーニングアッセイは、天然UNQ733ポリペプチド又はUNQ733ポリペプチドのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計することができる。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにす。考慮される小分子は、合成有機化合物又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

また、UNQ733ポリペプチド又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、UNQ733ポリペプチドをコードするcDNAは、UNQ733ポリペプチドをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、UNQ733ポリペプチドをコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4736866号や第4870009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのUNQ733ポリペプチド導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたUNQ733ポリペプチドをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はUNQ733ポリペプチドをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0149】

あるいは、UNQ733ポリペプチドの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたUNQ733ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、UNQ733ポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、UNQ733ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するUNQ733遺伝子「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、UNQ733ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、UNQ733ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。UNQ733ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、組み込みをモニターしたりするために使用する選択性マーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターを胚幹細胞株に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編 (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母動物に移植し、期間を置いて「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、UNQ733ポリペプチドの欠乏によるある種

10

20

30

40

50

の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

また、UNQ733ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている (Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0150】

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである (Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

ここに記載したUNQ733ポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列データに基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、目下のところ新規な染色体マーカーの同定の必要である。本発明の各UNQ733核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

本発明のUNQ733ポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングの診断に使用でき、UNQ733ポリペプチドは、その他の組織と比較して1つの組織において、好ましくは同じ組織型の正常組織と比較して疾患性組織において特異的に発現する。UNQ733核酸分子には、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0151】

この発明は、UNQ733ポリペプチド(アンタゴニスト)の効果を防ぐものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を含む。アンタゴニスト薬候補に関するスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされたUNQ733ポリペプチドと結合又は複合化する、さもなければコードされているポリペプチドと他の細胞タンパク質の相互作用を妨害する化合物、例えば、細胞からのUNQ733ポリペプチドの発現を阻害するものを含む化合物を同定するように設計されている。そのようなスクリーニングアッセイには、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイが含まれ、それらアッセイを特に小分子薬剤候補の同定に適したものにす

。

10

20

30

40

50

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、そして細胞ベースアッセイを含む、当該分野で良く特徴付けられている種々の形式で行うことができる。

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているUNQ733ポリペプチドと、これら両成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施形態では、UNQ733ポリペプチド又は薬候補が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をUNQ733ポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきUNQ733ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体の使用によって検出できる。

【0152】

候補化合物が相互作用するがUNQ733ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーのカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London), 340, :245-246(1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)]に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 α -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定のタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0153】

ここで同定されたUNQ733ポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞内又は細胞外成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で調製される。候補化合物の結合阻害能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

アンタゴニストを検定するために、UNQ733ポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともに細胞に添加してもよく、UNQ733ポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がUNQ733ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、UNQ733ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合UNQ733ポリペプチドレセプター又はコード化されたレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。UNQ733ポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したUNQ733ポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパニング及びFACSソーティングにより同定できる。Coligan等, *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化RNAがUNQ733ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のUNQ733ポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したUNQ733ポリペプチドへ曝露する。UNQ733ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、対話型サブプール化及び再スクリーニング法を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0154】

レセプター同定の代替的方法として、標識したUNQ733ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をPAGEで分離し、X線フィルムに曝す。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロシーケンシングを施してよい。マイクロシーケンシングから得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリをスクリーニングするディジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識UNQ733ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとUNQ733ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってUNQ733ポリペプチドの作用を競合的に阻害するUNQ733ポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なUNQ733アンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、三重螺旋形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟UNQ733ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用することができる。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋 - Lee等, *Nucl. Acid Res.*, 6: 3073 (1979); Cooney等, *Science*, 241: 456 (1988); Dervan等, *Science*, 251: 1360 (1991)参照)、それによりUNQ733ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

はインピボでmRNAにハイブリダイゼーションしてmRNA分子のUNQ733ポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligo deoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインピボで発現させて、UNQ733ポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0155】

潜在的アンタゴニストは、UNQ733ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりUNQ733ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的開裂により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、国際公開97/33551(1997年9月18日公開)を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスティン(Hoogsteen)塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸張を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のPCT公報、国際公開97/33551を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0156】

単離されたUNQ733ポリペプチド-コード化核酸は、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、組み換え的にUNQ733ポリペプチドを生成するために用いることが可能である。次に、生成されたUNQ733ポリペプチドは、ここに記載されているような当該分野で良く知られている技術を用いて、抗UNQ733抗体を生成するために用いることが可能である。

ここで同定されるUNQ733ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

UNQ733ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リボフェクション又はリボソームも抗体、又は抗体断片を細胞に搬送するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

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

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

10

20

30

40

50

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【0157】

材料と方法

細胞系： チャイニーズハムスターの卵巣、DP12(アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC:ヴァージニア州マナッサ)及びPGSB(ATCC)突然変異体を使用して、組換えタンパク質を一過性に発現させて、組換えタンパク質を生成した。ATCCからジャーカットリンパ腫、BJAB及びダウディB細胞リンパ腫、及びRehB細胞白血病を得た。

RNA発現分析： 多発性ヒト腫瘍及び正常な組織生検試料におけるUNQ733mRNAの発現を分析するために、Gene Logic, Inc.(メリーランド州ゲイサーズバーグ)からアフィメトリクスデータを得た。合計150の試料(6つの正常試料、62の癌試料、及び82の非癌性疾患の組織)を分析した。グローバルスクリーニングを使用し、標的強度100でGene Logicのデータを標準化した。図1のUNQ733のアフィメトリクスデータは、U133プロブセットID 229152__atから生成したものである。インサイットハイブリダイゼーションのために、オリゴヌクレオチド配列5'-CAG-GTG-ACC-AGG-TTT-ATC-GTG-3'(配列番号5)のプライマーと、プライマー5'-AAT-ATT-CCA-GGG-CCA-GTC-ACT-3'(配列番号6)のセンス鎖コントロールリボプローブを用いて、UNQ733に特異的なPCR産物から368-bp³³P標識アンチセンスリボプローブを生成した。代表的な正常組織及び3つのリンパ腫組織のマイクロアレーを含む癌(Cybrdi, Inc.:メリーランド州フレデリック)もインサイットハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

【0158】

組換えタンパク質： ヒト多組織cDNAライブラリからPCR増幅によってUNQ733cDNAを生成した。PCR産物を、His₈タグを有するpRKベースのベクターであるpSVIDにクローニングした。PGSB細胞(ATCC)を、Fugene6(Roche; Indianapolis, IN)を用いて形質移入し、7日後に回収した培地を調整した。His₈タグ付加UNQ733ポリペプチドをNi-クロマトグラフィによって精製した後、10mMクエン酸塩、pH3.0緩衝液にて透析した。N末端UNQ733ヒト胎盤アルカリホスファターゼ(UNQ733-AP)融合タンパク質は、全UNQ733コード配列をAP遺伝子を含むpRKベクター挿入することによって生成した。CHO細胞をFugene6(Roche)を用いて形質移入して上清を6日間調製した。すべての実験は、AP活性について標準化した対照上清(Re1t-AP)と733-AP上清を用いた。

モノクローナル抗UNQ733抗体： BALB/cマウスの各々の後足蹠に、3~4日間隔で、一リン酸化リポドA/トレハロースジコリノミコレートアジュバント(Corixa; Hamilton, MT)に再懸濁した1.0µgのUNQ733-His₈により15回免疫化した。最終免疫化の3日後に、膝窩リンパ節を、50%のポリエチレングリコールを用いて骨髄腫細胞株P3X63Ag8.653(ATCC, Manassa, VA)と融合し、96ウェル組織培養プレートにて培養した。まず最初に、培養液上清を、UNQ733-His₈と結合する能力についてスクリーニングした。次いで、選択されたハイブリドーマを限界希釈によってクローン化した。

【0159】

ブダベスト条約の下に、抗体のクローンをATCCに寄託した。アメリカンタイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)の所在地は、米国20110-2209ヴァージニア州マナッサ、ユニバーシティブルバード10801である。寄託の詳細は以下の通りである

クローン名	寄託日	ATCC寄託番号
3E7.9.20	2004年6月2日	PTA-6026
3F10.11.2	2004年6月2日	PTA-6027
3H1.4.8	2004年6月2日	PTA-6028

10

20

30

40

50

4 A 9 . 1 2 . 1 2	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 2 9
5 A 8 . 1 1 . 6	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 3 0
5 F 2 . 6 . 1 4	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 3 1
9 D 6 . 1 1 . 1 5	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 3 2
1 0 G 1 0 . 1 5 . 1 6	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 3 3
1 2 H 4 . 1 1 . 3	2 0 0 4 年 6 月 2 日	P T A - 6 0 3 4

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、関連の米国特許の発行及び任意の米国又は外国特許出願の公開のうち、いずれか早く行なわれた方の時点で、寄託培養物の子孫を永久且つ非制限的に入手可能とすることを保証し、35USC122条及びそれに従う特許商標庁長官規則(特に参照番号8860G638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者に後代を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【0160】

ウエスタンブロットおよび免疫沈降法： 精製されたHis₈タグ付加UNQ733タンパク質を、18%SDS-PAGEおよびイムノブロットイング(Invitrogen、Carlsbad, CA)に用いた。ブロットを、1μg/mlの抗UNQ733 Mabと4で終夜インキュベートした。ウサギ抗マウスIg西洋わさびペルオキシダーゼ(Amersham、Piscataway, NJ)を二次抗体として用い、ブロットをSuperSignal West Pico Luminol/Enhancer溶液(Pierce、Rockford, IL)を用いて反応させた。TBS[50mM トリス、150mM NaCl]中の50ngの精製したHis₈タグ付加UNQ733に1μgの精製したMabを加えた後、プロテインA/Gアガロースを加えて、4で終夜インキュベートして、免疫沈降法を行った。免疫沈降物を回収し、TBSにて洗浄し、18%SDS-PAGEに用いた。His₈タグ付加UNQ733を検出するためにブロットをIndia His Probe(1:5000、Pierce)とともにインキュベートして、TBS+0.05%Tween-20にて洗浄して、上記の通りに反応させた。

【0161】

免疫組織化学： 凍結ヒト扁桃腺切片(5μ)を、20のアセトンに5分間固定した後、TBS T(Tween 20含有のトリス-緩衝食塩水)中のOCTを除去した。内在性ペルオキシダーゼ、アビジンおよびビオチンをそれぞれKPLブロッキングバッファ(KPL、37-00-84、Gaithersburg, MD)およびベクターアビジン/ビオチンブロッキングキット(ベクター、SP-2001、Burlingame, CA)を用いて反応を止め、その後TBS Tですすいだ。スライドを、3%BSA/PBS中の10%正常ウマ血清中で30分間インキュベートした。次いで、スライドを、10μg/ml抗UNQ733(クローン3H1)抗体中で室温で60分間インキュベートした。TBS Tでの洗浄の後、スライドを、2.5μg/mlビオチン化ウマ抗マウス二次抗体(ベクター、BA-2001)とともに室温で30分間インキュベートした。以下のTBS T洗浄スライドを、ベクタステインABC Elite試薬(ベクター、PK-6100)とともに室温で30分間インキュベートして、次いでスライドをTBS Tですすぎ、Pierce Metal Enhanced DAB(Pierce, 1856090)にて4分間インキュベートして、水ですすいだ。次いでスライドを、メイヤーヘマトキシリンと対比染色して、脱水し、明視野観察のためにセットしてカバースライドをかけた。

【0162】

フローサイトメトリ：扁桃腺細胞のUNQ733発現の分析のために、新鮮なヒト扁桃腺組織を細かく刻み、50 mg/mlのコラゲナーゼIVおよび50 U/mlのデオキシリボヌクレアーゼI (Sigma-Aldrich、St. Louis, MO, USA)にて消化した。結果として生じる細胞懸濁液を、自動MACS分離器(Miltenyi Biotec、Auburn, CA)上で抗CD19マイクロビーズを用いてB細胞のネガティブセレクションを行った。CD19分画をFcブロック試薬(Miltenyi Biotec)によって、ブロックし、抗CD14-FITC(クローンM5E2、BD Pharmingen、San Diego, CA)および抗CD21-PE(クローンB-ly4、BD Pharmingen)を、FACS洗浄[PBS+0.5%ウシ血清アルブミン]中で周囲温度で30分間染色した。細胞をFACS洗浄にて洗浄し、FACSLyse溶液(BD Pharmingen)にて周囲温度にて20分間、固定した。細胞をFACS洗浄にて洗浄し、FACS Perm2溶液(BD Pharmingen)にて処理した。細胞をFACS洗浄にて洗浄し、10 µg/mlのビオチン化UNQ733特異的Mab12H4とともに周囲温度にて30分間インキュベートした後、SA-APC (BD Pharmingen)にて洗浄およびインキュベートした。細胞は、BD FACSCaliberフローサイトメータにて分析した。FDCはCD14⁺CD21⁺細胞としてゲートし、単球をCD14⁺CD21⁻細胞としてゲートした。

10

リンパ腫細胞株に対するHis₈タグ付加UNQ733結合の分析のために、細胞を、FACS洗浄に希釈した50 µg/ml(4.5 µM)又は20 µg/ml(1.8 µM)のHis₈タグ付加UNQ733とともに周囲温度にて30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、結合したHis₈タグ付加UNQ733を10 µg/mlの抗His₆(Cターム)-FITC(Invitrogen)によって、検出した。あるいは、細胞に結合したHis₈タグ付加UNQ733を10 µg/mlのビオチン化UNQ733特異的Mab12H4によって、検出した後に、SA-PE (BD Pharmingen)を行った。ヒト末梢血B細胞に結合するHis₈タグ付加UNQ733の分析のために、正常な健康ヒトドナーの末梢血を採取した。末梢血単核細胞を、LSMリンパ球分離培地(ICN、Costa Mesa, CA)を用いて単離した。B細胞を抗CD19マイクロビーズおよびMACS分離器(Miltenyi Biotec)を用いて精製した。B細胞を、1 µg/mlの抗CD40(クローン5C3、BD Pharmingen)および10 ng/mlのrIL-4(Preprotech)の存在下および非存在下にて、イスコーブ(Iscove)変更ダルベッコ培養液+10%ウシ胎仔血清中にて、上記のようにフローサイトメトリ分析前に48時間、培養した。B細胞を抗CD19-APC(クローンHI B19、BD Pharmingen)にて染色することによって、ゲートした。

20

30

【0163】

タンパク質発現および配列決定：PGSB細胞に、Fugene6(Roche)を用いてHis₈タグ付加UNQ733を、過渡的に形質移入した。第1日目に培養物に添加した10 µMのデカノイル-Arg-Val-Lys-Arg-クロロメチルケトン(Bachem、King of Prussia, PA)(プロタンパク質転換酵素インヒビター)の存在下または非存在下にて培養した。培養6日後に、上清を回収し、親和性物がNi-NTA (Qiagen、Valencia, CA)により沈殿された。Ni-NTA結合タンパク質を、18%SDS-PAGEに用いて、Procise N-Terminalシーケンサー (ABI、Foster City, CA)上のエドマン分解によって、N末端配列決定のためにPVDFにプロットした。

40

タンパク質結合アッセイ：BJAB細胞を、UNQ733-AP上清の階段希釈又は単一濃度のRelt-AP対照上清とともにインキュベートした。4で1時間のインキュベーションの後、細胞をPBSにて3回洗浄し、96ウェルマイクロプレートへ移した。細胞を50で1時間暖め、内在性アルカリホスファターゼ活性を不活性化した。1-ステップPNPP基質バッファ(Pierce)を加え、暗室にて周囲温度にて30分間反応させた。細胞を遠心分離し、分割量の基質バッファをSpectraMax 250マイクロプレート読み取り機(Molecular Devices、Sunnyvale, CA)にて405 nmの吸光度を分析するために取り除いた。

UNQ733-AP結合の競合阻害のために、固定濃度(0.5x)のUNQ733-AP上清を用いて、His₈タグ付加UNQ733又は溶媒対照[10 mMのクエン酸塩、p

50

H3.0 バッファ]の濃度を増加させて同時にインキュベートした。

【0164】

結果

UNQ733は非ホジキンリンパ腫および過形成扁桃腺において、過剰発現する4800以上のヒト生検試料からのオリゴヌクレオチドに基づくマイクロアレイ発現データを、正常組織と相対的に高いmRNA発現を示した遺伝子について分析した。そのような遺伝子をUNQ733と称し、リンパ系起源の腫瘍において、過剰発現することが明らかとなった(図1)。分析したリンパ系腫瘍の中で、62の非ホジキンリンパ腫のうちの29(46.8%)に有意に過剰発現されることが明らかであった。この分析によって、UNQ733の過剰発現が、組織病理学的に過形成を示す82の非悪性扁桃腺に罹った者の組織のうちの75(91%の)にも観察された。

10

非ホジキンリンパ腫のUNQ733過剰発現の割合をさらに評価するために、我々は、173の非ホジキンリンパ腫組織核を含有する3つのリンパ腫組織マイクロアレイ(TMA)を得た。UNQ733特異的プローブを用いてTMAについてインサイツハイブリダイゼーションを行った。173の個体腫瘍のうちの66(38%の)の悪性細胞において、UNQ733 mRNA発現が検出された。UNQ733の過剰発現は、B細胞リンパ腫(NOS)、広汎性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、悪性リンパ腫(NOS)、悪性T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫および粘膜関連リンパ系組織リンパ腫において、観察された。

20

【0165】

正常組織と腫瘍性ヒト組織についてインサイツハイブリダイゼーションを行った。UNQ733 mRNA発現は、脾臓、リンパ節、扁桃腺およびパイエル板(図3)を含むすべての正常リンパ系組織の胚中心において、観察された。扁桃腺では、胚中心(図4A、4B)および陰窩(図4C、4D)にUNQ733発現が検出された。さらに、漿液の唾液腺にUNQ733発現が観察された(図示せず)。腫瘍性組織では、分析した非ホジキンリンパ腫の38%(3/8)の悪性細胞に発現が観察された(図5及び6)。組換えHis₆タグ付加UNQ733に対するモノクローナル抗体(MAb)を生成し、特徴付けた。ELISAによる組換えUNQ733に対する反応性を用いた9のMAbのパネルを得て、ウェスタンブロットアッセイ、免疫沈降アッセイおよび免疫組織化学アッセイ(IHC)にて特徴付けをし、細胞なしの環境又は細胞結合環境におけるUNQ733への結合を評価した。2つのMAbには、ウェスタンブロットアッセイにて、組み換えUNQ733、10G10および12H4が検出されたことが明らかとなった(図7)。これらの抗体は、ウェスタンブロットにおいて、組換えHis₆タグ付加UNQ733を検出することが可能であった。大部分のモノクローナル抗体は、UNQ733を免疫沈降させることが可能であった(図8)。MAb 3H1は、IHCにより凍結扁桃腺組織において、UNQ733を結合する能力について試験された。観察された染色のパターンは、インサイツハイブリダイゼーションによるUNQ733 mRNAの局在と同一であった。陰窩では強い染色が観察され、胚中心では弱い染色が観察された(図9)。観察される染色のパターンは、濾胞性樹状細胞(FDC)と一致していた。

30

扁桃腺でUNQ733を発現する細胞型の同一性を確認するために、外科的に切除したもものから新鮮な扁桃組織を得て、フローサイトメトリーに用いて、CD14およびCD21発現によって、FDCおよび単球を詳細に描写した。ビオチン化12H4 MAbを用いて、細胞内のUNQ733を検出した。UNQ733タンパク質の発現はFDC細胞群では検出されたが、単球では検出されなかった(図10)。これは免疫組織化学データの所見と一致する。

40

【0166】

UNQ733はプロタンパク質転換酵素によって、プロセッシングされるプロタンパク質転換酵素(PC)は、生物学上不活性な前駆体タンパク質を切断して成熟した活性型にするタンパク質分解酵素のファミリーである。プロテアーゼのこのファミリーのメンバーは、モチーフ(K/R)-X-X(K/R)/を有するアミノ酸配列を認識する。UNQ7

50

33は、推定上のPC切断部位R-E-K-R/S³⁰を含有する。組換えUNQ733-His₆がウェスタンブロットにより分析される場合、2つのタンパク質種が一般的に観察される(図7)。タンパク質のN末端配列決定により2つの種の存在が明らかとなった。配列¹⁸FPVSDQEで始まる第一の配列はシグナル配列切断後の予測される「完全長」タンパク質と一致していた。第二のタンパク質は、UNQ733のPC切断の予測された産物である配列³⁰SISDSDELで始まる。観察された切断がPCの活性によるものであることを確認するために、UNQ733-His₆を、PCインヒビターであるデカノイル-RVKR-クロロメチルケトンの存在下及び非存在下にて発現させた(図11)。やはり複数の種が観察されたが、「完全長」UNQ733のプロタンパク質はPCインヒビター処理上清中において、実質的に増加していた(図12)。これは、UNQ733がPCによって、プロセッシングされることを示唆する。

【0167】

UNQ733はリンパ腫細胞株および一次B細胞と結合する

リンパ腫細胞株に対するUNQ733結合を、フローサイトメトリによって、評価した。ヒトB細胞リンパ腫であるBJAB細胞(図13A)およびヒトT細胞リンパ腫であるジャーカット細胞(図13B)の両方に対するUNQ733-His₆の結合を、FITCコンジュゲート抗His₆検出用抗体(Invitrogen)を用いて検出した。両細胞株について抗体結合が観察され、BJAB細胞はジャーカット細胞より高いUNQ733-His₆の結合を示した。これらの研究を、ヒトB細胞リンパ腫/白血病細胞株のサブセット上のUNQ733の結合を検出する能力についてMAbのパネルを試験するために続けた。3H1および10G10を含むいくつかのMAbは、結合したUNQ733-His₆を検出することができた(図示せず)、12H4は、BJAB細胞、Reh細胞およびダウディ細胞に結合したUNQ733-His₆を検出する際に最もよい信号雑音比を示した。UNQ733-His₆分子により観察される結合の特性を評価するために、UNQ733-ヒト胎盤アルカリホスファターゼ(UNQ733-AP)融合タンパク質を用いて、結合したUNQ733を検出し、UNQ733-His₆を用いて競合物質として機能させた。対照AP融合タンパク質であるRELT-APが結合を示さなかったのに対して、組織培養物上清中のUNQ733-APタンパク質は用量依存的にC1R Bリンパ芽細胞系と結合することが明らかとなった(図15A)。競合アッセイで試験した場合、UNQ733-His₆はC1R細胞へのUNQ733-APの結合を阻害することが観察された(図15B)。これは、Bリンパ腫に対するUNQ733の結合が特異的であることを示唆する。

UNQ733は、二次リンパ系器官の胚中心内の濾胞性樹状細胞に発現される。胚中心がB細胞選別、クラススイッチ組換えおよび体細胞の過剰変異の部位であるので、非腫瘍性B細胞生態内でのUNQ733の役割も確認された。末梢血単核細胞は正常な健康ヒトドナーから入手し、B細胞を精製して、UNQ733結合について分析した(図16)。

複数のヒトドナーから得た「静止」末梢血B細胞がUNQ733を結合することが観察された。それらのPB₂B細胞がCD40および組換えIL-4に特異的なアゴニストMAbによって、初めに刺激されると、UNQ733の結合はドナーに因って2~5倍増加することが明らかとなった(図16)。抗CD40でB細胞を刺激するとUNQ733のレセプターの表面発現が増加するようである。

【図面の簡単な説明】

【0168】

- 【図1】UNQ733 mRNAのGene Log icマイクロアレイ発現データを表す。
- 【図2】組織マイクロアレイに対するインサイトハイブリダイゼーションによって評価された非ホジキンリンパ腫におけるUNQ733 mRNA過剰発現プロファイルを表す。
- 【図3】インサイトハイブリダイゼーションによって評価される、正常なヒト組織におけるUNQ733 mRNA発現プロファイルを表す。
- 【図4】胚中心および陰窩におけるUNQ733 mRNA発現を表す。
- 【図5】腫瘍性組織におけるUNQ733 mRNA発現プロファイルを表す。
- 【図6】非ホジキンリンパ腫の悪性細胞におけるUNQ733 mRNAの細胞局在を表す

10

20

30

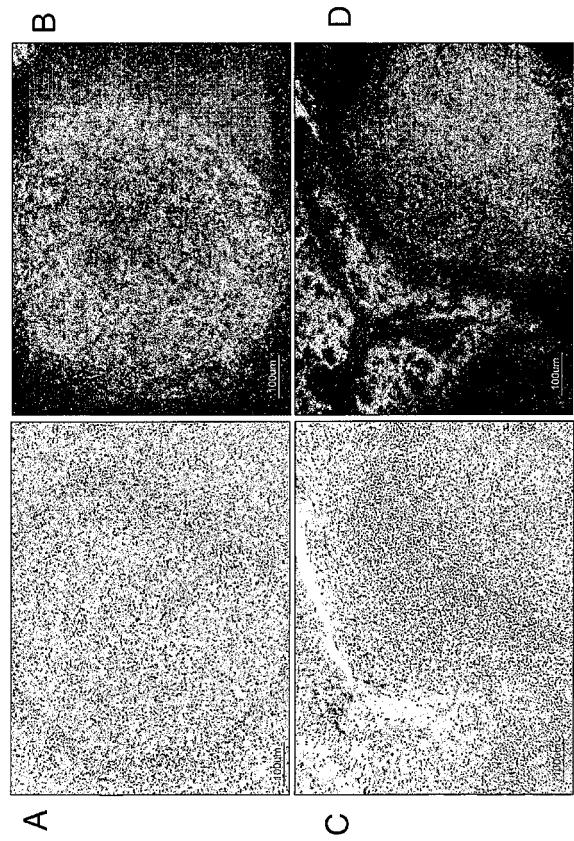
40

50

【 図 3 】

組織	発現	注釈
大動脈	-	
胸部	-	
胆嚢	-	
前立腺	-	
肺	+	胚中心
脾臓	+	胚中心
パイエル板	+	胚中心
リンパ節	+	胚中心
唾液腺	+	漿液細胞
扁桃	+	GCおよび陰窩

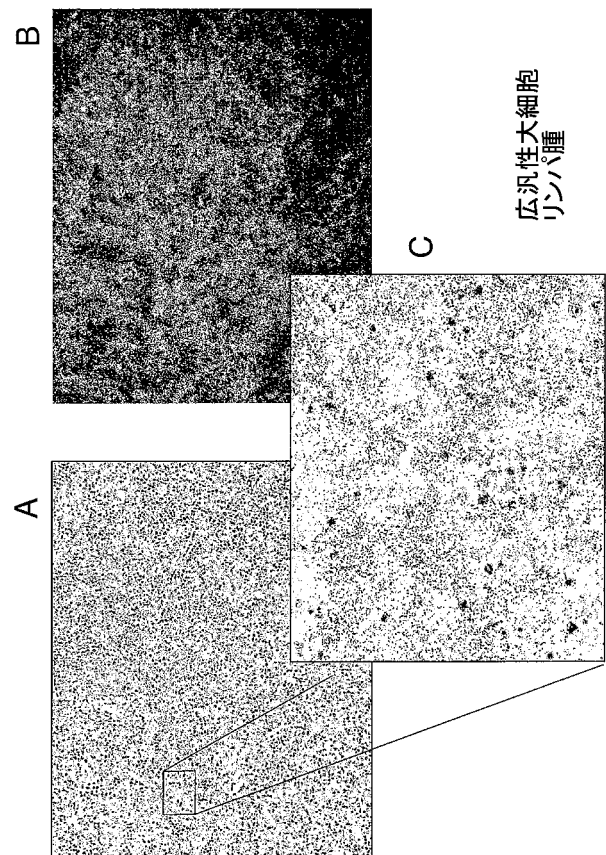
【 図 4 】



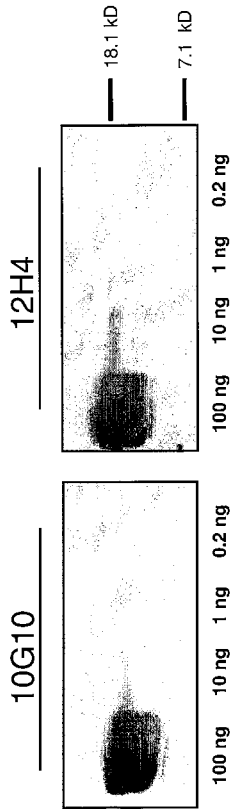
【 図 5 】

組織	陽性数	注釈
軟骨	0/4	
脂肪	0/4	
肝臓	0/4	
大腸	0/4	
唾液腺	1/1 (100%)	漿液線腫
胸部(TMAを含む)	3/64 (5%)	管上皮
	2/64 (3%)	リンパ球浸透物
NHL	3/8 (38%)	悪性細胞陽性

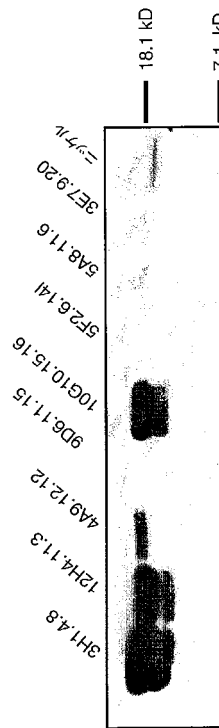
【 図 6 】



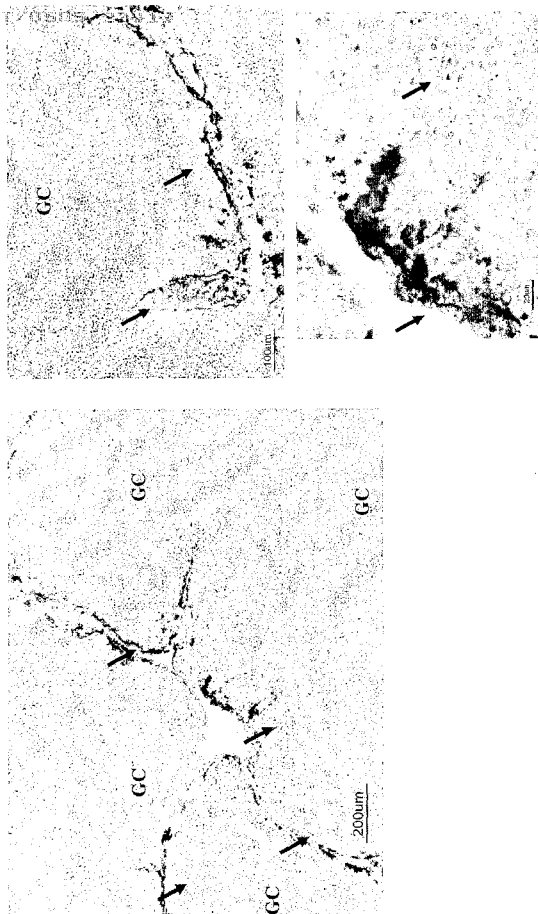
【 図 7 】



【 図 8 】

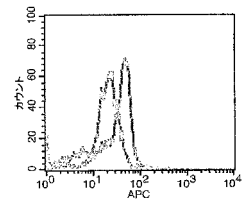
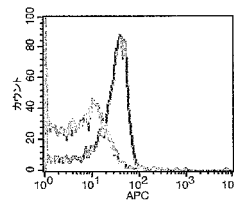


【 図 9 】

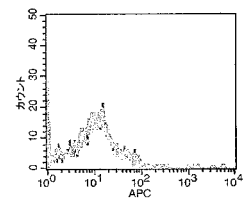
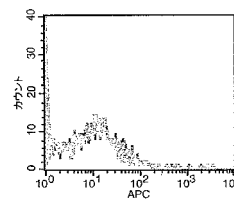


【 図 10 】

FDCs (CD14+CD21+)



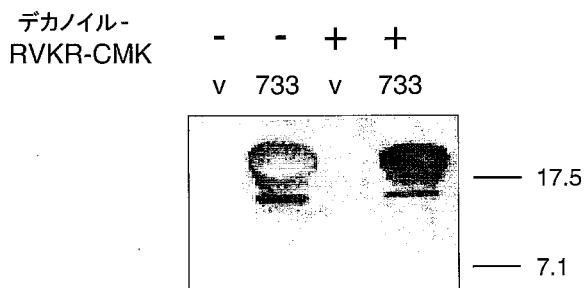
マクロファージ (CD14+CD21-)



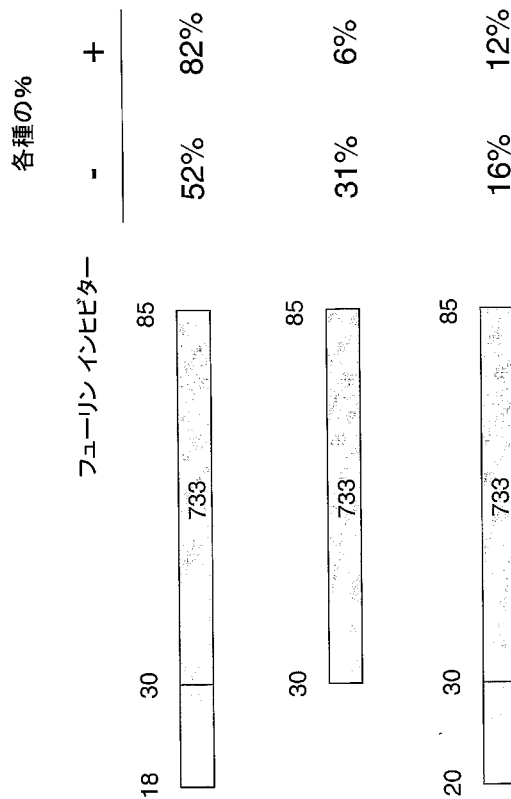
61歳、男性

7歳、女性

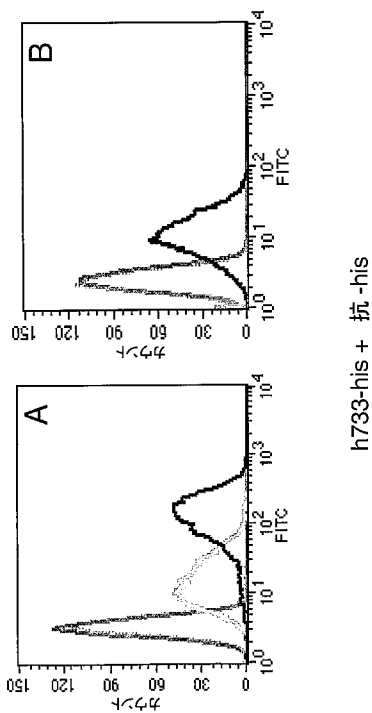
【図 1 1】



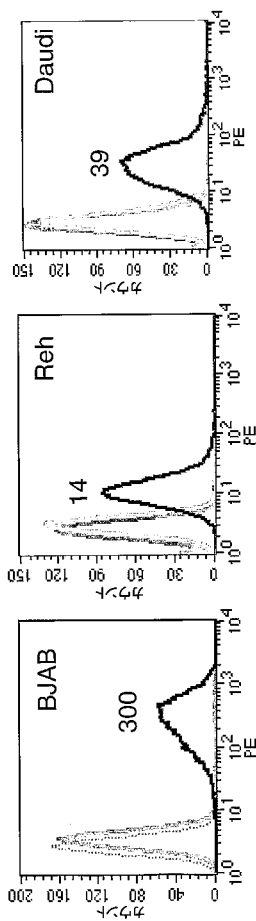
【図 1 2】



【図 1 3】

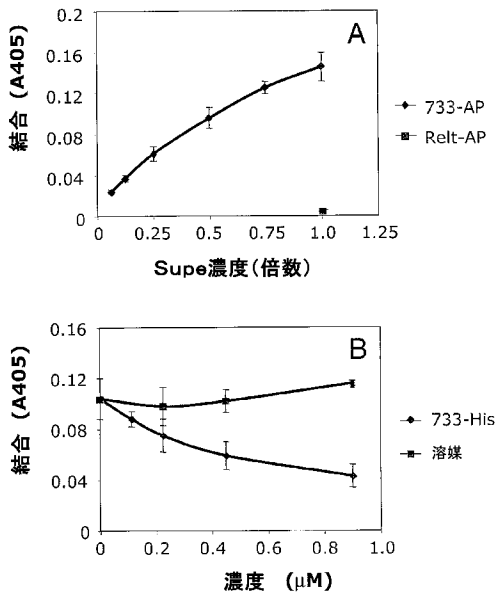


【図 1 4】

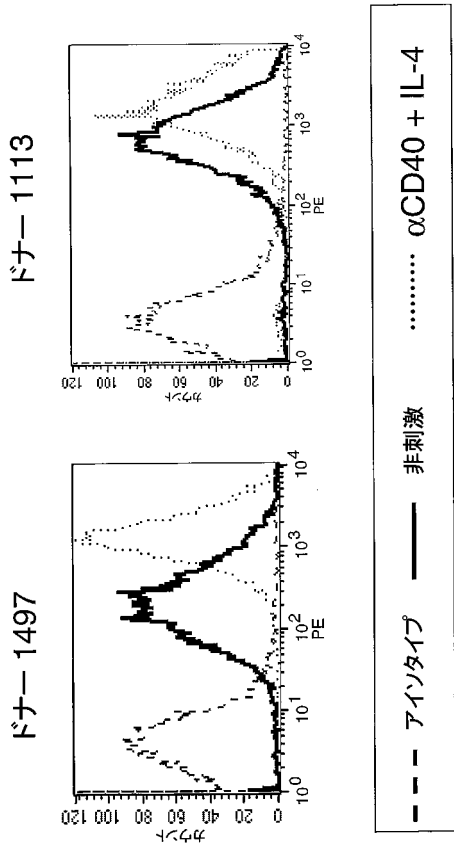


12H4-ビオチン & SA-PE で検出された h733-his

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

TAAACAGCTACAAATTCAGGGCCAGTCCCTGCAATTCCTAATACAGCGTACAGAGAAAGAACTGACTGAACCTTIGAGATGAAGA
 AAGTTCCTCCCTGATCACAGCCATCTGGGAGTGGCTGTGGTTCCTCCAGTCTCTCAAGCCAGNACGAGAAAGAAAGAGTATCACTGAC
 AGCGATGAATAGCTCAGGTTTTTGGTTCCTCCGATPCCATTCGCCACTTCCCAATTCCTCCATTTCCAGATTTCCAGGTT
 TAGACGTAATTTCTTATCCAAATACCTGAAATGCCCCCTCAACTCCCTCCCTAGCGAAATGAAACAGAGGATGATGACAGATAAC
 CTGGTCACTGAAATGAAATGAGCCACTTCTTGAAGAAATCCCTGTTAATAAAGAAAGAAACAAATGTAATTTGAAATAGCACACA
 GCATTCCTAGTCAATATCTTAGTGATCTCTTATAAACAAGAAAGAAAGATTTTGGTTCCTTAATTTCCACA (配列番号 :1)

【 図 1 8 】

MKKVLILLITAILAVAVGFVVSQDQREKRKSISDSDELASGFFVFPYPFRPLPPIPPFRFP
 WRRNFPPIPIPESAPTTPLPSEK (配列番号 :2)

FVVSQDQREKRKSISDSDELASGFFVFPYPFRPLPPIPPFRFPWFRNFPPIPIPESAPTT
 PLPSEK (配列番号 :3)

SISDSDELASGFFVFPYPFRPLPPIPPFRFPWFRNFPPIPIPESAPTTPLPSEK (配列
 番号 :4)

【手続補正書】【提出日】平成19年4月6日(2007.4.6)【手続補正1】【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】

細胞成長を阻害するUNQ733アンタゴニストを含有してなる、非ホジキンリンパ腫細胞の成長を阻害するための薬剤。

【請求項2】

前記細胞が非ホジキンリンパ腫に存在する、請求項1に記載の薬剤。

【請求項3】

前記UNQ733アンタゴニストがUNQ733ポリペプチドに結合する、請求項1に記載の薬剤。

【請求項4】

前記UNQ733アンタゴニストが抗体、オリゴペプチド、無機小分子又は有機小分子である、請求項3に記載の薬剤。

【請求項5】

前記UNQ733アンタゴニストが抗体である、請求項4に記載の薬剤。

【請求項6】

前記抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーマ、又はそれらの子孫によって製造されるものである、請求項5に記載の薬剤。

【請求項7】

前記抗体が、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体または一本鎖抗体である、請求項5に記載の薬剤。

【請求項8】

前記抗体が成長阻害剤または細胞障害性剤とコンジュゲートしている、請求項5に記載の薬剤。

【請求項9】

UNQ733アンタゴニストを含有してなる、非ホジキンリンパ腫を有する哺乳動物の非ホジキンリンパ腫の成長を阻害するための医薬。

【請求項10】

前記UNQ733アンタゴニストが、UNQ733ポリペプチドを発現するおよび/またはUNQ733ポリペプチドに応答する細胞上のUNQ733ポリペプチドに結合する、請求項9に記載の医薬。

【請求項11】

前記UNQ733アンタゴニストが非ホジキンリンパ腫細胞に結合する、請求項10に記載の医薬。

【請求項12】

前記UNQ733アンタゴニストが、UNQ733ポリペプチドを発現するおよび/またはUNQ733ポリペプチドに応答する細胞の成長を阻害する、請求項9に記載の医薬。

【請求項13】

さらに、哺乳動物に化学療法剤が投与される、請求項9に記載の医薬。

【請求項14】

非ホジキンリンパ腫が、B細胞リンパ腫、広汎性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、

小リンパ球性リンパ腫、悪性リンパ腫、悪性T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫又は粘膜関連リンパ組織リンパ腫である、請求項9に記載の医薬。

【請求項15】

有効量のUNQ733アンタゴニストを含有してなる、UNQ733ポリペプチドの発現または活性の亢進に関連する細胞増殖性疾患を治療または予防するための医薬。

【請求項16】

前記細胞増殖性疾患が過形成である、請求項15に記載の医薬。

【請求項17】

前記過形成が、罹患した、非悪性の扁桃腺組織である、請求項16に記載の医薬。

【請求項18】

前記UNQ733アンタゴニストが、UNQ733ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド、無機小分子または有機小分子である、請求項9または15に記載の医薬。

【請求項19】

前記UNQ733アンタゴニストが抗体である、請求項18に記載の医薬。

【請求項20】

前記抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーム、又はそれらの子孫によって製造されるものである、請求項19に記載の医薬。

【請求項21】

前記抗体が、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多特異性抗体または一本鎖抗体である、請求項19に記載の医薬。

【請求項22】

前記抗体が成長阻害剤または細胞障害性剤とコンジュゲートしている、請求項19に記載の医薬。

【請求項23】

非ホジキンリンパ腫の治療用の生物学的活性剤をスクリーニングする方法であって、候補剤を、プロモーターに作用可能に結合させたUNQ733ポリペプチドをコードする統合された導入遺伝子を含むゲノムを持つトランスジェニック哺乳動物に投与し、該導入遺伝子により該哺乳動物を非ホジキンリンパ腫に罹患させ、該哺乳動物の非ホジキンリンパ腫に対する該薬剤の影響を決定する方法。

【請求項24】

前記候補剤が、UNQ733ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチドまたは無機小分子ないしは有機小分子である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

宿主の非ホジキンリンパ腫を治療剤の標的とする方法であって、UNQ733ポリペプチドに結合する分子に結合した形態の該治療剤が宿主に投与されることを含み、宿主のリンパ腫が該薬剤の標的となる方法。

【請求項26】

前記UNQ733ポリペプチドに結合する分子が抗体である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記抗体が、ATCC寄託番号PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033又はPTA-6034のハイブリドーム、又はそれらの子孫によって製造されるものである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

検出アッセイにおいてUNQ733ポリペプチドの検出に好適な、UNQ733ポリペプチドに結合する抗体。

【請求項29】

前記検出アッセイがウェスタンブロット、免疫沈降法または免疫染色法である、請求項 28 に記載の抗体。

【請求項 30】

(a) ATCC 寄託番号 PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033 又は PTA-6034 のハイブリドーマ、又はそれらの子孫によって製造される抗体

(b) ATCC 寄託番号 PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033 又は PTA-6034 のハイブリドーマ、又はそれらの子孫によって製造される抗体と同じ UNQ733 ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、または、

(c) ATCC 寄託番号 PTA-6026、PTA-6027、PTA-6028、PTA-6029、PTA-6030、PTA-6031、PTA-6032、PTA-6033 又は PTA-6034 のハイブリドーマ、又はそれらの子孫によって製造される抗体と競合する抗体

である、UNQ733 ポリペプチドに結合する抗体。

【請求項 31】

前記抗体が成長阻害剤または細胞障害性剤とコンジュゲートしている、請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 32】

抗原結合領域を含有する、請求項 30 に記載の抗体断片。

【請求項 33】

請求項 30 に記載の抗体のヒト化型。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2005/023413
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/24 A61K39/395 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/50 A61P35/00 C07K16/24 G01N33/574 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARSHALL AARON J ET AL: "FDC-SP, a novel secreted protein expressed by follicular dendritic cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 SEP 2002, vol. 169, no. 5, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 2381-2389, XP002372999 ISSN: 0022-1767 figure 2 ---	46-71
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 30 March 2006		Date of mailing of the international search report 11/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/023413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& DATABASE UniProt [Online] 1 October 2002 (2002-10-01), "Follicular dendritic cell secreted peptide precursor (FDC-SP) (FDC secreted protein)." XP002374850 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8NFU4 Database accession no. Q8NFU4 the whole document	46-71
A	PAN ZENGGANG ET AL: "Two newly characterized germinal center B-cell-associated genes, GCET1 and GCET2, have differential expression in normal and neoplastic B cells." THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. JUL 2003, vol. 163, no. 1, July 2003 (2003-07), pages 135-144, XP002373000 ISSN: 0002-9440 the whole document	1-73
A	MARSHALL A J ET AL: "FDC-SP, A NOVEL SECRETED PROTEIN EXPRESSED BY FOLLICULAR DENDRITIC CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 4, 24 April 2002 (2002-04-24), page A721, XP009055455 the whole document	1-73
A	MARSHALL A J: "FOLLICULAR DENDRITIC CELL SECRETED PEPTIDE (FDC-SP) IS A NOVEL CHEMOTACTIC FACTOR SPECIFIC FOR B CELLS ACTIVATED BY T-DEPENDANT SIGNALS" FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. ANNUAL MEETING. ABSTRACTS OF PAPERS, XX, XX, vol. 18, no. 4/5, April 2004 (2004-04), page A1144, ABSTRN077401, XP009055456 the whole document	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/023413**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.: 1-27, 38-45, 72 (all partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-27, 38-45 and 72 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
		A 6 1 K	45/06	
		G 0 1 N	33/53	D

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,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,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ダニエル, ディラン, エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 7, サン フランシスコ, ページ ストリート
 7 4 7

(72)発明者 シェク, テレサ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, サウス ハンボルト ストリ
 ート 5 1 8

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA17 AA20 BA44 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262
 4C085 AA14 AA16 BB01 BB11 BB41 BB42 BB43 CC02 DD62 EE01

专利名称(译)	用于治疗非霍奇金淋巴瘤的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2008505182A	公开(公告)日	2008-02-21
申请号	JP2007520391	申请日	2005-06-30
[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	アシュケナジアヴィジエー ダニエルディランエル シエクテレサ		
发明人	アシュケナジ, アヴィ, ジェー. ダニエル, ディラン, エル. シエク, テレサ		
IPC分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395 A61K38/00 A61K45/06 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57407 C07K16/3061 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N2500/10		
FI分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.E A61K37/02 A61K45/06 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01		
优先权	60/585132 2004-07-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗哺乳动物非霍奇金淋巴瘤的组合物和将该组合物用于相同目的的方法。

有方

