

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-540835

(P2009-540835A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-516706 (P2009-516706)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月20日 (2007. 6. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月23日 (2009. 2. 23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/071688  
 (87) 国際公開番号 W02007/149932  
 (87) 国際公開日 平成19年12月27日 (2007.12.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/805, 589  
 (32) 優先日 平成18年6月22日 (2006. 6. 22)  
 (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 キルヒホファー, ダニエル ケイ.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
 24, ロス アルトス, エス. スプ  
 リンガー ロード 326

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘプシンをターゲティングするための方法と組成物

(57) 【要約】

抗ヘプシンモノクローナル抗体、及び同抗体の使用方法が提供される。

Cell Line	Isotype <sup>1</sup>	Epitope Group	Direct ELISA <sup>2</sup>	FACS (Median Fluorescence)	
				LnCaP-34 <sup>3</sup> +MAb (log/ml)	LnCaP-17 <sup>4</sup> -MAB (log/ml)
3H10.1.2	κ, IgG1	A	[+]	113.4	30.2
2D5.1.9	κ, IgG1	B	[+]	189.4	32.8
1P2.3.1	κ, IgG2b	A	[+]	96.6	10.6
1E7.1.1	κ, IgG1	C	[+]	7.1	4.8
3H1.1.1	κ, IgG2b	A	[+]	112.5	10.6

<sup>1</sup> LnCaP-34: LnCaP co-transfected with luciferase and hepsin  
<sup>2</sup> LnCaP-17: LnCaP overexpressing luciferase with endogenous hepsin  
<sup>3</sup> Inotrip (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA) and mono AB-ID SP kit (Zymed Laboratories, CA USA)  
<sup>4</sup> Human hepsin-His8  
<sup>5</sup> LnCaP-34 control median fluorescence: 6.3  
<sup>6</sup> LnCaP-17 control median fluorescence: 4.5

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、HC - HVR1、HC - HVR2、HC - HVR3、LC - HVR1、LC - HVR2 及び LC - HVR3 からなる群より選択された少なくとも 1 つの高頻度可変領域 (HVR) 配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、単離された抗体。

## 【請求項 2】

アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、重鎖及び / 又は軽鎖可変ドメイン配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、単離された抗体。

10

## 【請求項 3】

アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、HC - HVR1、HC - HVR2、HC - HVR3、LC - HVR1、LC - HVR2 及び LC - HVR3 からなる群より選択された少なくとも 1 つの高頻度可変領域 (HVR) 配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、免疫グロブリンポリペプチド。

20

## 【請求項 4】

アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、重鎖及び / 又は軽鎖可変ドメイン配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、免疫グロブリンポリペプチド。

## 【請求項 5】

ヒトヘプシン上の、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体と同じエピトープに結合する単離された抗体。

30

## 【請求項 6】

ヒトヘプシンへの結合について、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) に、寄託番号 PTA - 7469、PTA - 7470、PTA - 7471、PTA - 7472 又は PTA - 7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体と競合する、単離された抗体。

## 【請求項 7】

抗体の完全長 IgG 形態が、150 nM 以上の EC<sub>50</sub> 結合親和性でヒトヘプシンに特異的に結合する、請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 8】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 120 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

40

## 【請求項 9】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 100 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 75 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 11】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 50 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 12】

天然の、部分的に変性した形態又は変性した形態のヘプシンに特異的に結合する、請求項 1 ないし 11 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 13】

50

可溶性ヘプシン又は細胞に付着したヘプシンに結合する、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

2006年発行のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図4に例証された抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21及び/又はA24）、又は国際公開第2004/033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A～Dに言及されている抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）ではない、請求項 1 ないし 1 3 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 5】

ヒトヘプシンへの結合について、2006年発行のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図4に例証された抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21及び/又はA24）、又は国際公開第2004/033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A～Dに言及されている抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）と競合しない、請求項 1 ないし 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 1 6】

ヘプシン上の、2006年発行のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図4に例証された抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21及び/又はA24）、又は国際公開第2004/033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A～Dに言及されている抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）と同じエピトープに結合しない、請求項 1 ないし 1 5 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 1 7】

アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株の抗体コード配列によってコードされる、ヘプシン抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸配列を含んでなる核酸分子。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 の核酸分子を含んでなる宿主細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載のヘプシン抗体を生成することができる細胞株。

【請求項 2 1】

抗体が生成される条件下で抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載の抗体を生成する方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載の抗体の有効量と、担体とを含んでなる組成物。

【請求項 2 3】

試料中におけるヘプシンの存在を診断する方法であって、試料に請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載の抗体を接触させることを含む方法。

【請求項 2 4】

ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病又は状態の治療方法であって、患者に対し、請求項 1 ないし 1 7 のいずれか一項に記載の抗体の有効量を投与することを含み、抗体が異種性の薬剤に結合する方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 25】  
異種性の薬剤が治療的なものである、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 26】  
異種性の薬剤が標識、細胞障害剤及び / 又は放射性同位元素である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 27】  
患者が哺乳動物の患者である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 28】  
患者がヒトである、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】 10  
疾病が癌である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 30】  
癌が、前立腺癌及び卵巣癌からなる群より選択される、請求項 29 に記載の方法。
- 【請求項 31】  
対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含む方法であって、前記細胞の存在により、対象が、ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病を有していることが示される方法。
- 【請求項 32】 20  
ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の治療に対する、対象の応答性を予測する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、対象が当該治療に応答することが示される方法。
- 【請求項 33】  
ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の治療を受けた対象の、微小残存病変をモニターする方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、微小残存病変の存在が示される方法。
- 【請求項 34】 30  
ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の疾病状態を対象中に検出する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、対象中に当該疾病の疾病状態が示される方法。
- 【請求項 35】  
対象がヘプシン発現の調節不全に関連する障害を発生するという予測を評価する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、対象が当該疾病を発生するという予測が示される方法。
- 【請求項 36】 40  
ヘプシン発現の調節不全に関する障害を対象に診断する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、対象が前記障害を有することが示される方法。
- 【請求項 37】  
ヘプシンに対する結合能を有する、請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗ヘプシン抗体、又はその断片を一つ以上含んでなるアレイ又はタンパク質チップ。
- 【請求項 38】  
請求項 37 に記載のアレイ又はタンパク質チップと、対象から採取した試料中におけるヘプシンの発現レベルが正常な基準試料中のヘプシン発現レベルを上回るかどうかを決定することにより、ヘプシンの調節不全に関連する障害を患者に検出することに、当該アレイ又はタンパク質チップを使用することについての指示書とを備えるキット。 50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条の下に2006年6月22日付けで出願された米国特許仮出願第60/805589号の優先権を主張する。

本発明は、抗ヘプシン抗体に関し、具体的には、診断及びその他ヘプシンのターゲティングのために特に有用な抗ヘプシン抗体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヘプシンは、上皮細胞の表面に発現される2型膜貫通セリンプロテアーゼ(TTSP)である。417アミノ酸タンパク質は、短いN末端細胞質ドメインと、膜貫通ドメインと、C末端プロテアーゼドメインに対して固く閉じている単一のスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインから構成される(参考文献1)。ヘプシンの生理学的機能はよく分かっていない。胚形成の非常に初期の段階に発現するにも関わらず(参考文献2)、ヘプシン欠乏マウスは生存可能で、正常に発達した(参考文献3、4)。ヘプシンは肝臓の再生及び凝固に関連する生理学的機能に必須ではないことが判明した。しかしながら、ヘプシンは、卵巣癌(参考文献5;国際公開第2001/62271号)及び前立腺癌に結び付けられている。複数の遺伝子発現に関する研究により、ヘプシンは、前立腺癌において最も高いレベルで誘導される遺伝子の一つであるとされた(参考文献6~11)。ヘプシンのRNAレベルは正常な前立腺では低く、良性の過形成であるが、前立腺細胞腫の、特に進行段階で顕著に増大することが判明した。モノクローナル抗ヘプシン抗体によるヘプシンタンパク質の染色により、ヘプシンの発現レベルが骨転移部位及び原発腫瘍の後期において高いことが示されており(参考文献12)、これは、高レベルのヘプシンRNAが、高いグリーソン段階及び腫瘍の進行と相関しているという結論と一貫するものである。

前立腺癌におけるヘプシンの役割の実験による証明はKlezovitchらによる最近の研究にみることができ、この研究により、非転移性前立腺癌のマウスモデルにおいて、ヘプシンの過剰発現により原発腫瘍の進行と転移が示されている(参考文献14)。面白いことに、ヘプシンの過剰発現は基底膜の破壊と関連しており(参考文献14)、これはヘプシンの活性が基底膜の成分の劣化と何らかのつながりを有している可能性を示唆するものである。インビトロでは、ヘプシンは、不顕性の増殖因子であるプロ肝細胞増殖因子(pro-HGF)をその活性な二本鎖形態(HGF)に変換することができ、これによりMetレセプターシグナル伝達が誘発される(参考文献15、16;国際公開第2006/014928号)。HGF/Met経路は浸潤性の腫瘍の増殖及び転移に関連付けられているので、ヘプシンの過剰発現が前立腺癌のHGF/Met軸を活性化している可能性がある(参考文献15、16)。ヘプシンはまた、インビトロで他の物質、主に凝固関連タンパク質を切断することが示されている(15、17)。しかしながら、腫瘍形成におけるその役割は明らかになっていない。

## 【0003】

前立腺癌及びその他の癌においてヘプシンが強く発現されることにより、ヘプシンは様々な疾病、特に癌の魅力的な診断マーカーとなる。更に、TTSPファミリーの他のメンバー、例えばマトリプターゼ及びTMPRSS2は細胞表面から削られ、削られたマトリプターゼは人乳中に検出されている(参考文献18)。これらTTSPの構造類似性に基づいて、適切な検出系を用いてヒトの体液中に腫瘍由来のヘプシンを検出することが可能であった。

ヘプシンの発現が、様々な疾病の病因学に関連しており、何らかの役割を果たしていることは明らかである。ヘプシンの発現は疾病の様々な特徴、例えば癌の特定の段階及び悪性の度合いと関連付けられる。癌のような複雑な疾病の臨床的な管理において最も困難な試みの一つは、患者における正確な且つ初期段階での当該疾病の同定である。つまり、明

10

20

30

40

50

らかにヘプシンに結合する複数の抗体が生成されているものの（例えば、Tsujiら、J. Biol. Chem. (1991), 966(25):16948-16953; Torres-Rosadoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U SA (1993), 90:7181-7185; 国際公開第2004/035733号; 同2002/064839号; 同2004/033630号)、インビトロ及びインビボにおけるヘプシンの検出及び/又はターゲティングに有効且つ柔軟な組成物と方法を持つことは、明らかに有益である。ここに開示する本発明は、そのような組成物と方法に関する。

【0004】

特許出願明細書及び公開公報を含め、本明細書に引用する全ての参考文献は、参照によりその全体を本明細書に包含する。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、インビトロ及びインビボにおいて、可溶性及び細胞関連ヘプシタンパク質に対する結合及び/又はターゲティング能を有する新規の抗体を提供する。様々な形態で且つ異なるエピトープでヘプシンに結合するモノクローナル抗ヒトヘプシン抗体のパネルを生成した。これらの抗体は、生物学的サンプルのヘプシンレベルを測定するための高感度検出系における使用を含め、様々な用途を有する。

一態様では、本発明は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の、HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2及びLC-HVR3配列からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5又は全ての高頻度可変性（HVR）配列を含む、単離された免疫グロブリンポリペプチドであって、ヒトヘプシンに特異的に結合する単離された免疫グロブリンポリペプチドを提供する。例えば、一態様では、本発明は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の、HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2及びLC-HVR3配列からなる群より選択される、少なくとも1、2、3、4、5又は全ての高頻度可変性（HVR）配列を含む、単離された抗体であって、ヒトヘプシンに特異的に結合する単離された抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、HC-HVR1、HC-HVR2、及びHC-HVR3からなる群より選択される、1、2、又は全てのHC-HVRと、LC-HVR1、LC-HVR2及びLC-HVR3からなる群より選択される、少なくとも1、2又は全てのLC-HVRとを含む単離された抗体を提供する。一実施形態では、本発明の単離された抗体中のHVR配列は、寄託番号PTA-7469の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体のHVR配列である。一実施形態では、本発明の単離された抗体中のHVR配列は、寄託番号PTA-7470の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体のHVR配列である。一実施形態では、本発明の単離された抗体中のHVR配列は、寄託番号PTA-7471の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体のHVR配列である。一実施形態では、本発明の単離された抗体中のHVR配列は、寄託番号PTA-7472の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体のHVR配列である。一実施形態では、本発明の単離された抗体中のHVR配列は、寄託番号PTA-7473の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体のHVR配列である。

【0006】

一態様では、本発明は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の、重鎖及び/又

10

20

30

40

50

は軽鎖可変ドメインを含む単離された免疫グロブリンポリペプチドであって、ヒトヘプシンに特異的に結合する単離された免疫グロブリンポリペプチドを提供する。例えば、一態様では、本発明は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の、重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む単離された抗体であって、ヒトヘプシンに特異的に結合する単離された抗体を提供する。一実施形態では、単離された抗体は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7469の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、単離された抗体は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7470の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、単離された抗体は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7471の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、単離された抗体は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7472の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、単離された抗体は、アメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託番号PTA-7473の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。

10

一態様では、本発明は、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株の抗体コード化配列によってコードされるモノクローナル抗ヘプシン抗体を提供する。

20

#### 【0007】

一態様では、本発明は、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体と同じヒトヘプシン上のエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体を提供する。一態様では、本発明は、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体とは異なるヒトヘプシン上のエピトープに結合する、単離された抗体を提供する。

30

一態様では、本発明は、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下にアメリカ培養細胞株保存機関（ATCC）に寄託されているハイブリドーマ細胞株によって生成される抗体と、ヒトヘプシンへの結合について競合する単離されたモノクローナル抗体を提供する。

#### 【0008】

一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトヘプシンの細胞外ドメイン配列に位置するエピトープ又は抗原決定基に特異的に結合する。一実施形態では、細胞外ドメイン配列はヒトヘプシンのArg<sup>45</sup>からLeu<sup>417</sup>までを含む。一実施形態では、抗原決定基又はエピトープは、ヘプシンのプロテアーゼドメインに位置する。一実施形態では、本発明の抗体はヘプシンのA鎖に特異的に結合しない。

40

一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトヘプシンに特異的に結合するが、インビボ及び/又はインビトロでヘプシンの酵素活性を実質的に阻害しない。一実施形態では、酵素活性は、ヘプシンのポリペプチド基質の切断を含む。

#### 【0009】

本発明の抗体の一実施形態では、抗体の完全長IgG形態は、約150nM以上の親和性でヒトヘプシンに特異的に結合する。一実施形態では、結合親和性は約120nM以上である。一実施形態では、結合親和性は約100nM以上である。一実施形態では、結合親和性は約75nM以上である。一実施形態では、結合親和性は約50nM以上である。

50

一実施形態では、結合親和性は約 25 nM 以上である。一実施形態では、結合親和性の値は直接的 E L I S A によって得られる（例えば、後述の実施例に記載されるように、直接的 E L I S A で測定した場合  $EC_{50}$  と表わされる）。

本発明の抗体は、任意の数の形態とすることができる。例えば、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であるモノクローナル抗体とすることができる。本発明の抗体は、完全長又はその断片（例えば、抗原結合成分を含む断片）とすることができる。

#### 【0010】

一実施形態では、本発明の抗体は、2006年出版のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁、記載されている抗ヘプシン抗体（例えば、図4に例示されている抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21及び/又はA24）や、或いは国際公開第2004/0033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A-Dにおいて言及される抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）ではない。

一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトヘプシンに対する結合について、2006年出版のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁に記載の抗ヘプシン抗体（例えば、図4に例示されている抗体1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21及び/又はA24）や、国際公開第2004/033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A-Dにおいて言及される抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）と競合しない。

#### 【0011】

一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトヘプシン上の、2006年出版のCancer Research, Volume 66, 3611-3619頁に記載の抗ヘプシン抗体や、或いは国際公開第2004/0033630号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93頁及び図15A-Dにおいて言及される抗体47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1及び/又は72H6）と同じエピトープに結合しない。

#### 【0012】

一態様では、本発明は、本発明の1以上の抗体と担体からなる組成物を提供する。一実施形態では、担体は製薬的に許容される担体である。

一態様では、本発明は、本発明の免疫グロブリンポリペプチド（例えば抗体）をコードする核酸を提供する。

#### 【0013】

一態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

一態様では、本発明は、本発明の核酸又はベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターはいかなる種類のものでよく、例えば発現ベクター等の組み換えベクターである。種々の宿主細胞のうちのいずれを使用してもよい。一実施形態では、宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌である。一実施形態では、宿主細胞は原核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の哺乳動物細胞である。

#### 【0014】

一態様では、本発明は、本発明の抗体を作製する方法を提供する。例えば、本発明は抗ヘプシン抗体（ここでは、その完全長と断片を含むと定義する）の作製方法を提供し、前記方法では、適切な宿主細胞中に、前記抗体をコードする本発明の組換えベクター（又はその断片）を発現させ、前記抗体を回収する。

一態様では、本発明は、容器、及び容器内に収容された組成物から構成される製造品を提供し、この組成物は1以上の本発明の抗体を含む。一実施形態では、組成物は本発明の核酸を含む。一実施形態では、本発明の免疫グロブリンポリペプチド（例えば抗体）を含む組成物は、更に担体を含み、この担体は、一部の実施形態において製薬的に許容可能である。一実施形態では、本発明の製造品は、対象に対する組成物（例えば抗体）の投与に関する指示書を含む。

#### 【0015】

10

20

30

40

50

一態様では、本発明は、1以上の本発明の抗体を含む組成物を収容する第1の容器、及びバッファーを含む第2の容器を備えるキットを提供する。一実施形態では、バッファーは製薬的に許容可能なものである。一実施形態では、抗体を含む組成物は、更に担体を含み、この担体は、一部の実施形態において製薬的に許容可能である。一実施形態では、キットは、試料中のヘプシンの検出及び/又は測定への組成物(例えば抗体)の使用に関する指示書を更に備える。一実施形態では、キットは、対象に対する組成物(例えば抗体)の投与に関する指示書を更に備える。

一態様では、本発明の抗体は、細胞障害剤等の毒素に連結する。これらの分子は、化学療法剤、放射線治療又はステロイド等の添加剤/亢進剤と組み合わせて製剤化又は投与することができる。

#### 【0016】

一態様では、本発明は、試料中におけるペプシンの存在を検出する方法を提供し、本方法では、試料に本発明の抗体を接触させる。一実施形態では、抗体の試料に対する結合によって試料中におけるペプシンの存在が示される。

一態様では、本発明は疾病の診断方法を提供し、本方法では、試料に本発明の抗体を接触させることにより組織細胞からなる試験試料中におけるペプシンのレベルを決定し、ペプシンの抗体への結合により、試料中におけるペプシンの存在及び/又は量が示される。

#### 【0017】

別の態様では、本発明は個体に疾病(例えば、ペプシンの発現の調節不全に関連する疾病)の危険があるかどうかを決定する方法を提供し、本方法では、試験試料に本発明の抗体を接触させることにより組織細胞からなる試験試料中におけるペプシンのレベルを決定し、試験試料と同じ細胞の正常組織からなるコントロール試料と比較して、試験試料中におけるペプシンのレベルの方が高い場合に、個体に疾病の危険があることが示される。

本発明の方法の一実施形態では、ペプシンのレベルを、試験試料中において抗体と結合するペプシンの量によって示されるペプシンポリペプチドの量に基づいて決定する。本方法に使用される抗体は、随意で検出可能に標識するか、固体の支持体に付着させる等することができる。

#### 【0018】

一態様では、本発明は、本発明の抗体を、体液、例えば血液中に存在するペプシンに結合させる方法を提供する。

また別の態様では、本発明は、本発明の抗体を、ペプシンを発現する細胞に結合させる方法を目的とし、本方法は、前記細胞と前記抗体とを、ペプシンへの抗体の結合に適した条件下で接触させて、それらの結合を可能にする。一実施形態では、前記抗体は、ペプシンとそのリガンドとの相互作用を阻害しない。

#### 【0019】

一態様では、本発明は、宿主細胞のペプシン関連組織に薬剤(例えば、診断薬又は治療薬)をターゲティングする方法を提供し、本方法では、宿主に対し、本発明の抗体に結合した形態の前記薬剤を投与することにより、薬剤を宿主中のペプシン関連組織にターゲティングする。一実施形態では、ペプシンに結合する抗体は、細胞上に位置するペプシンに対し(インビトロ又はインビボで)、例えばペプシンが細胞の表面に位置する場合、特異的に結合することができる。

一態様では、本発明は、対象が、正常な基準試料中におけるペプシンの発現レベルより高いレベルでペプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定する方法を提供し、本方法では、前記細胞の存在によって、対象がペプシンの調節不全(例えば過剰発現)に関連する障害を有することが示される。

#### 【0020】

一態様では、本発明は、ペプシンの調節不全(例えば過剰発現)に関連する障害に対する治療法への、対象の応答性を予測する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるペプシンの発現レベルより高いレベルでペプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の存在によって、対象が当該治療法に応答することが示さ

10

20

30

40

50

れる。

一態様では、本発明は、ヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する疾病の治療を受けた対象の、微小残存病変の存在をモニターする方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出により、前記微小残存病変の存在が示される。

【0021】

一態様では、本発明は、対象に、ヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する疾病状態を検出する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出により、対象に前記疾病状態の存在が示される。

一態様では、本発明は、ヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する障害が患者に発生しているという素因を評価する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出により、対象に前記障害が発生しているという素因が示される。

【0022】

一態様では、本発明は、対象におけるヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する障害の診断方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出によって、対象が前記障害を有することが示される。

一態様では、本発明は、対象におけるヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する疾病の初期と後期（例えば、悪性の度合い、初期又は進行期等）を区別する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出によって、対象が疾病の後期にあることが示される。

【0023】

一態様では、本発明は、対象におけるヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する疾病の非侵襲期と侵襲期を区別する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出によって、対象が疾病の侵襲期にあることが示される。

一態様では、本発明は、対象におけるヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する疾病の非転移期と転移期を区別する方法を提供し、前記方法では、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定し、前記細胞の検出により、対象が疾病の転移期にあることが示される。

【0024】

ヘプシンの発現を試験する方法のステップは、免疫組織化学、ELISA及びプロテイングアッセイを含む種々のアッセイ形式で行うことができる。場合によっては、組織又は細胞試料は、疾病組織又は細胞を含む。

本発明の方法は、必要に応じて、適切な臨床的介入段階の決定に有用な情報を提供する。従って、本発明の方法の一実施形態は、ヘプシンの発現の評価結果に基づいた臨床的介入ステップを更に含む。例えば、適切な介入には、予防及び治療ステップ、又は本発明の方法により取得されたヘプシン発現情報に基づく当時の予防又は治療ステップの修正を含むことができる。

【0025】

本発明の方法には更に、哺乳動物におけるヘプシンの調節不全（例えば過剰発現）に関連する癌等の疾病の治療方法が含まれ、本方法は、哺乳動物から組織又は細胞試料を採取するステップ、ヘプシンの発現（例えば発現の量）について組織又は細胞を試験するステップ、及び前記組織又は細胞試料がヘプシンを発現すること（例えば、基準（コントロー

10

20

30

40

50

ル) 試料) より大きな量でヘプシンが発現されること) が決定されたら、前記哺乳動物に有効量の治療薬を投与するステップを含む。場合によっては、本方法では、有効量のターゲティングされた治療薬 (例えば、ヘプシン及び/又はそれに対応するリガンド及び/又は基質に結合する及び/又はそれらの活性を遮断する抗体)、及び第2の治療薬 (例えば細胞障害剤) を前記哺乳動物に投与する。

当業者には明らかであるように、本発明のあらゆる方法において、ヘプシンの発現の増大が検出されることは、疾病の特徴 (例えば、疾病の存在、進行段階又は程度) を肯定的に示し、ヘプシンの発現の増大が検出されないことも、疾病を繰り返し特徴付けることにより参考材料となる。

#### 【0026】

一態様では、本発明は、ヘプシンに対する特異的結合能を有する1以上の抗体 (例えば本発明の抗体) を含むアレイ/プローブセットを提供する。

一態様では、本発明は、本発明の組成物と、ヘプシンの発現レベルが、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いかどうかを決定することにより、当該組成物を、ヘプシンの調節不全 (例えば過剰発現) に関連する障害の検出に使用することについての指示書とを備えるキットを提供する。一実施形態では、本発明の組成物は、ヘプシンに対する特異的結合能を有する1以上の抗体 (例えば本発明の抗体) を含むアレイ/プローブセットである。一実施形態では、本発明の組成物は、ヘプシンを特異的に検出する抗体を含む。一実施形態では、本発明の組成物は少なくともヘプシンの一部に特異的に結合する抗体を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1】抗ヘプシン抗体の特徴を示す。

【図2】HAI-2によるヘプシン及びuPAの阻害の $K_i^{app}$ 値を示す。

【図3】ELISAに結合するヘプシンを示す。可溶性のヘプシンでコートしたマイクロタイタプレートに抗体を添加した。結合した抗体を西洋わさびペルオキシダーゼに抱合した抗マウスIgGで検出した後で、BioFX TMB基質を添加した。

【図4】競合結合ELISAによるエピトープの決定。可溶性のヘプシンでコートしたマイクロタイタプレートに、ビオチン標識した抗体と、モル濃度過剰の標識しない抗体とを添加した。西洋わさびペルオキシダーゼに抱合したストレプトアビジンにより結合したビオチン標識抗体を検出した後で、BioFX TMB基質を添加した。

【図5】LnCaP細胞上のヘプシンに結合する抗体3H10.1.2のヒストグラムを示す。LnCaP-34細胞は形質移入されたヘプシンと内在性ヘプシンを発現し、一方LnCap-17細胞は内在性ヘプシンのみを発現した。細胞懸濁液を、3H10.1.2を用いてインキュベートし、FACSscan上でPE-抱合F(ab')<sub>2</sub>抗マウスIgGにより表面結合抗体を検出した。

【図6】発色基質アッセイを示す。可溶性ヘプシン(0.25nM)を用いて30分間に亘り500nMの抗体をインキュベートした。そこでパラ-ニトロアニリド基質S2366に対するヘプシン酵素活性を測定し、活性割合で表わした( $V_i/V_0$ )。ヘプシン阻害剤KD1(50nM)をポジティブコントロールとして使用した。

【図7】Pro-uPA活性アッセイを示す。0.5nMのヘプシンを用いて抗体(710nM)を30分に亘ってインキュベートし、pro-uPA(100nM)を添加して反応を開始させた。複数の時点で一定分量を除去し、uPA基質S2444を用いてアッセイの第2段階において形成されたuPAの濃度を決定した。勾配に基づいてuPA形成率(表1)を計算した。ヘプシン阻害剤KD1(71nM)をポジティブコントロールとして使用した。

【図8】モノクローナル抗体を用いた可溶性組換えヘプシンの免疫プロットィングを示す。還元条件下において、SDS-PAGEによりヘプシンを分析し、ニトロセルロース膜上に移した後、抗ヘプシンモノクローナル抗体を用いて検出した。ヘプシンB鎖(プロテアーゼドメイン)の位置及び分子量の基準( $M_r \times 10^3$ )を示す。

10

20

30

40

50

【図 9】天然ヒトヘブシンのアミノ酸配列の一実施形態を示す。

【図 10 A】天然ヒトヘブシンのアミノ酸配列の別の実施形態を示す。

【図 10 B】天然ヒトヘブシンのアミノ酸配列の別の実施形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

#### 典型的技術

本発明の実施は、特に明記しない限り、当業者の技術範囲内の分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を使用して行う。このような技術は、例えば以下のような文献に完全に明記されている。「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第2版(Sambrookら, 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait, 編, 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, 編, 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら, 編, 1987、定期的更新); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullisら, 編, 1994); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988); 「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas 等, 2001)。

10

【0029】

#### 定義

本明細書にて用いる「ヘブシン」なる用語は、天然配列のポリペプチド、天然配列のポリペプチドのポリペプチド変異体及びその断片、及び野生型ヘブシンと類似の様式でプロ HGF を切断することができるポリペプチド変異体(本明細書中でさらに定義される)を包含する。本明細書中で記載のヘブシンは、ヒト組織種類ないしは他の供給源などの様々な供給源から単離するか、組み換え法ないしは合成法によって調整されたものでもよい。また、「ヘブシン」、「ヘブシンポリペプチド」、「ヘブシン酵素」及び「ヘブシンタンパク質」なる用語は、本明細書中で記載のようなヘブシンポリペプチドの変異体を含む。

20

「天然配列ヘブシンポリペプチド」には、天然由来のヘブシン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、天然配列ヘブシンポリペプチドは、配列番号1(図9参照)のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、天然配列ヘブシンポリペプチドは、配列番号2(図10参照)のアミノ酸配列を含む。このような天然配列ヘブシンポリペプチドは、天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。「天然配列ヘブシンポリペプチド」という用語には、特に、特定のヘブシンポリペプチドの天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)、天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天然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。

30

【0030】

「ヘブシンポリペプチド変異体」又はその変異体とは、ヘブシンポリペプチド、一般的には、ここに開示するような天然配列のヘブシン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ヘブシンポリペプチドを意味する。このようなヘブシンポリペプチド変異体には、例えば、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ヘブシンポリペプチドが含まれる。通常、ヘブシンポリペプチド変異体は、ここに開示する天然配列ヘブシン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、ヘブシン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、5

40

50

70、580、590、600アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、ヘブシン変異体ポリペプチドは、天然ヘブシン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、あるいは天然のヘブシン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。

#### 【0031】

ペプチド又はポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のペプチド又はポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウ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ンメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、米国特許第6828146号に記載のような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。

10

#### 【0032】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療的な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。一実施態様では、タンパク質は、(1)例えばローリー法で測定した場合95%を超える抗体、一部の実施態様では99重量%を超えるまで、(2)例えば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ほど、あるいは、(3)例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

20

30

#### 【0033】

本明細書で使用する「抗ヘブシン抗体」という用語は、ヘブシンに対する結合能を有する抗体を指す。

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」、「等価な」、又は「実質的に等価な」という句は、当業者が2つの数値(例えば、分子に関連するもの、及び参照/比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値、抗ウイルス効果等)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が有意に類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較分子の値の好ましくは約50%以下、好ましくは約40%以下、好ましくは約30%以下、好ましくは約20%以下、好ましくは約10%以下である。

40

#### 【0034】

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が2つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照/比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値又はIC<sub>50</sub>値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、2つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較分子の値の、好ましくは約10%より大きく、好ましくは約20%より大きく、好ましくは約30%より大きく、好ましくは約40%より大きく、好ましくは約50%より大きい。

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しな

50

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

#### 【0035】

一実施態様では、本発明の「 $K_d$ 」又は「 $K_d$ 値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の( $^{125}I$ )-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような(Chen, 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、所望の抗体のFab型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(RIA)で測定される。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を $5 \mu g/ml$ の捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)を含む $50 mM$ 炭酸ナトリウム( $pH 9.6$ )にて一晚コートして、その後 $2\%$ (w/v)のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温(およそ $23^\circ C$ )で $2 \sim 5$ 時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、 $100 pM$ 又は $26 pM$ の $[^{125}I]$ 抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。ついで所望のFabを一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば $65$ 時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば $1$ 時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを $0.1\%$ のTween 20を含むPBSにて $8$ 回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150 \mu l$ /ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 計測器(Packard)にて $10$ 分間計測する。最大結合の $20\%$ か又はそれ以下濃度のFabを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、 $\sim 10$ 反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて $25^\circ C$ のBIAcore<sup>TM</sup>-2000又はBIAcore<sup>TM</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行って $K_d$ 又は $K_d$ 値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を $10 mM$ 酢酸ナトリウム( $pH 4.8$ )で $5 \mu g/ml$ ( $\sim 0.2 \mu M$ )に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ $10$ になるように $5 \mu l$ /分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために $1 M$ のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、 $2$ 倍の段階希釈したFab( $0.78 nM$ から $500 nM$ )を $25^\circ C$ 、およそ $25 \mu l$ /分の流速で $0.05\%$  Tween 20 (PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $K_{on}$ )と解離速度( $K_{off}$ )を算出した。平衡解離定数( $K_d$ )を $K_{off}/K_{on}$ 比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかしながら、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS( $pH 7.2$ )、 $25^\circ C$ の、 $20 nM$ の抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起 =  $295 nm$ ; 放出 =  $340 nm$ 、帯域通過 =  $16 nm$ )における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

#### 【0036】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」は、

10

20

30

40

50

~ 10 反応単位 (R U) の固定した抗原 C M 5 チップを用いて 25 の BIAcore™-2000 又は BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (E D C) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (N H S) で活性化した。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (p H 4 . 8) で 5 µ g / m l (~ 0 . 2 µ M) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (R U) がおよそ 10 になるように 5 µ l / 分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した F a b (0 . 78 n M から 500 n M) を 25 、およそ 25 µ l / 分の流速で 0 . 05 % T w e e n 20 (P B S T) を含む P B S に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 ( $K_{on}$ ) と解離速度 ( $K_{off}$ ) を算出した。平衡解離定数 ( $K_d$ ) を  $K_{off} / K_{on}$  比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881 を参照。しかし、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が  $10^6 M^{-1} S^{-1}$  を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、P B S (p H 7 . 2)、25 の、20 n M の抗抗原抗体 (F a b 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm ; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。本発明の「 $K_d$ 」又は「 $K_d$  値」は、一実施態様では、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の ( $^{125}I$ )-標識抗原にて F a b を均衡化して、抗 F a b 抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対する F a b の溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような (Chen, 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、所望の抗体の F a b 型 (バージョン) とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ (R I A) で測定される。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート (Dynex) を 5 µ g / m l の捕獲抗 F a b 抗体 (Cappel Labs) を含む 50 mM 炭酸ナトリウム (p H 9 . 6) にて一晚コートして、その後 2 % (w/v) のウシ血清アルブミンを含む P B S にて室温 (およそ 23 ) で 2 ~ 5 時間、ブロックする。非吸着プレート (Nunc#269620) に、100 p M 又は 26 p M の [ $^{125}I$ ] 抗原を段階希釈した所望の F a b と混合する (例えば、Presta 等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599 の抗 V E G F 抗体、F a b - 12 の評価と一致する)。ついで所望の F a b を一晚インキュベートする ; しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間 (例えば 65 時間) かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で (例えば 1 時間) インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを 0 . 1 % の T w e e n 20 を含む P B S にて 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µ l / ウェルの閃光物質 (MicroScint-20; Packard) を加え、プレートを Topcount 計測器 (Packard) にて 10 分間計測する。最大結合の 20 % か又はそれ以下濃度の F a b を選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、~ 10 反応単位 (R U) の固定した抗原 C M 5 チップを用いて 25 の BIAcore™-2000 又は BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) にて表面プラズモン共鳴アッセイを行って  $K_d$  又は  $K_d$  値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (E D C) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (N H S) で活性化した。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (p H 4 . 8) で 5 µ g / m l (~ 0 . 2 µ M) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (R U) がおよそ 10 になるように 5 µ l / 分の流速で注入した。反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した F a b (0 . 78 n M から 500 n M) を 25 、およそ 25 µ l / 分の流速

で 0.05% Tween 20 (PBST) を含む PBS に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 ( $K_{on}$ ) と解離速度 ( $K_{off}$ ) を算出した。平衡解離定数 ( $K_d$ ) を  $K_{off} / K_{on}$  比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881 を参照。しかしながら、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS (pH 7.2)、25 の、20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm ; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

10

#### 【0037】

一実施態様では、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」は、 $\sim 10$  反応単位 (RU) の固定した抗原 CM5 チップを用いて 25 の BIAcore<sup>TM</sup> M-2000 又は BIAcore<sup>TM</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化した。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) で  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\sim 0.2 \mu\text{M}$ ) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (RU) がおよそ 10 になるように  $5 \mu\text{L}/\text{分}$  の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した Fab ( $0.78 \text{ nM}$  から  $500 \text{ nM}$ ) を 25、およそ  $25 \mu\text{L}/\text{分}$  の流速で 0.05% Tween 20 (PBST) を含む PBS に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 ( $K_{on}$ ) と解離速度 ( $K_{off}$ ) を算出した。平衡解離定数 ( $K_d$ ) を  $K_{off} / K_{on}$  比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881 を参照。しかし、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS (pH 7.2)、25 の、20 nM の抗抗原

20

30

抗体 (Fab 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm ; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。

#### 【0038】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的な DNA セグメントが結合されうる円形の二重鎖 DNA ループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的な DNA セグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる (例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター (例えば、非エピソード哺乳動物ベクター) は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」 (又は単に「組換えベクター」) と呼ぶ。一般に、組換え DNA 技術で有用な発現ベ

40

50

クターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0039】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。

10

【0040】

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び/又は親和成熟したものであってよい。

20

【0041】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等、Cellular and Mol. Immunology, 第4版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と1以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

30

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0042】

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、好ましくはその機能のほとんどないしはすべてを保持することが好ましい。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

40

【0043】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて、基本的に同一のアミノ酸配列を有する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる

50

決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対するものである。

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第4816567号; 及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

#### 【0044】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、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、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)から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。例として、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、もしくは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。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に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対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321:522-525(1986); Riechmann等, Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと: Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle及びGross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

#### 【0045】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。「HVR」又は「HV」の前の「HC」及び「LC」という文字は、それぞれ重鎖及び軽鎖のHVR又はHVを指す。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、カバットCDRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

カバットループ	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32
	(カバット番号付け)		H30-H35B
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
	(Chothia番号付け)		H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55
			H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

## 【 0 0 4 6 】

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

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。

## 【 0 0 4 7 】

「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のHV Rにおいて一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。CD R及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, *Proc Nat Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier等, *Gene*, 169:147-155(1995); Yelton等, *J. Immunol.*155:1994-2004(1995); Jackson等, *J. Immunol.*154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等, *J. Mol. Biol.*226:889-896(1992)に記載されている。

「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。好ましい阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。

本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

## 【 0 0 4 8 】

「疾患」とは、治療が有益である任意の状態である。これには、慢性及び急性の疾患、又は対象疾患に哺乳動物がかかりやすい病的状態を含む疾病が含まれる。ここで治療される疾患の非限定的例には、癌及びその他の細胞増殖不全に関連する疾患が含まれる。

「細胞増殖不全」及び「増殖不全」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態では、細胞増殖不全は癌である。

## 【 0 0 4 9 】

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性的にかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」「癌性」「細胞増殖性疾患」「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸管癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓性癌、並びに様々な頭頸部の癌が含まれる。

## 【 0 0 5 0 】

ここで使用される「治療」とは、治療される個体又は細胞の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を意味し、予防のため、又は臨床病理経過中に実施することができる。治療の所望する効果には、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和、疾病の任意の直

10

20

30

40

50

接的又は間接的な病理学的結果の減少、炎症及び／又は組織／器官の損傷の防止又は減少、疾病の進行速度の低減、病状の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾病又は疾患の進行を遅延化させるために使用される。

「有効量」とは、所望される治療的又は予防的結果を達成するのに必要な期間、必要な用量での有効量を意味する。

#### 【0051】

本発明の物質／分子の「治療的有效量」は、病状、年齢、性別、個体の体重、及び個体に所望する反応を引き出すための物質／分子の能力等の要因に応じて変わり得る。また、治療的有效量とは、物質／分子の任意の毒性又は有害な影響を、治療的に有益な効果が上回る量である。「予防的有效量」は、所望する予防的結果を達成するのに必要な期間、用量で有効な量を意味する。必ずではないが、典型的には、予防的用量は、疾病の前又は初期の段階に患者に使用されるために、予防的有效量は治療的有效量よりも少ない。

ここで使用される「細胞障害剤」なる用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し、及び／又は細胞破壊をもたらす物質を意味する。

#### 【0052】

本明細書中で用いる「診断」なる用語は、分子の又は病理学的状態の同定、例えば細胞増殖不全（例えば癌）の同定を指す。本明細書中で用いる「予後」なる用語は、例えば、疾患の再発、再燃、及び薬剤耐性を含む疾患が原因となる疾患症状の可能性の予測を意味する。本明細書中で用いる「予測」なる用語は、患者が薬剤又は一連の薬剤に対して有利又は不利に反応する可能性を意味する。一実施態様では、予測はその反応の程度に関する。一実施態様では、予測は、例えば特定の治療的薬剤による治療、及び疾患再発のない一定期間の後に患者が生存しているか改善しているかどうか、及び／又はその可能性に関する。本発明の予測方法を用いて任意の特定の患者のために最も好適な治療様式を選択することによって、治療決定を臨床的に行うことができる。本発明の予測方法は、患者が、治療投薬計画、例えば特定の治療剤や組み合わせの投与、外科的介入、ステロイド治療などを含む特定の治療投薬計画に有利に反応するかどうか、又は治療投薬計画の後に患者が長期に生存しているかどうかを予測する際の有用なツールである。

「患者反応」は、限定するものではないが以下のものを含む患者に利益を示す任意のエンドポイントを使用して評価できる。(1) 緩徐化及び完全な停止を含む、ある程度の疾患進行の阻害、(2) 疾患発症及び／又は症状の数の減少、(3) 損傷サイズの減少、(4) 近接する末梢器官及び／又は組織への疾患細胞浸潤の阻害(すなわち減少、緩徐化又は完全な停止)、(5) 疾患の拡がりの阻害(すなわち減少、緩徐化又は完全な停止)、(6) 必ずではないが病変の退行又は消失が生じうる際増増殖、浸潤又は転移の低減、(7) 疾患と関係する一又は複数の症状の、ある程度の軽減、(8) 治療後の疾患がない期間の増加、及び／又は(9) 治療後の特定の時点での死亡率の減少。

#### 【0053】

本明細書中で用いる「試料」なる用語は、例えば理学的、生化学的、化学的及び／又は生理学的特徴に基づいて特性を示す又は同定される、細胞実体及び／又は他の分子実体を含有する対象とする被検体から得られる、又は対象とする被検体由来の組成物を指す。例えば、「疾患試料」なる表現及びこの変形は、特徴付けられている細胞実体及び／又は分子実体を含むことが予測される、又はそうであることが知られている対象の被検体から得た任意の試料を指す。

「組織又は細胞の試料」は、被検体又は患者の組織から採取された同種の細胞の集まりを意味する。組織又は細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結された及び／又は保存されていた臓器や組織の試料又は生検又は吸引による固形組織；血液又はいずれかの血液成分；大脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液などの体液；被検体の妊娠期又は発生期の任意の時期の細胞であってもよい。また、組織試料は原発性又は培養した細胞又は細胞株であってもよい。場合によっては、組織又は細胞の試料は罹患組織／臓器から得られる。組織試料は、防腐剤、抗凝血物質、バッファー、固定液、栄養分、抗生物質など天然の組織にはもとも

10

20

30

40

50

と混在していない化合物を含んでもよい。

【0054】

「ハウスキーピング遺伝子」なる用語は、活性が細胞機能の維持に必須であるタンパク質をコードする一群の遺伝子を指す。これらの遺伝子は一般的に、すべての細胞型において同じように発現される。ハウスキーピング遺伝子には、限定するものではないが、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、Cyp1、アルブミン、アクチン(例えば -アクチン)、チューブリン、シクロフィリン、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HRPT)、L32、28Sおよび18Sが含まれる。

本明細書中の組織試料の「切断部分(切片)」とは、組織試料の一部又は一片、例えば組織試料から切り出した組織又は細胞の一薄片を意味する。本発明が、組織試料の同じ切断部分が形態学的及び分子的レベルで分析されるか、又はタンパク質及び核酸の両方に関して分析される方法を含む場合に、組織試料の複数の切断部分が採取され、本発明に係る分析に供されてもよいと理解される。

10

【0055】

「相関」又は「相関する」は、任意の方法で、第一の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果を、第二の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果と比較することを意味する。例えば、第二のプロトコルを行う際に第一の分析又はプロトコルの結果を用いてもよいし、及び/又は第一の分析又はプロトコルの結果を用いて、第二の分析又はプロトコルを行うかどうかを決定してもよい。タンパク質結合分析又はプロトコルの実施態様に関し、タンパク質結合分析又はプロトコルの結果を用いて、特定の治療投薬計画を実行するかどうかを決定してもよい。

20

本明細書中で用いられる「標識」なる用語は、抗体などの試薬に直接的又は間接的にコンジュゲートないしは融合され、コンジュゲートないしは融合した試薬の検出を容易にする化合物又は組成物を指す。標識自体が検出可能なもの(例えば放射性標識又は蛍光性標識)であってもよく、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物ないしは組成物の化学的変化を触媒するものであってもよい。

【0056】

一般的な例証としての技術

標的タンパク質を含む試料は当分野で公知の方法によって採取されてもよく、その方法は対象とする疾患の特定のタイプや位置に適切なものである。罹患組織の代表的な一片を採取するために組織生検が用いられることが多い。あるいは、細胞は、対象の罹患細胞を含むことがわかっているか又は含むと考えられる組織/体液の形態で間接的に得られてもよい。例えば、疾患病変の試料は、切除術、気管支鏡検査法、細針吸引、気管支擦過によって、あるいは痰、肋膜体液又は血液から採取されてもよい。タンパク質の標的は、罹患組織から、あるいは尿、痰又は血清などの他の身体試料から検出されうる。疾患試料中の標的タンパク質の検出について上記に述べた同じ技術は他の身体試料に応用されうる。罹患細胞は、疾患病変から脱離し、前記身体試料中に見られる。前記身体組織をスクリーニングすることによって、これら疾患のために簡便で迅速な診断法が達成されうる。加えて、治療の経過は、前記身体試料を標的タンパク質について試験することによって、より容易にモニターされうる。

30

40

一実施態様では、本発明の方法は、ヘプシンの調節不全(例えば過剰発現)に関連する任意の疾患を検出するために有用である。本発明の診断方法は臨床医にとって有用であるため、治療の適切な経過を決定することができる。例えば、本明細書中に開示したヘプシンの発現レベルが高いことを示す被検体からの試料によって、比較的低い発現レベルを示す試料よりもより積極的な治療的投薬計画が示唆されるかもしれない。本発明の方法は、様々な設定、例えば、薬剤開発の間の患者の選択、特定の治療投薬計画によって個々の患者を治療する場合の成功の可能性の予測に役立つ場合、疾患の経過を評価する場合、治療有効性をモニターする場合、特定の疾患(例えば癌)を発症する個体の素因を評価する場合、疾患の段階を区別する場合などに有用であるといえる。

【0057】

50

## 本発明の代表的な方法及びアッセイ

本明細書において開示される方法およびアッセイは、哺乳動物の組織又は細胞の試料におけるヘプシンの発現の試験に関するものであり、このときヘプシンの発現によって、組織又は細胞の試料がヘプシンインヒビターの使用に基づく治療に感受性があるか否かが予測される又は示される。

上記のように、様々な疾患と関係しているヘプシンの異常な発現と関係している罹患したヒト細胞種の集団がいくつかある。したがって、開示した方法及びアッセイにより、患者を治療するために適切又は効果的な治療法を評価する際に有用なデータ及び情報を得るための、簡便、効果的及び費用効果が良いと思われる手段が提供されると考える。例えば、ヘプシン関連の症状と診断されている患者は、組織又は細胞の試料を得るために行われた生検を持ちうる。この試料を、様々なインビトロアッセイによって試験し、患者の細胞がヘプシンインヒビター(例えば、抗ヘプシン抗体)などの治療剤に感受性があるか否かを決定することができる。

### 【0058】

本発明は、抗ヘプシンインヒビターに対する哺乳動物の組織又は細胞の試料(癌など)の感受性を予測するための方法を提供する。この方法において、哺乳動物の組織又は細胞の試料が採取され、ヘプシンの発現について試験される。前記方法は、免疫組織化学アッセイを含め、様々なアッセイ様式で実施されうる。前記組織又は細胞におけるヘプシンの発現の決定は、前記組織又は細胞が抗ヘプシンインヒビター療法に感受性があることを予測するものであろう。

以下に示すように、試料におけるヘプシンの発現は、多くの方法論によって分析されてもよく、これらの多くは当分野で公知かつ当業者に理解されるものであり、これらには限定するものではないが、免疫組織化学および/またはウェスタン分析、定量的な血液に基づくアッセイ(例えば血清ELISAなど)(例えば、タンパク質発現のレベルを調べるために)が含まれる。タンパク質の状態を評価するための代表的なプロトコルは、例としてA usubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology、ユニット15(イムノプロットング)にみられる。

試料においてヘプシンを検出することに関する以下のプロトコルは例示として挙げる。

### 【0059】

本発明の選択的な方法には、哺乳動物の組織又は細胞の試料中のヘプシンの存在について調べる又は試験するプロトコルが含まれる。ヘプシンを検出するために様々な方法が実施されてもよく、例えば、免疫組織化学分析、免疫沈降、ウェスタンプロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光標示式細胞分取(FACS)などが含まれる。例えば、組織又は試料中のヘプシンの発現を検出する選択的な方法は、該試料を、本発明の抗体、この抗体のヘプシン反応断片、又は本発明の抗体の抗原結合領域を含む組み換えタンパク質と接触させ、次いで該試料中のヘプシタンパク質の結合を検出することを含む。

本発明の特定の実施態様では、試料におけるヘプシタンパク質の発現は、免疫組織化学及び染色プロトコルを用いて試験される。組織切片の免疫組織化学染色は、試料中のタンパク質の存在を評価ないしは検出するための確実な方法であることが示されている。免疫組織化学法(「IHC」)技術は、抗体を用いて、一般的には色素生産性方法または蛍光性方法によって、インサイトで細胞性抗原を探索して視覚化する。

### 【0060】

試料の調整では、哺乳動物(典型的にはヒト患者)の組織または細胞試料を用いてもよい。試料の例として、組織生検、血液、肺吸引、痰、リンパ液などが含まれるが、これらに限定するものではない。前記試料は、当分野で公知の様々な手順、限定するものではないが、外科的切除、吸引または生検などによって採取することができる。組織は新鮮なものでも凍結したものでもよい。一実施態様では、前記試料は固定し、パラフィンなどに包埋する。

前記組織試料は従来の方法によって固定(すなわち保存)されてもよい(例として、“Man

10

20

30

40

50

ual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, " 3<sup>rd</sup> edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照)。当分野の技術者は、組織学的染色ないしは他の分析に供する試料の目的に応じて固定液を選択することは理解するところであろう。また、当分野の技術者は、組織試料の大きさおよび用いる固定液に応じて固定の長さを決定することも理解するであろう。実施例では、中性緩衝ホルマリン、ブアン固定液またはパラホルムアルデヒドを用いて試料を固定してもよい。

10

## 【0061】

通常、まず試料を固定し、次いで段階的に増加させたアルコールによって、脱水し、適切な切片溶液に浸透させて包埋し、組織試料を切断できるようにする。適切な切片溶液は、所望の検出条件下においてヘプシンの検出を可能にする溶液を含む。別法として、組織を切断して、得られた切片を固定してもよい。例として、従来の方法によって、組織試料を包埋して処理してもよい(例として、上掲の"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"を参照)。組織試料を包埋すると、試料をミクロトーム等によって、切断してもよい(例として、上掲の"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"を参照)。この手順の例として、切片はおよそ3ミクロンからおよそ5ミクロンの範囲の厚さでよい。切断すると、いくつかの標準的な方法によって、切片をスライドに付着させてもよい。スライド接着剤の例として、シラン、ゼラチン、ポリ L リジンなどがあるが、これに限定されるものではない。

20

場合によって、試料の調整の後に、組織切片をIHCを用いて分析してもよい。IHCは、形態学的染色および/または蛍光発光インサイツハイブリダイゼーションなどの付加的な技術と組み合わせて行ってもよい。IHCの直接アッセイおよび間接アッセイの2つの一般的な方法が有用である。第一のアッセイでは、標的抗原(例えばヘプシン)に対する抗体の結合は、直接的に測定される。この直接アッセイは、更なる抗体相互作用を必要とせず可視化される酵素標識一次抗体または蛍光タグ付加一次抗体などの標識された試薬を用いる。代表的な間接アッセイでは、コンジュゲートしていない一次抗体が抗原と結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体と結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートする場合、抗原を視覚化させるために発色基質ないしは蛍光発生基質が加えられる。二次抗体の中には一次抗体上の異なるエピトープと反応するものもあるので、シグナルの増幅が起こる。

30

## 【0062】

一般的に、免疫組織化学に使用する一次および/または二次抗体は、検出可能な成分にて標識されるであろう。通常、以下の種類に分類できる多くの標識が利用可能である：

(a) ラジオアイソトープ、例えば<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>Hおよび<sup>131</sup>I。抗体は例えばImmunology, Volumes 1 and 2, Coligen 等, 編集 Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて放射性同位体にて標識することができ、放射能はシンチレーション計測器を用いて測定することができる。

40

(b) コロイド金粒子

(c) 希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコクリセリン(phycocrytherin)、フィコシアニン又はSPECTRUM ORANGE7およびSPECTRUM GREEN7などの市販の蛍光体および/または上記の何れか一ないしは複数の誘導体を含むが、これらに限定されるものではない蛍光標識。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光計を用いて定量化することができる。

50

(d) 様々な酵素基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号にはこの概説がある。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる発色基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学発光計測器を用いて)か、またはエネルギーを蛍光アクセプターに与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP O)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivanら., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

10

#### 【0063】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：

20

(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP O)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆体(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(OPD)又は3,3',5,5'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する；

(ii) 発色基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(AP)；及び

(iii) 発色基質(例えばp-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ)を有する $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ( $\alpha$ -D-Gal)。

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第4275149号および同第4318980号を参照。標識は、抗体と間接的にコンジュゲートされることがある。これを行うための様々な技術は当分野の技術者に公知である。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな4つの分類のうちの何れかはアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、抗体と標識を間接的にコンジュゲートさせるために、抗体は小ハプテンとコンジュゲートさせ、前述した標識の異なるタイプのうちの1つは抗ハプテン抗体とコンジュゲートさせる。したがって、抗体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる。

30

#### 【0064】

上記の試料調整手順以外に、IHC前、IHCの間又はIHC後に組織切片の更なる処置が所望されてもよい。例えば、クエン酸塩バッファー中で組織サンプルを加熱するなどのエピトープ検索方法が実施されてもよい(例として、Leong等 Appl. Immunohistochem. 4(3): 201 (1996)を参照)。

40

場合によって行うブロック処置の後に、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原と結合するような好適な条件下と十分な時間、組織切片を一次抗体に曝露させる。これを達成するための好適な条件は慣例的な実験によって決定できる。試料に対する抗体の結合の範囲は、上記の検出可能な標識の何れか一つを用いて決定される。標識は、3,3'-ジアミノベンジジクロモゲンなどの発色基質の化学変化を触媒する酵素標識(例えばHRP O)であることが望ましい。好ましくは、酵素標識は、一次抗体(例えば、一次抗体はウサギ

50

ポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせる。

場合によって、ヘプシンの発現を検出するためのIHC分析に用いられる抗体は、ヘプシンに主に結合するように生成された抗体であり、例えば本発明の抗体を含む。場合によって、抗ヘプシン抗体はモノクローナル抗体である。抗ヘプシン抗体は様々な販売元からなど、当分野で容易に入手可能であり、また、当分野で公知の慣例的な技術を用いて生成されうる。

#### 【0065】

したがって、調製される検査材料はマウントしてカバーガラスをかけてもよい。その後、例えば顕微鏡を使用してスライドの評価を行い、当分野で通常用いられる染色強度判定基準を用いてもよい。一例として、染色強度判定基準は以下の通りに評価してもよい。

表 A

染色パターン	スコア
細胞内で染色が観察されない	0
10%以上の細胞内に淡いわずかに認識できる染色が検出される	1+
10%以上の細胞内に弱～中程度の染色が検出される	2+
10%以上の細胞内に中程度～強度の染色が検出される	3+

代替的な方法では、試料を、抗体-ヘプシン複合体が形成するために十分な条件下でヘプシンに特異的な抗体と接触させ、次いで該複合体を検出してもよい。ヘプシンの存在は多くの方法、例えば血漿又は血清を含む多種多様な組織および試料を検定するためのウェスタンブロットイングおよびELISA手順によって行ってもよい。このようなアッセイ様式を用いた広範囲にわたるイムノアッセイ技術は利用可能である。米国特許第4016043号、同第4424279号および同第4018653号参照。これらには、単一の部位および2-部位の両方、あるいは非競合型の「サンドイッチ」アッセイ、並びに従来の競合的結合アッセイが含まれる。また、これらのアッセイには、標的バイオマーカーに対する標識抗体の直接結合が含まれる。

#### 【0066】

サンドイッチアッセイは最も有用なものの一つで、一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術には多くのバリエーションあり、そのすべては本発明により包含されることを目的とする。簡潔には、代表的な最近のアッセイでは、非標識抗体を固体基板上に固定して、試験する試料を結合した分子に接触させる。抗体-抗原複合体が形成されるくらいの適当な期間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生できるレポーター分子で標識した、抗原特異的な第二抗体を添加して、更なる抗体-抗原-標識抗体の複合体が形成されるために十分な時間インキュベートする。反応しなかった材料を洗い流し、レポーター分子により産生されるシグナルを観察することによって抗原の存在を決定する。結果は、可視的なシグナルを単純に観察したものであれば質的なものであり、ヘプシンを既知量含有するコントロール試料と比較したものであれば量的なものである。

前記のアッセイへのバリエーションには、試料および標識抗体の両方を結合した抗体に同時に添加する同時アッセイなどがある。これらの技術は当分野の技術者には公知であり、多少のバリエーションが加えられることは容易に明らかであろう。代表的な近年のサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに対して特異性を有する第一抗体は固形表面に共有結合するか受動的に結合する。固形表面は一般的にガラス又はポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンである。固形支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートの皿、又はイムノアッセイを行うために適切な他の任意の表面の形態でもあってもよい。結合方法は従来技術において周知であり、一般に、架橋性共有結合又は物理的な吸着から成り、ポリマー-抗体複合体は試験試料の調整において洗浄される。次いで、

試験される試料の分割量を固相複合体に添加し、抗体中に存在する任意のサブユニットが結合するために十分な時間(例えば、より便利であるならば2~40分又は前夜)と適切な条件(例えば室温から40℃、例えば25℃から32℃の間)下でインキュベートする。インキュベーションの後、抗体サブユニット固相を洗浄して、乾燥させ、抗原の一部に特異的な二次抗体とともにインキュベートする。二次抗体は、抗原への二次抗体の結合を表すために用いられるレポーター分子に結合させる。

#### 【0067】

別法では、試料中の標的タンパク質を固定して、その後レポーター分子にて標識しているかまたは標識していない特異的抗体に固定された標的を曝すことを伴う。標的の量およびレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体で直接標識することによって、検出可能でありうる。あるいは、一次抗体に特異的な二次標識抗体を標的-一次抗体複合体に曝して、標的-一次抗体-二次抗体の三位複合体を形成させる。複合体は、レポーター分子により発されるシグナルにより検出される。本明細書中で用いられる「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原と結合した抗体を検出するための分析して同定可能となるシグナルを提供する分子を意味する。この種のアッセイにおいて、最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体または分子を含有する放射性核種(すなわち放射性同位体)および化学発光分子である。

10

#### 【0068】

酵素イムノアッセイの場合、一般にグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩によって、酵素を二次抗体にコンジュゲートさせる。しかしながら、容易に認識されるように、技術者に容易に利用可能である多種多様な異なるコンジュゲート技術が存在する。一般的に用いられる酵素には、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ-中でもガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼなどがある。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的に、対応する酵素による加水分解の際に生じる検出可能な色の変化で選択する。適切な酵素の例として、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどがある。また、上記の発色基質よりも蛍光性産物を産生する蛍光性基質を用いることができる。すべての例において、酵素標識抗体を一次抗体-分子マーカー複合体に加えて、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。次いで、適当な基質を含有する溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は二次抗体と結合した酵素と反応して、通常は分光測定法による量的なものでもある定性的な可視化シグナルを生じ、試料中に存在する標的抗原の量を表す。あるいは、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光性化合物を、抗体の結合能を変化させることなく抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光を照射することにより活性化されると、蛍光色素標識抗体はその光エネルギーを吸収し、それによりその分子において励起状態が誘発され、続いて光学顕微鏡を用いて目視で検出可能な特徴的な色で光が放射される。EIAでは、蛍光標識抗体は、一次抗体-抗原複合体に結合できる。結合していない試薬を洗い落とした後に、残りの三位複合体を適当な波長の光に曝すと、対象の標的抗原の存在を示す蛍光発光が観察される。免疫蛍光法およびEIA技術は何れも、当分野で非常に確立されたものである。しかしながら、放射性同位体、化学発光性分子または生物発光性分子などの他のレポーター分子も用いられてもよい。

20

30

上記の技術もヘプシンの発現を検出するために用いられることも考慮する。

40

#### 【0069】

組織又は細胞の試料が、ヘプシンインヒビターによる治療に感受性があることを表すヘプシンを発現するという決定に続いて、有効量のインヒビターが、哺乳動物を悩ませている疾患を治療するために該哺乳動物に投与されてもよいことが考慮される。本明細書中に記載の様々な病的状態の哺乳動物の診断は、熟練した専門家によってなされうる。診断技術は、例えば、哺乳動物の疾患の診断又は検出を可能とする当分野で利用可能である。

ヘプシンインヒビターは、公知の方法に従って、ポラスとしての静脈内投与、又は一定期間にわたる連続的な注入、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、骨膜内、くも膜腔内、経口、局所的又は吸入の経路により投与することができる。場合によっては、投与は、様々な市販の装置を使用するミニポンプ注入によって実施されてもよい。

50

ヘブシンインヒビターの投与にとって有効な用量とスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当業者の技量の範囲にある。一回又は複数回服用を用いることができる。例えば、単独で使用されるヘブシンインヒビターの効果的な用量又は量は、1日当たり体重の約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれより多い範囲であると現在考えられている。用量の種間スケールリングは、例えば、Mordenti等、Pharmaceut. Res., 8:1351(1991)に開示されているような、当該分野において既知の方法を用いて実施することができる。

ヘブシンインヒビターのインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約 $10\text{ng}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲又は1日当たりより多く、好ましくは約 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ から $10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ とすることができる。特定の用量及び送達方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4657760号、第5206344号、又は第5225212号を参照のこと。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で送達することが必要であることが予想される。

さらに付加的な治療が本方法において使用され得ることを考慮する。一又は複数の他の治療には、限定されるものではないが、細胞障害剤の投与及び問題とする特定の疾患のための他の標準的な治療投薬計画が含まれる。このような他の治療法を、ヘブシンインヒビターとは異なる試薬として用いられうることが考えられる。

#### 【0070】

上記に記載又は提案した用途への使用のために、本発明ではキット又は製造品も提供される。このようなキットは、ガラス瓶、チューブなどの一ないし複数の密閉した容器内に収容するために区分けされている運搬容器を具備しており、それぞれの容器には本方法に使用する別個の成分の何れか一つを含んでいる。例えば、容器の一つには検出可能なように標識してある一ないしは標識することができるプローブを含む。このプローブは、本発明の抗体であってもよい。

典型的に、本発明のキットは、上記の容器と、商業的及び使用者の観点からみて望ましい物質、例えばバッファー、希釈液、フィルター、針、注射器及び使用のための指示書を有するパッケージ挿入物を収容する一ないし複数のその他の容器とを具備する。特定の治療又は非治療的用途に該組成物が使用されることを示すために容器上にラベルがあってもよく、またそのラベルは上記のようなインビボの使用又はインビトロの使用の何れかについての指導を示すものであってもよい。

#### 【0071】

本発明のキットは多くの実施態様を有する。典型的な実施態様は、容器と、該容器上のラベルと、該容器内に収容される組成物を具備するキットであり、この場合の組成物はヘブシンに結合する一次抗体を含有するものであり、該容器上のラベルは、該組成物を用いて少なくとも一種類の哺乳動物細胞中のヘブシンの存在を評価することができることと、少なくとも一種類の哺乳動物細胞中のヘブシンの存在を評価するための抗体の使用についての指示書を示すものである。さらに、キットは、組織試料を調整して組織試料の同一片に抗体及びプローブを適用するための一組の指示書と材料を具備しうる。キットは、一次抗体と、酵素標識などの標識にコンジュゲートしている二次抗体の両方を具備してもよい。

キットの他の任意の成分には、一ないし複数のバッファー(例えばブロックバッファー、洗浄バッファー、基質バッファーなど)、酵素標識によって化学的に変化する基質などの他の試薬(例えば色素原)、エピトープ探索溶液、コントロール試料(ポジティブコントロール及び/又はネガティブコントロール)、コントロールスライド(一ないし複数)などがある。

#### 【0072】

一般的な抗体

一般に、本発明の抗ヘブシン抗体は、様々な細胞種類及び組織におけるヘブシン発現の

10

20

30

40

50

検出等、ヘプシンの検出及び単離用の試薬としての使用を含めて様々な設定に用途を有し、これらの用途には、細胞集団におけるヘプシンの密度と分布の決定、及びヘプシンの発現に基づく細胞選別が含まれる。また別の態様では、本抗ヘプシン抗体は、対象となる抗体の結合活性パターンに似た胴パターンを有するヘプシンアンタゴニストの開発に有用である。例えば、本発明の抗ヘプシン抗体を使用して、同じヘプシン結合特性を有する他の抗体を決定及び同定することができる。更なる実施例として、本発明の抗ヘプシン抗体を使用して、線形エピトープ及び立体エピトープを含め、本明細書に例示される抗体とほぼ同じヘプシンのエピトープに結合する他の抗ヘプシン抗体を同定することができる。

候補抗体の生成は、ハイブリドーマ技術、及び結合分子のファージディスプレイライブラリのスクリーニング等の、本明細書に記載の技術を含め、当技術分野において常套的な技術を用いて達成することができる。これらの方法は従来技術において確立されている。

#### 【0073】

簡潔に説明すると、本発明の抗ヘプシン抗体は、一又は複数の所望の活性を有する合成抗体クローンをスクリーニングするために、コンビナトリアルライブラリを用いて作製することができる。原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原に吸収され、それによってライブラリーの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンを抗原から溶出することができ、抗原吸収/溶出のサイクルを繰り返すことによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗ヘプシン抗体は、対象のファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて対象のファージクローン由来のFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いて完全長抗ヘプシン抗体クローンを構築することにより、得ることができる。国際公開第03/102157号パンフレット及びその引用文献も参照されたい。

一実施態様では、本発明の抗ヘプシン抗体はモノクローナルである。また、ここに提供される抗ヘプシン抗体のFab、Fab'、Fab'-SH及びF(ab')<sub>2</sub>断片、並びにそれらの変形形態も本発明の範囲に含まれる。これらの抗体断片は、酵素消化等の常套的な手段により作製することができるか、又は組換え技術により生成することができる。このような抗体断片は、キメラ、ヒト又はヒト化とすることができる。これらの断片は、本明細書に定める診断及び治療の目的に有用である。

#### 【0074】

モノクローナル抗体は、ほぼ同種の抗体の集団から得ることができる。つまり、集団を構成する個々の抗体は、少量だけ存在する可能性のある天然に発生する突然変異を別にすれば同一である。従って、形容詞「モノクローナル」とは、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特性を示す。

本発明の抗ヘプシンモノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)によって最初に開示されたハイブリドーマ法を含む、従来技術に既知の様々な方法を用いて作製することができるか、或いは組換えDNA法によって作製することができる(例えば、米国特許第4816567号)。

#### 【0075】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来である。

## 【 0 0 7 6 】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成  
ベクターの構築

本発明のポリペプチド（抗体）をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能（異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方）及び属する特定の宿主細胞への適合性に依りて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボゾーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

10

## 【 0 0 7 7 】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン（Amp）及びテトラサイクリン（Tet）耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモーターを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。

20

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

30

## 【 0 0 7 8 】

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

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

40

## 【 0 0 7 9 】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系及びハイ

50

ブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等(1980) Cell 20:269)。

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

#### 【0080】

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

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

#### 【0081】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等による米国特許第5840523号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。任意のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作成することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。但し、ヌクレオチド配列のサイレントな変化が好ましい。TIRにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含む。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード化配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。加えて、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、1番目及び2番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

#### 【0082】

好ましくは、含有される各シストロンについて一定の範囲のTIR強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のTIR強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。TIR強度は、Simmons等による米国特許第5840523号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づいて

、所望の個々の T I R を選択し、発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型 W3110 fhuA ( tonA) ptr3 lac lq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup> を有する 3 3 D 3 株(米国特許第 5 6 3 9 6 3 5 号)を含む W3110 株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219 頁 ; ATCC 寄託番号 27,325) 及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌 294 (ATCC 31,446), 大腸菌 B, 大腸菌 1776 (ATCC 31,537) 及び大腸菌 RV308 (ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass 等, Proteins, 8:309-314 (1990) に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、又は p K N 4 1 0 のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

#### 【 0 0 8 3 】

##### 抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、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のに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNA を原核生物宿主中に導入し、その DNA を染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール / D M S O を用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

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

#### 【 0 0 8 4 】

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

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、好ましい温度範囲は、約 2 0 から約 3 9 、好ましくは約 2 5 から約 3 7 、好ましくは約 3 0 である。培地の pH は、主として宿主生物に応じて、約 5 から約 9 の範囲の任意の pH でありうる。大腸菌に対しては、pH は約 6 . 8 から約 7 . 4、又は約 7 . 0 とすることができる。

10

20

30

40

50

本発明の発現ベクターに誘導性プロモーターが用いられる場合、プロモーターの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモーターが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。一実施態様では、リン酸限定培地はC.R.A.P培地である(例として、Simmons等, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

#### 【0085】

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

本発明の一態様では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、好ましくは約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

#### 【0086】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD<sub>550</sub>まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等(1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

#### 【0087】

発現された異種タンパク質(特にタンパク質分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等(1998); Georgiou等, 米国特許第5264365号; Georgiou等, 米国特許第

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

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

#### 【0088】

##### 抗体精製

一実施態様では、ここで生成される抗体を更に精製することにより、更なるアッセイ及び使用のためにほぼ同種の調製物を得る。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカ又はDEAEなどの陽性交換樹脂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降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

一態様では、固形層に固定したプロテインAを本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテインAは抗体のFc領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した41kDの細胞壁タンパク質である。Lindmark等 (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAを固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、或いは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムとすることができる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着をできるだけ防ぐように、グリセロールなどの試薬でコートされる。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテインA固定固形層に適応し、プロテインAに対象とする抗体を特異的に結合させることができる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

#### 【0089】

##### 真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、ベクターは、限定するものではないが、以下の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモーター及び転写終末因子。

#### 【0090】

##### (i) シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。通常選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。

このような前駆体領域のDNAは、多価抗体をコードするDNAに読み取り枠を一致させて結合される。

#### 【0091】

##### (ii) 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、SV40開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

#### 【0092】

##### (iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能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)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

10

20

30

40

50

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

#### 【0093】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、例えば、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞(例として、ATCC CRL-9096)を含む。

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択可能なマーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能なマーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照のこと。

#### 【0094】

##### (iv) プロモーター成分

発現及びクロニングベクターは通常、宿主生物体によって認識され、対象のポリペプチドをコードする核酸(例えば抗体)に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるAATAAA配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、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、或いは熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節されうる。

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

#### 【0095】

##### (v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明の抗体ポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強され得る。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、エラストラーゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、通常プロモーターから5'位に位置している。

#### 【0096】

##### (vi) 転写終末成分

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

#### 【0097】

##### (vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DFHR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞(MMT060562, ATCC CCL 51); TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝癌株(Hep G2)である。

宿主細胞は、抗体生産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、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

#### 【0098】

##### (viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生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F10(Sigma)、最小必須培地((MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), Sigma)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、

10

20

30

40

50

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)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN<sup>TM</sup>薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必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むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

#### 【0099】

##### (ix) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。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、また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。

#### 【0100】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーは一般に許容可能な精製技術である。プロテインA等のアフィニティー試薬の適合性は、抗体中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: 1657-1675 (1986))。アフィニティー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<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>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、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSE<sup>TM</sup>クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、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法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

任意の予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばpH約2.5 - 4.5、一般的には低塩濃度(例として、約0 - 0.25 M塩)の溶出バッファーを用いて低pH疎水性作用クロマトグラフィーにより、必要な精製ステップを更に行う。

一般に、研究、試験及び臨床用に使用される抗体を調製するための技術及び方法は従来技術において既に確立されており、上記と合致している及び/又は対象とする特定の抗体について当業者により適切とみなされることに注意されたい。

#### 【0101】

##### 活性アッセイ

本発明の抗体は、従来技術に既知の様々なアッセイにより、その物理的/化学的特性及び生物学的機能について特徴付けることができる。

精製された抗体は、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びババイン消化を含むがこれらに限定されない一連のアッセイにより、更に特徴付けることができる。

必要に応じて、抗体の生物学的活性が分析される。一部の実施態様では、本発明の抗体の抗原結合活性について試験する。従来技術に既知の、本発明に使用可能な抗原結合アッセイには、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、

10

20

30

40

50

及びプロテインAイムノアッセイ等のあらゆる直接的又は競合的結合アッセイを含むがこれらに限定されない。

#### 【0102】

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

#### 【0103】

##### ヒト化抗体

本発明は、ヒト化抗体を含む。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が従来技術に既知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトのソースからそれに導入された一以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「重要な」残基と呼ばれ、一般に「重要な」可変ドメインに由来する。ヒト化は、基本的にヒト抗体の該当する配列を高頻度可変領域配列で置換することにより、Winter及び共同研究者(Jones等(1986)*Nature* 321:522-525; Riechmann等(1988)*Nature*, 332:323-327; Verhoeyen等(1988)*Science* 239:1534-1536)の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基が、及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0104】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽鎖及び重鎖いずれも、抗原性を減らすために重要である。いわゆる「最良に適合する(ベストフィット)」方法によれば、齧歯類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。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる(Sims等(1993)*J. Immunol.* 151:2296; Chothia等(1987)*J. Mol. Biol.* 196:901)。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列から得られた特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを複数の異なるヒト化抗体に使用することができる(Carter等(1992)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta等(1993)*J. Immunol.*, 151:2623)。

更には、抗体は、抗原に対する高い親和性及びその他の望ましい生物学的特性を保持してヒト化されることが一般に好ましい。この目的を達成するために、一方法では、親の配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び様々な概念上のヒト化産物を分析

するプロセスにより、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に利用可能であり、当技術分野の当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の、有望な三次元立体配置的構造を図解及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。このような表示を検査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際に残基が果たすと思われる役割を分析することができ、つまり候補免疫グロブリンの、その抗原に対する結合能に影響する残基を分析することができる。このように、レシピエント及び重要な配列からFR残基を選択して組み合わせることにより、所望の抗体特性、例えば標的とする抗原に対する親和性の増大を達成することができる。一般に、高頻度可変領域残基は、抗原の結合に対する影響に、直接的に且つ最も有意に関わっている。

#### 【0105】

##### 抗体変異体

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドのインターフェースに変更を含む抗体を提供し、この場合前記変更によりヘテロ二量体化が促進及び/又は増長される。これらの変更には、第1のFcポリペプチドへの隆起の導入及び第2のFcポリペプチドへの空洞の導入を含み、前記隆起が前記空洞に配置可能であることにより、第1及び第2のFcポリペプチドの複合が促進される。このような変更を有する抗体の生成方法は、米国特許第5731168号に記載のように、従来技術に既知である。

一部の実施態様では、ここで記載の抗体のアミノ酸配列の修飾を考察する。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性が改善されることが望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、適当なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終コンストラクトに達するまでなされるが、その最終コンストラクトは所望の特徴を有する。アミノ酸変化は、配列を作製する時点で対象とする抗体のアミノ酸配列に導入してもよい。

突然変異のための好ましい位置にある抗体の特定の残基又は領域の同定のために有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) Science 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され(例えば、arg、asp、his、lys及びglu等の荷電残基)、中性又は負荷電アミノ酸(例えばアラニン又はポリペプチドアニリン)に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。次いで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更に又は他の置換を導入することにより精密にされる。即ち、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、alaスキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

#### 【0106】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び/又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基によって置換された抗体分子に少なくとも一つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異について最も対象となる部位は高度可変領域を含むが、FR変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表Bに示す。これらの置換により生物学的活性に変化が生じる場合、表Aに「例示的置換」と称した又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてよい。

#### 【0107】

10

20

30

40

50

表 B

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

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(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)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, 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)

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる :

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

(2) 中性の親水性 : Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

(3) 酸性 : Asp、Glu ;

(4) 塩基性 : His、Lys、Arg ;

10

20

30

40

50

(5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；及び

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一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。このような置換された残基も、保存的置換部位か、更に好ましくは、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

#### 【0108】

一つの種類の置換による変異体は、親抗体(例えばヒト化抗体又はヒト抗体)の一以上の高頻度可変領域残基を置換することを含む。一般に、更なる開発用に選択される結果として得られた変異体の生物学的特性は、それらが生成された親抗体と比べて変更(例えば改善)される。このような置換による変異体を生成する便利な方法では、ファージディスプレイを用いた親和性成熟を使用する。簡単には、複数の高頻度可変領域部位(例えば6~7の部位)を変異させることにより、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生じさせる。このようにして生成された抗体は、各粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質(例えば、M13の遺伝子III産物)の少なくとも一部への融合物として、糸状のファージ粒子から表示される。次いで、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書に開示されるように、その生物学的活性(例えば結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、系統的変異導入法(例えばアラニンスキニング)を行って、抗原結合に有意に貢献する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又は付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することにより、抗体と抗原との接触点を同定することが有効である。このような接触残基隣接残基は、従来技術に既知の技術による置換の候補であり、それにはここに説明するものが含まれる。そのような変異体が生成されたら、本明細書に記載のものを含む従来技術に既知の技術を用いて変異体パネルのスクリーニングを行い、更なる開発のために一以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体を選択することができる。

#### 【0109】

従来技術に既知の様々な方法により、本抗体の、アミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を調製した。これらの方法は、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)突然変異による調製、PCR突然変異誘発、及び前もって調製された変異体又は抗体の非変異バージョンのカセット変異導入法を含むが、これらに限定されない。

本発明の抗体のFc領域に一以上のアミノ酸修飾を導入することにより、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジステインのアミノ酸位置を含む一以上のアミノ酸位置に一のアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含みうる。

本明細書及び従来技術の教示によれば、一部の実施態様では、本発明の抗体は、対応する野生型の抗体と比較した場合、例えばFc領域内に、一以上の変更を有すると考えられる。それでも、これらの抗体は、その野生型の同等物と比較した場合、治療的有効性に必要なほぼ同一の特性を保持している。例えば、国際公開第99/51642号等に記載されているように、Fc領域に、C1q結合及び/又は補体依存性細胞障害性(CDC)に変化(つまり効果の改善又は低減)をもたらす特定の変更を実施することが考慮される。Fc領域の変異体の他の例に関し、Ducan及びWinterによるNature 322:738-40 (1998)；米国特許第5648260号；同第5624821号；及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

#### 【0110】

##### イムノコンジュゲート

別の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞障害剤にコンジュゲートした抗体を含んでなる、イムノコンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を提供する。

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

10

20

30

40

50

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(Syrigos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 9 7 5 2 7 8 号)、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等, (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. Pinchera等(編), 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等, (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等, (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等(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 ; Mandler等(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler等(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第 1 3 9 1 2 1 3 号 ; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等 (1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman等 (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。

#### 【 0 1 1 1 】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)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<sup>111</sup>In又は<sup>90</sup>Y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等(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77 ; Wiseman等 (2002) *Blood* 99(12):4336-42 ; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63 ; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼバリンは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 4 9 7 0 1 9 8 号 ; 同第 5 0 7 9 2 3 3 号 ; 同第 5 5 8 5 0 8 9 号 ; 同第 5 6 0 6 0 4 0 号 ; 同第 5 6 9 3 7 6 2 号 ; 同第 5 7 3 9 1 1 6 号 ; 同第 5 7 6 7 2 8 5 号 ; 同第 5 7 7 3 0 0 1 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.)を、CanAgを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療について試験する。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用に試験する。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等 (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。

#### 【 0 1 1 2 】

イムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(上記)に記載した。用い

10

20

30

40

50

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(modectin)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(curcun)、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。例として1993年10月28日に公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 及び $^{186}\text{Re}$ が含まれる。抗体及び細胞障害剤の複合体は、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(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。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、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセセン(trichotheone)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。

#### 【0113】

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。

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体及び類似体は、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号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii)抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii)血漿中で安定、そして(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

#### 【0114】

メイタンシノイド薬剤分子の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3及びDM4が含まれる。メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その製法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号

、欧州特許第0425235号B1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  
ノイドを含有するイムノ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に結合しているイムノ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 $3 \times 10^5$  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。

10

#### 【0115】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの  
生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合  
させることにより調製される。例えば、米国特許第5208020号(この開示内容は出  
典明記により特別に組み込まれる)を参照。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  
上述の非特許文献に開示されている。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類似体を含む。

20

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235号B1、Chari等,  
Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出  
願番号10/960,602(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に  
開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために  
、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイ  
タンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願の米国公開特許第10/9  
60602号に開示されるように調製されうる。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、ジスルフィド基とチオエーテル基  
が好ましい。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

30

#### 【0116】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリン  
グ剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、  
スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SM  
CC)、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  
に提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN

40

50

-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。好ましい一実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

#### 【0117】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号; 同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分D E及びD Fを含み、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国公開特許第10/983340号に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に組み込まれる。

#### 【0118】

例示的なアウリスタチンの実施態様はM M A E及びM M A Fである。それ以外の例示的な実施態様には、M M A E又はM M A F、及び様々なリンカー成分(後述で更に説明)であるA b - M C - v c - P A B - M M A F、A b - M C - v c - P A B - M M A E、A b - M C - M M A E及びA b - M C - M M A Fが含まれる。

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬剤成分は、US 5635483; US 5780588; Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及びPettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863の方法に従って調製されうる。また、Doroni na(2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国公開特許第10/983340号も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる(例えば、リンカー及びモノメチルバリン化合物、例えばM M A E及びリンカーにコンジュゲートしたM M A Fの調整方法を開示している)。

#### 【0119】

カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、<sub>1</sub><sup>I</sup>、

10

20

30

40

50

$^2\text{I}$ 、 $^3\text{I}$ 、N-アセチル- $^1\text{I}$ 、PSAG及び $^1\text{I}$  (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QFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

#### 【0120】

##### 他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(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イムノコンジュゲートをさらに考察する。

#### 【0121】

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、 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 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 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 又は $\text{I}^{123}$ 、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 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 又は $\text{I}^{123}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 及び $\text{In}^{111}$ 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。

#### 【0122】

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(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、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)。

10

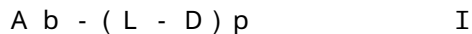
本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyl-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

### 【0123】

#### 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、状態及び試薬を用いて調製される：(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。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

20



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIA B」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に出願した米国公開特許第10/983340号を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

30

### 【0124】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

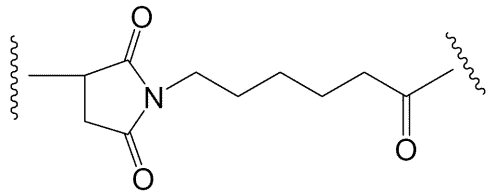
40

### 【0125】

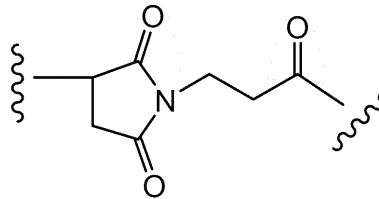
例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線はADCの他の構成

50

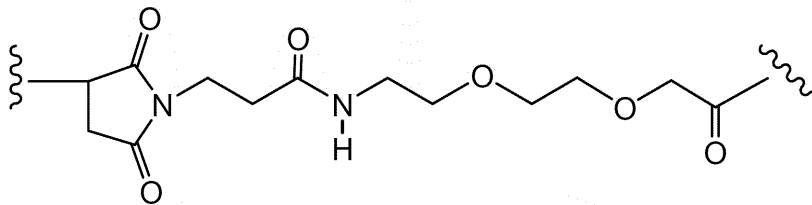
成分への共有結合の部位を示す) :



MC



MP



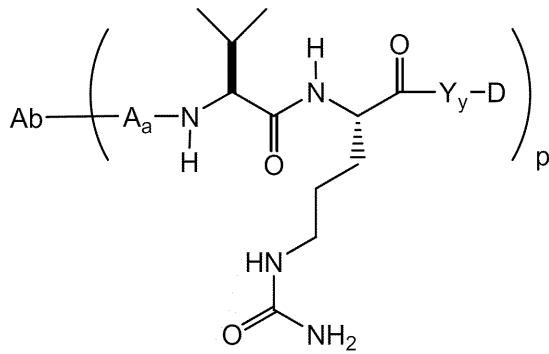
MPEG

10

20

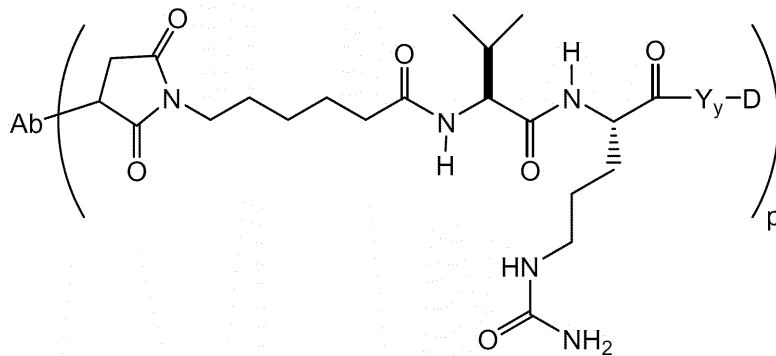
【 0 1 2 6 】

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(A b)及びリンカーが示されており、pは1~約8である) :



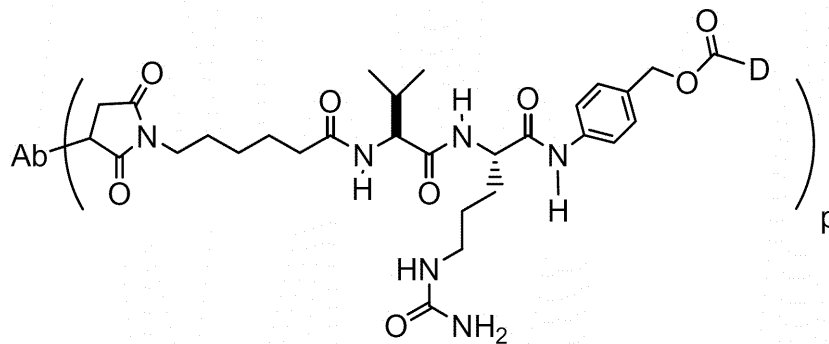
Val-cit

10



MC-val-cit

20



MC-val-cit-PAB

30

## 【 0 1 2 7 】

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末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及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、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及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、カルボキシル及びマレイミド群、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。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製することによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

40

50

## 【0128】

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と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ン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(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含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。

10

## 【0129】

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、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリアルヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えばNHSEエステル、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物)；(ii) アルキル及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、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

20

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。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。

30

## 【0130】

抗体(Ab)-MC-MMAEは、本明細書中に提供される何れかの抗体と以下のMC-MMAEとのコンジュゲートにより調製されうる。抗体は、pH 8.0の500mM ホウ酸ナトリウムと500mM 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の100mM ジチオトレイトール(DTT)で処理した。37℃で30分インキュベートした後、Sephadex G25樹脂で溶出することによって、バッファーを交換して、1mM DTPAを含むPBSにて溶出した。溶液の280nmの吸光度とDTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて412nmの吸光度の測定によるチオール濃度から減少した抗体濃度を決定することによって、チオール/Ab値を調べる。PBSに溶解した減少した抗体を氷上で冷やす。薬剤リンカー試薬であるマレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、すなわちMC-MMAEをDMSOに溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やした減少した抗体2H9を含むPBSに添加する。およそ1時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって、濃縮し、2H9-MC-MMAEを精製して、PBSのG25樹脂による溶出によって、脱塩して、無菌条件下で0.2mmのフィルターに濾過して、保存のために凍結した。

40

## 【0131】

抗体-MC-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製さ

50

れうる。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAEは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAEと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAFは、Ab-MC-MMAEの調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAFと本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-SMCC-DM1は、以下のSMCC-DM1と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、(スクシンイミジル4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC、Pierce Biotechnology, Inc)で誘導体化して、SMCCリンカーを導入する。具体的には、50 mM リン酸カリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 2 mM EDTA、pH 6.5 中で、7.5 モル等量のSMCC(DMSO中に20 mM、6.7 mg/ml)にて20 mg/mlの抗体を処理した。室温のアルゴン下で2時間攪拌した後に、反応混合物を、50 mM リン酸カリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 2 mM EDTA、pH 6.5 にて平衡化したSephadex G25カラムにてろ過する。抗体を含有する分画をプールして、アッセイする。

#### 【0132】

このようにして調製される抗体-SMCCは、50 mM リン酸カリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 2 mM EDTA、pH 6.5 で希釈して、最終濃度およそ10 mg/mlとし、10 mMのDM1の溶液を含むジメチルアセトアミドにて反応させる。反応は、16.5時間に亘り、室温、アルゴン下にて攪拌して行う攪拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、pH 6.5の1xPBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5 x 4.9 cm)にろ過する。252 nmと280 nmの吸光度で測定されるように、抗体に対するDM1薬剤の比率(p)はおよそ2~5でありうる。

Ab-SPP-DM1は、本明細書中で提供される何れかの抗体と以下のSPP-DM1とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、ジチオピリジル基を導入するために、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエートによって、誘導体化される。NaCl(50 mM)及びEDTA(1 mM)を含有する44.7 mlの50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.5)中の抗体(376.0 mg、8 mg/ml)を、SPP(2.3 ml エタノール中に5.3のモル等量)にて処理した。室温、アルゴン下にて90分間インキュベートした後、反応混合物を、35 mMのクエン酸ナトリウム、154 mM NaCl、2 mM EDTAにて平衡化したSephadex G25カラムにろ過する。抗体含有分画をプールして、アッセイした。抗体の修飾の程度は、上記の通りに決定される。

#### 【0133】

抗体-SPP-Py(およそ10 mmolの解放可能な2-チオピリジン基)を上記の35 mM クエン酸ナトリウムバッファー、pH 6.5 にて希釈して、およそ2.5 mg/mlの終濃度にした。次いで、DM1(1.7等量、17 mmole)を含む3.0 mMのジメチルアセトアミド(DMA、最終反応混合物中3%v/v)を抗体溶液に添加する。およそ20時間、室温、アルゴン下にて反応を行う。反応物を、35 mM クエン酸ナトリウム、154 mM NaCl、pH 6.5 にて平衡化したセファクリルS300ゲル濾過カラム(5.0 cm x 90.0 cm、1.77 L)に流す。流速はおよそ5.0 ml/分よく、65の分画(各々20.0 ml)を回収する。抗体分子当たりの結合されるDM1薬剤分子の数(p')は、252 nm及び280 nmの吸光度を測定して決定し、抗体当たりのDM1薬剤成分をおよそ2~4としてもよい。

抗体-BMPEO-DM1は、本明細書中に示される何れかの抗体と以下のBMPEO-DM1とのコンジュゲートにより調製される。抗体を、ビスマレイミド試薬BM(PEO)4(Pierce Chemical)にて修飾して、抗体の表面上の反応していないマレイミド基を除去する。これは、BM(PEO)4を50%のエタノール/水混合液に10 mMの濃度になる

10

20

30

40

50

まで溶解して、およそ  $1.6 \text{ mg/ml}$  ( $10 \text{ マイクロモル}$ ) の濃度でリン酸緩衝食塩水に抗体を含有する溶液に  $10$  倍のモル過剰量を加え、 $1$  時間反応させて、抗体-リンカー中間生成物である  $2\text{H}9\text{-BMPEO}$  を形成させることにより達成される。 $150 \text{ mM}$  の  $\text{NaCl}$  バッファーと  $0 \text{ mM}$  のクエン酸塩、 $\text{pH} 6$  のゲル濾過(HiTrap column, Pharmacia)によって、過剰な  $\text{BMPEO}$  を取り除く。およそ  $10$  倍のモル過剰  $\text{DM1}$  を、ジメチルアセトアミド( $\text{DMA}$ )に溶解して、 $2\text{H}9\text{-BMPEO}$  中間生成物に加える。また、ジメチルホルムアミド( $\text{DMF}$ )を用いて薬剤成分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させて、 $\text{PBS}$  でゲル濾過ないし透析を行って反応していない  $\text{DM1}$  を取り除く。 $\text{PBS}$  の  $\text{S}200$  カラムによるゲル濾過を用いて、高分子量凝集塊を取り除いて、精製された  $2\text{H}9\text{-BMPEO-DM1}$  に供給する。

10

#### 【0134】

##### 抗体誘導体

本発明の抗体を更に変更し、従来技術に既知で容易に入手可能な非タンパク質性成分を更に含有させる。一実施態様では、抗体の誘導体化に適した成分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されないが、ポリエチレングリコール( $\text{PEG}$ )、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ- $1,3$ -ジオキサラン、ポリ- $1,3,6$ -トリオキサン、エチレン/マレイン無水物共重合体、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムな共重合体)、及びデキストラン又はポリ( $n$ -ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロ

20

プロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水に対する適性を有しており、製造するのに有利である。ポリマーは任意の分子量を有することができ、分枝していてもしていなくともよい。抗体に付着しているポリマーの数は変動し、複数のポリマーが付着している場合、それらは同じ分子であるか、又は異なる分子である。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は種類は、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が決まった条件の下に治療に使用されるかどうか等を含むがこれらに限定されない検討材料に基づいて決定される。

30

#### 【0135】

##### 薬学的製剤

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

40

50

、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；E D T A等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Z n-タンパク質複合体)；及び/又はTWEEN™、PLURONICS™又はポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0136】

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要な一以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものを含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

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

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、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

#### 【0137】

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

#### 【0138】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上記に示す一般的な説明により、様々な他の実施態様が実施しうることは理解される

#### 【実施例】

#### 【0139】

#### 材料と方法

#### 試薬

Cortex Biochem(カリフォルニア州サンリアンドロ)よりPro-uPAを、American Diagnostica(コネチカット州グリーンウィッチ)よりuPA(高分子量形態)を、Diapharam(オハイオ州ウェストチェスター)より発色基質S2444及びS2366を、それぞれ入手した。肝細胞増殖因子活性化因子のインヒビター-1B(HAI-1B)由来のクニツドメインインヒビターKD1を、記載に従って大腸菌中で生成した(参考文献19)。TinPro細胞は、Expression System LLC(カリフォルニア州ウッドランド)より入手した。ニッケルニトリロ三酢酸樹脂をQiagen Inc.(カリフォルニア州チャッツワース)より、Q-セファロースをGE Healthcare(ニュージャージー州ピスカタウ

10

20

30

40

50

エイ)よりそれぞれ入手した。肝細胞増殖因子活性化因子インヒビター-2(HAI-2)の可溶性形態を、記載のように発現させ、精製した(参考文献16)。

細胞外ドメイン全体を含むヘプシンの可溶性形態を、バキュロウイルス発現系を使用して生成した。分泌されたHisタグ付きヘプシncDNAは、ミツパチメリチンのシグナル配列(Met<sup>1</sup>-Tyr<sup>20</sup>)をコードするcDNAと、ヒトヘプシンの細胞外ドメイン(Arg<sup>45</sup>-Leu<sup>417</sup>)をコードするcDNAとの融合により構築した。最終的なcDNAコンストラクトを、ポリヘドリンプロモーターの制御下においてバキュロウイルス発現ベクターに挿入し、T.in.Pro細胞に発現させた。ヘプシンは、基本的に記載されているようにしてニッケル-ニトリロ三酢酸親和性クロマトグラフィーにより精製した(参考文献20)。ヘプシン含有培養液を、1mMのアジ化ナトリウム、0.3MのNaCl及び15mMのイミダゾールを用いて調整し、NaOHを用いてpHを6.5に調節した。事前にチャージしたニッケル-ニトリロ三酢酸樹脂を培養液に添加した(樹脂4ml/培養液1L)。4で2時間に亘り弱くかき回すことで、バッチの吸収を行った。1時間かけて樹脂を落ち着かせた後、上清をデカントし、樹脂をカラムに詰めた。最低10カラム分の容積のPBS/0.3MのNaCl(pH7.4)でカラムを洗浄し、それに続いて10カラム分の容積の25Mのミダゾール、0.3MのNaCl、1mMのアジ化ナトリウム(pH8.0)で洗浄した。250mMのイミダゾール、0.3MのNaCl、1mMのアジ化ナトリウム(pH8.0)を用いてタンパク質を溶出した。プールした画分を、10mMのトリス、1mMのアジ化ナトリウム(pH8.0)で60倍に希釈し、最終的に伝導率2.0mS/cm未満のpH8.0とした。タンパク質をQ-セファロースFF上に、タンパク質1mg当たり0.1mlの樹脂という割合で充填した。最低10カラム分の容積の20mMのトリス、2mMのアジ化ナトリウム(pH8.0)を用いてカラムを洗浄し、20mMのトリス、2mMのアジ化ナトリウム(pH8.0)中において0~1MのNaCl勾配でヘプシンを溶出した。

#### 【0140】

##### モノクローナル抗ヘプシン抗体の生成

5匹のBalb/cマウス(Charles River Laboratories、米国マサチューセッツ州)を、RIBIAジュバント(Ribi Immunochem Research Inc.、米国ミズーリ州)中において精製したヘプシンを用いて超免疫化した。5匹のマウスから採取したリンパ節由来のB細胞を、前述のように、マウスの骨髄腫細胞(X63.Ag8.653、ATCC、米国メリーランド州)と融合させた(参考文献21)。10~14日後、上清を集め、ヘプシン結合ELISAを用いて、LnCaP-34細胞及び直腸結腸細胞株HPAC(ATCC、バージニア州マナッサス)をネガティブコントロールとして用いたFACSにより、抗体の生成についてスクリーニングした。5つのポジティブクローンは、1ウェル当たり1の細胞を用いた2回目のクローニング後に最高の免疫結合と特異性を示し(Elite 1 Sorter, Beckman Coulter、米国カリフォルニア州)、これをINTEGRA CELLline 1000(Integra Bioscience, AG、スイス)中でスケールアップした。上清をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、滅菌濾過し(孔サイズ0.2µm; Nalge Nunc International、米国ニューヨーク州)、PBS中に4で保存した。

#### 【0141】

##### ヘプシン結合ELISA

1ウェル当たりヘプシン(1µg/ml)を含む0.05Mの炭酸バッファー(pH9.6)100µlを用いてマイクロタイプレート(Nalge Nunc International、米国ニューヨーク州)を4で一晩コートした。プレートを、PBS/0.05%(v/v)のTween 20で洗浄し、続いてPBS/0.5%(w/v)のBSA/0.05%(v/v)のTween 20でブロックした。100µlの培養液上清を各ウェルに加え、1時間かけて室温でインキュベートした。プレートを洗浄し、西洋わさびペルオキシダーゼ抱合ヤギ抗マウスIgG(Sigma-Aldrich Inc.、米国ミズーリ州)により結合した抗体を検出し、PBS/0.5%BSA/0.05%Tween 20中において1:5000に希釈して100µl/ウェルとし、30分間インキュベートした。追加の洗浄ステップを

行った後、BioFX TMB基質 (BioFX Laboratories、米国メリーランド州) を添加し、5 分間インキュベートし、BioFx Stop溶液 (BioFX Laboratories、米国メリーランド州) で反応を止めた。次いで、マイクロプレートリーダー上で 630 nm における吸光度を測定した。

#### 【0142】

L n C a P 細胞を過剰発現するヘプシンの生成

ヒト前立腺細胞腫細胞株である L n C a P - F G C ( L n C a p ) を、アメリカ培養細胞株保存機関 (バージニア州マナッサ) から取得した。細胞を、R P M I 1 6 4 0 培養液 ( A T C C 、バージニア州マナッサ) プラス 1 0 % のウシ胎仔血清 (Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス) 中で培養した。蛍ルシフェラーゼ遺伝子 ( L n C a p - l u c ) を安定して発現する L n C a P クローンをヘプシン形質移入実験に使用した。L n C a P - l u c 細胞株を樹立するために、ルシフェラーゼ遺伝子を、p M S C V n e o 発現ベクター (BD Biosciences-Clontech、カリフォルニア州マウンテンビュー) に挿入された E c o R I / X h o I c D N A 断片としてサブクロニングした。リポフェクタミン 2 0 0 0 (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) を用いて L n C a P 細胞にルシフェラーゼコンストラクトを形質移入した。5 0 0 μ g / m l のジェネテシン (Invitrogen) を用いて細胞を選択し、LucLiteキット (PerkinElmer、マサチューセッツ州ボストン) を使用することによりバイオルミネセンス活性についてクローンをスクリーニングした。最も強い発光信号を生成したクローン L n C a P - l u c を、ヘプシン形質移入実験に選択した。

抗生物質の選択のため、完全長ヘプシンの c D N A を、ピューロマイシン抵抗遺伝子を含む哺乳動物発現ベクターに挿入した (Genentech、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)。L n C a P - l u c クローンに、C 末端フラッグを持つ完全長ヘプシンをコードするコンストラクトを形質移入し、0 . 5 μ g / m l のピューロマイシン (Sigma-Adri ch) を用いて細胞を選択した。抗フラッグモノクローナル抗体 (Sigma-Adri ch) を用いて、F A C S により、ヘプシンの表面の発現についてクローンを分析した。2 つのクローン、すなわち高いレベルでヘプシンを発現する L n C a P - 3 4 と、低いレベルでヘプシンを発現する L n C a P - 1 7 を、抗ヘプシンモノクローナルを用いた研究のために選択した。

#### 【0143】

F A C S 分析

集密的な細胞の層を P B S で洗浄し、細胞解離溶液 (Sigma-Aldrich Inc.、米国ミズーリ州) を用いて細胞を除去した。細胞を P B S で洗浄し、1 m l 当たり 0 . 5 ~ 1 . 0 × 1 0 <sup>7</sup> 個の細胞を含む P B S / 1 % ( v / v ) F B S 中に再懸濁した。1 0 0 μ l の細胞懸濁液を、氷の上で 4 0 分に亘り培養上清又は精製した抗体でインキュベートした。P B S で細胞を 2 回洗浄した後、P B S / 1 % F B S ( v / v ) 中で 1 : 1 0 0 0 に希釈した P E 抱合 F ( a b ' ) <sub>2</sub> ヤギ抗マウス I g G (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.、米国ペンシルベニア州) でインキュベートした。氷上で 3 0 分に亘りプレートをインキュベートし、P B S を用いて細胞を 2 回洗浄した。細胞プレートを、1 % のホルマリン (Richard Allen Scientific、米国ミシガン州) 中に再懸濁し、抗体の結合を F A C S s c a n (Becton and Dickinson Biosciences、米国カリフォルニア州) 上で測定した。

#### 【0144】

アイソタイプの決定

精製された M A b s のアイソタイプの決定は、2 つの市販キット、すなわち mono-AB-ID SPキット (Zymed Laboratories、米国カリフォルニア州) と、マウスモノクローナル抗体のアイソタイプ決定キットである Isostrip (Roche Diagnostics Corporation、米国インディアナ州) とを用いて行った。

#### 【0145】

モノクローナル抗体のビオチン標識

長鎖ビオチンの N - ヒドロキシサクシニアミド (hydroxysuccinamide) エステル (LCB-NH

10

20

30

40

50

S、Pierce、米国)を介して、IgGにビオチンを共有結合的にカップリングした。DM SO中にLCB-NHSを溶かし(2mg/ml)、抗体1mgに対して100μgの割合でビオチンを加え、2時間に亘りインキュベートした。4でのPBSに対する大規模な透析により遊離ビオチンを除去した。次いでビオチン標識した抗体を滅菌濾過し、4で保存した。

#### 【0146】

競合結合ELISAによる抗体エピトープの決定

1ウェル当たり、ヘプシン(1μg/ml)を含む0.05Mの炭酸バッファー(pH 9.6)100μlを用いてマイクロタイプレートを4で一晩コートした。プレートをPBS/0.05%(v/v)Tween 20で洗浄し、PBS/0.5%のBSA/0.05%のTween 20で30分間ブロックした。標識していない精製抗体(20μg/ml)を1時間かけて室温でインキュベートした後、ビオチン標識した抗体(2μg/ml)を添加した。1時間のインキュベーション後、1:5000に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ抱合ストレプトアビジン(Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.、米国ペンシルベニア州)により、ビオチン標識した抗体を検出した。マイクロプレートリーダー上で630nmにおける吸光度を測定した。

10

#### 【0147】

ヘプシンによるPro-uPA活性化

2-クニツインヒビターHAI-2の可溶形態を、pro-uPA活性化アッセイの停止試薬として使用した。酵素試験で検証したところ、HAI-2はヘプシンの活性を強力に阻害したが、uPA活性は阻害しなかった。ヘプスバッファー(20nMのヘプス(pH 7.5)、150mMのNaCl、5mMのCaCl<sub>2</sub>、0.01%のトリトンX-100)中において、0.5nMのヘプシン又は10nMのuPAを用いて30分間に亘り、室温でHAI-2をインキュベートした。発色基質S2366(ヘプシン用)又はS2444(uPA用)を、別の実験で決定されるそれぞれのK<sub>m</sub>値に対応する濃度で添加した。基質の添加後、動態マイクロプレートリーダー(Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベール)上で405nmでの吸光度の増大を測定した。結合を強く阻害するための方程式にデータを当てはめることにより、K<sub>i</sub><sup>app</sup>値を決定した(参考文献22、23)。

20

pro-uPA活性化アッセイでは、精製した抗体又はKD1を、ヘプシンとともに30分間インキュベートし、pro-uPAを添加することにより反応を開始させた。この混合物中の反応物の濃度は、ヘプシン0.5nM、pro-uPA 100nM、抗体710nM及びKD1 71nMであった。異なる時点で50μlのアリコート除去し、0.15mlのHAI-2を含むヘプスバッファーに添加し、反応を止めた。50μlのS2444(2.5mM)の添加後、405nmにおける吸光度の増大を、動態マイクロプレートリーダー(Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベール)上で測定した。各時点で形成されたuPAの濃度を、酵素的に転換されたpro-uPAの標準曲線及び算出されたuPA形成の線形変化率に基づいて決定した。全ての測定は室温で行った。

30

#### 【0148】

発色基質アッセイ

精製した抗体又はHAI-1Bで誘導したKD1インヒビター(参考文献19)を、0.25nMのヘプシンとともに30分間ヘプスバッファー中でインキュベートした。発色基質S2366を添加した後、酵素活性をモニターした。反応物の最終濃度は、ヘプシン0.25nM、抗体500nM、KD1 50nM、及びS2366 0.25mMであった。405nmにおける吸光度の増大を、動態マイクロプレートリーダー上で測定し、その結果を酵素活性割合(v<sub>i</sub>/v<sub>0</sub>)で表わした。全ての測定は室温で行った。

40

#### 【0149】

免疫プロットティング

免疫プロットティングの実験用として、可溶性の組換えヘプシンを、還元条件下で4~20%のSDS-PAGEにより分析した。Bio-Rad Semi Dry Transfer Systemを使用して

50

タンパク質をニトロセルロースフィルタ (Invitrogen) 上に移した。マウスのモノクローナル抗ヘプシン抗体 (2 D 5、3 H 1 0、1 F 2、1 E 7、3 H 1)、その後 H R P 結合ヤギ抗マウス抗体 (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を使用し、E C L (GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ) 増強を行って、ヘプシンを検出した。

【 0 1 5 0 】

結果

5つのモノクローナル抗ヘプシン抗体が生成された。これらは直接 E L I S A 型結合アッセイにおいてヘプシンに対する強い結合を示した (図 3)。最も弱い結合を示したのは 1 E 7 . 1 . 1 であった。クロスブロッキング実験を行って、抗体に関連する結合エピトープを同定した。抗体 3 H 1 . 1 . 1、3 H 1 0 . 1 . 2 及び 1 F 2 . 1 . 1 は、互いに、ヘプシンへの結合を阻害し (図 4)、これによりそれらがエピトープ A と呼ばれる共通のエピトープを共有することが示唆された。2 D 5 . 1 . 9 及び 1 E 7 . 1 . 1 は他のいずれの抗体にも阻害されず (図 4)、これによりそれぞれエピトープ B 及び C と呼ばれる別々のエピトープに結合することが示唆された (図 1)。抗体のアイソタイプが決定され、図 1 に示されている。2つの LnCaP 細胞株を生成し、細胞表面上に発現されるヘプシンを抗体が認識するかどうかを試験した。リアルタイム R T - P C R の結果から、LnCaP - 3 4 細胞株がヘプシンを過剰発現する一方、LnCaP - 1 7 細胞株が内在性レベルのヘプシンしか発現しないことが判明した (データは示さない)。5つの抗体の F A C S 分析により、それらがすべて細胞表面に結合することが示された。直接結合 E L I S A の結果と一貫して、1 E 7 . 1 . 1 の結合性が最も弱かった。LnCaP - 3 4 細胞のヘプシン R N A の発現レベルが高いことと一貫して、蛍光強度の平均が高まったことにより示されるように、抗体の蛍光シグナルはこれら細胞により強まった (図 1)。これは、2つの LnCaP 細胞株に対する 3 H 1 0 . 1 . 2 の結合を示す図 5 のヒストグラムによって例証された。この結果により、抗体が、可溶性の組換え形態だけでなく、細胞表面に発現された完全長天然ヘプシンを認識できることが示された。次に、抗体がヘプシンの酵素機能に干渉するかどうかを決定した。パラ - ニトロアニリド基質 S 2 3 6 6 を用いた発色基質アッセイでは、5 0 0 n M の濃度でヘプシンの活性に干渉した抗体は無かった (図 6)。ポジティブコントロールとして強力なヘプシンインヒビターである K D 1 を使用し、これにより 5 0 n M の濃度においてヘプシンの活性が完全に阻害された。更に、抗体を、ヘプシン依存性 p r o - u P A 活性アッセイで試験した。ヘプシンを強力に阻害するが u P A は阻害しない (図 2) クニッツ型インヒビター H A I - 2 の使用により、複数の異なる時点で反応を止め、アッセイの第 2 段階で形成された u P A を定量化することができた。抗体又は K D 1 の存在下での u P A 形成の線形の変化率を図 7 に示す。u P A の形成率を有意に阻害した抗体は無かったが、K D 1 はその反応を完全に阻害した (図 7 表 1)。これらの結果により、抗体は、ヘプシンが媒介する小合成の活性にも、高分子基質にも干渉しないことが示唆された。したがって、結合エピトープはヘプシン活性部位の外側に位置する可能性が高く、抗体の結合が、活性部位の高次構造にアロステリックに影響することはなく、少なくとも p r o - u P A 又は S 2 3 6 6 基質のプロセッシングに有害となりうる範囲ではない。

免疫プロットングによる実験により、抗体が、ヘプシンの 3 0 k D a プロテアーゼドメイン (= B 鎖) に結合することが示された。抗体によって 2 0 k D a A 鎖は検出されず (図 8)、これにより結合エピトープがプロテアーゼドメインに含まれることが示された。

【 0 1 5 1 】

本明細書に記載した抗ヘプシンモノクローナル抗体は、可溶性ヘプシン及び細胞表面に発現されるヘプシンの両方に結合する。それら抗体は、ヘプシンのプロテアーゼドメインに位置する 3つの異なるエピトープ領域に結合する。酵素の動態学的結果は、それらが活性部位領域の外側に結合することを示すものであり、これにより、ヘプシンの活性部位が内在性のインヒビターによって占められている場合も抗体の結合が可能となる。これは、腫瘍に由来するヘプシンがマトリプターゼに類似の内在性のインヒビターと複合体を形成

しうるので、血中又は尿中のヘプシンの検出に重要である。このような複合体は、人乳中のマトリプターゼ：HAI-1複合体として単離されている（参考文献18）。加えて、変性ヘプシン又は部分的に変性したヘプシンに対する抗体の結合能により、有る程度分解及び/又は変性した腫瘍由来のヘプシンの検出が可能である。

【0152】

下記のハイブリドーマは、アメリカ培養細胞株保存機関（米国メリーランド州ロックビル、パークロンドライブ12301（ATCC））に寄託されている。

細胞株	ATCC寄託番号	寄託日
抗体 4544 (3H10.1.2)	PTA-7472	2006年4月5日
抗体 4545 (2D5.1.9)	PTA-7470	2006年4月5日
抗体 4546 (1F2.1.1)	PTA-7471	2006年4月5日
抗体 4547 (1E7.1.1)	PTA-7473	2006年4月5日
抗体 4548 (3H1.1.1)	PTA-7469	2006年4月5日

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。これらの細胞株は、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、関連した米国特許の発行時、及び任意の米国又は外国特許出願の公開時のうち早い方から、細胞株を永久かつ非制限的に一般に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号886OG638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細胞株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、寄託した細胞株が、適切な条件下で培養されているときに損失又は破壊された場合、通知により細胞株を同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託された細胞株の入手可能性は、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。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0153】

参考文献の部分的リスト

【非特許文献1】Somoza, J. R., Ho, J. D., Luong, C., Ghate, M., Sprengeler, P. A., Mortara, K., Shrader, W. D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M. E.及びKatz, B. A. (2003) *Structure* 11(9), 1123-1131

【非特許文献2】Vu, T. K., Liu, R. W., Haaksma, C. J., Tomasek, J. J.及びHoward, E. W. (1997) *J Biol Chem* 272(50), 31315-31320

【非特許文献3】Yu, I. S., Chen, H. J., Lee, Y. S., Huang, P. H., Lin, S. R., Tsai, T. W.及びLin, S. W. (2000) *Thromb Haemost* 84(5), 865-870

【非特許文献4】Wu, Q., Yu, D., Post, J., Halks-Miller, M., Sadler, J. E.及びMorser, J. (1998) *J Clin Invest* 101(2), 321-326

【非特許文献5】Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G. P.及びO'Brien, T. J. (1997) *Cancer Res* 57(14), 2884-2887

【非特許文献6】Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A.及びChinnaiyan, A. M. (2001) *Nature* 412(6849), 822-826

【非特許文献7】Luo, J., Duggan, D. J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C. M., B

10

20

30

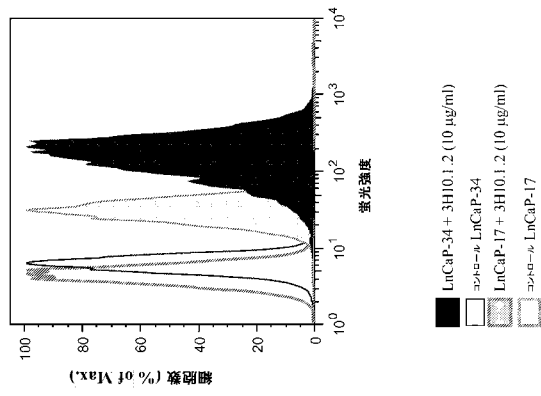
40

50

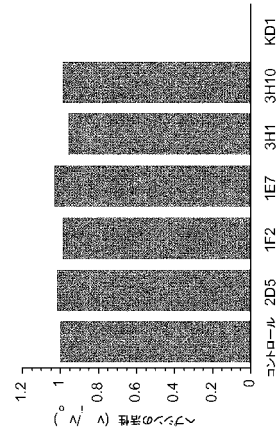
- ittner, M. L., Trent, J. M. 及び Isaacs, W. B. (2001) *Cancer Res* 61(12), 4683-4688  
 【非特許文献 8】 Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Catalona, W. J., Watson, M. A. 及び Milbrandt, J. (2001) *Cancer Res* 61(15), 5692-5696
- 【非特許文献 9】 Stamey, T. A., Warrington, J. A., Caldwell, M. C., Chen, Z., Fan, Z., Mahadevappa, M., McNeal, J. E., Nolley, R. 及び Zhang, Z. (2001) *J Urol* 166(6), 2171-2177
- 【非特許文献 10】 Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A. 及び Diamandis, E. P. (2004) *J Urol* 171(1), 187-191 10
- 【非特許文献 11】 Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr. 及び Hampton, G. M. (2001) *Cancer Res* 61(16), 5974-5978
- 【非特許文献 12】 Xuan, J. A., Schneider, D., Toy, P., Lin, R., Newton, A., Zhu, Y., Finster, S., Vogel, D., Mintzer, B., Dinter, H., Light, D., Parry, R., Polokoff, M., Whitlow, M., Wu, Q. 及び Parry, G. (2006) *Cancer Res* 66(7), 3611-3619
- 【非特許文献 13】 Chen, Z., Fan, Z., McNeal, J. E., Nolley, R., Caldwell, M. C., Mahadevappa, M., Zhang, Z., Warrington, J. A. 及び Stamey, T. A. (2003) *J Urol* 169(4), 1316-1319
- 【非特許文献 14】 Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J. 及び Vasioukhin, V. (2004) *Cancer Cell* 6(2), 185-195 20
- 【非特許文献 15】 Herter, S., Piper, D. E., Aaron, W., Gabriele, T., Cutler, G., Cao, P., Bhatt, A. S., Choe, Y., Craik, C. S., Walker, N., Meininger, D., Hoey, T. 及び Austin, R. J. (2005) *Biochem J* 390(Pt 1), 125-136
- 【非特許文献 16】 Kirchhofer, D., Peek, M., Lipari, M. T., Billeci, K., Fan, B. 及び Moran, P. (2005) *FEBS Lett* 579(9), 1945-1950
- 【非特許文献 17】 Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C. 及び Kisiel, W. (1995) *J Biol Chem* 270(1), 66-72
- 【非特許文献 18】 Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M. 及び Dickson, R. B. (1999) *J Biol Chem* 274(26), 18237-18242 30
- 【非特許文献 19】 Shia, S., Stamos, J., Kirchhofer, D., Fan, B., Wu, J., Corpuz, R. T., Santelli, L., Lazarus, R. A. 及び Eigenbrot, C. (2005) *J Mol Biol* 346(5), 1335-1349
- 【非特許文献 20】 Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A. 及び Moran, P. (2003) *J Biol Chem* 278(38), 36341-36349
- 【非特許文献 21】 Hongo, J. A., Mora-Worms, M., Lucas, C. 及び Fendly, B. M. (1995) *Hybridoma* 14(3), 253-260
- 【非特許文献 22】 Morrison, J. F. (1969) *Biochim Biophys Acta* 185(2), 269-286
- 【非特許文献 23】 Olivero, A. G., Eigenbrot, C., Goldsmith, R., Robarge, K., Artis, D. R., Flygare, J., Rawson, T., Sutherlin, D. P., Kadkhodayan, S., Beresini, M., Elliott, L. O., DeGuzman, G. G., Banner, D. W., Ultsch, M., Marzec, U., Hanson, S. R., Refino, C., Bunting, S. 及び Kirchhofer, D. (2005) *J Biol Chem* 280(10), 9160-9169 40



【 図 5 】

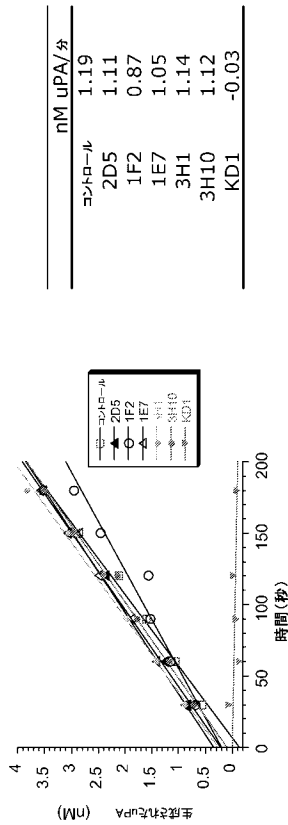


【 図 6 】



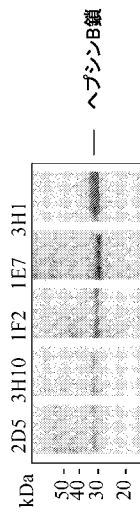
【 図 7 】

表 1



	nM UPA/分
コントロール	1.19
2D5	1.11
1F2	0.87
1E7	1.05
3H1	1.14
3H10	1.12
KD1	-0.03

【 図 8 】





## 【配列表】

2009540835000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成21年3月24日(2009.3.24)

## 【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】

アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2及びLC-HVR3からなる群より選択された少なくとも1つの高頻度可変領域(HVR)配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、単離された抗体。

## 【請求項2】

アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、重鎖及び/又は軽鎖可変ドメイン配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、単離された抗体。

## 【請求項3】

アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2及びLC-HVR3からなる群より選択された少なくとも1つの高頻度可変領域(HVR)配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、免疫グロブリンポリペプチド。

## 【請求項4】

アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体の、重鎖及び/又は軽鎖可変ドメイン配列を含んでなり、且つヒトヘプシンに結合する、免疫グロブリンポリペプチド。

## 【請求項5】

ヒトヘプシン上の、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体と同じエピトープに結合する単離された抗体。

## 【請求項6】

ヒトヘプシンへの結合について、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)に、寄託番号PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472又はPTA-7473の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって生成された抗体と競合する、単離された抗体。

## 【請求項7】

抗体の完全長IgG形態が、150nM以上のEC<sub>50</sub>結合親和性でヒトヘプシンに特異的に結合する、請求項1ないし6のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項8】

EC<sub>50</sub>結合親和性が120nM以上である、請求項7に記載の抗体。

## 【請求項9】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 100 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 75 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 11】

EC<sub>50</sub> 結合親和性が 50 nM 以上である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 12】

天然の、部分的に変性した形態又は変性した形態のヘプシンに特異的に結合する、請求項 1 ないし 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

可溶性ヘプシン又は細胞に付着したヘプシンに結合する、請求項 1 ないし 12 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

2006 年発行の Cancer Research, Volume 66, 3611-3619 頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図 4 に例証された抗体 1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21 及び / 又は A24）、又は国際公開第 2004/033630 号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93 頁及び図 15A~D に言及されている抗体 47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1 及び / 又は 72H6）ではない、請求項 1 ないし 13 に記載の単離された抗体。

【請求項 15】

ヒトヘプシンへの結合について、2006 年発行の Cancer Research, Volume 66, 3611-3619 頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図 4 に例証された抗体 1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21 及び / 又は A24）、又は国際公開第 2004/033630 号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93 頁及び図 15A~D に言及されている抗体 47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1 及び / 又は 72H6）と競合しない、請求項 1 ないし 14 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 16】

ヘプシン上の、2006 年発行の Cancer Research, Volume 66, 3611-3619 頁に記載された抗ヘプシン抗体（例えば、図 4 に例証された抗体 1A12、85B11、94A7、A6、A174、A21 及び / 又は A24）、又は国際公開第 2004/033630 号に開示されている単離されたヘプシン抗体（例えば、93 頁及び図 15A~D に言及されている抗体 47A5、14C7、46D12、38E2、37G10、31C1、11C1 及び / 又は 72H6）と同じエピトープに結合しない、請求項 1 ないし 15 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 17】

アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）に、寄託番号 PTA-7469、PTA-7470、PTA-7471、PTA-7472 又は PTA-7473 の下に寄託されたハイブリドーマ細胞株の抗体コード配列によってコードされる、ヘプシン抗体。

【請求項 18】

請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸配列を含んでなる核酸分子。

【請求項 19】

請求項 18 の核酸分子を含んでなる宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載のヘプシン抗体を生成することができる細胞株。

【請求項 21】

抗体が生成される条件下で抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗体を生成する方法。

【請求項 22】

請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗体の有効量と、担体とを含んでなる組成物。

【請求項 23】

試料中におけるヘプシンの存在を診断する方法であって、試料に請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗体を接触させることを含む方法。

【請求項 24】

ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病又は状態の治療のための医薬であって、請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗体の有効量を含有してなり、該抗体が異種性の薬剤に結合している医薬。

【請求項 25】

異種性の薬剤が治療的なものである、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項 26】

異種性の薬剤が標識、細胞障害剤及び / 又は放射性同位元素である、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項 27】

患者が哺乳動物の患者である、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項 28】

患者がヒトである、請求項 27 に記載の医薬。

【請求項 29】

疾病が癌である、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項 30】

癌が、前立腺癌及び卵巣癌からなる群より選択される、請求項 29 に記載の医薬。

【請求項 31】

対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含む方法であって、前記細胞の存在により、対象が、ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病を有していることが示される方法。

【請求項 32】

ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の治療に対する、対象の応答性を予測する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の存在により、対象が当該治療に応答することが示される方法。

【請求項 33】

ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の治療を受けた対象の、微小残存病変をモニターする方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の検出により、微小残存病変の存在が示される方法。

【請求項 34】

ヘプシン発現の調節不全に関連する疾病の疾病状態を対象中に検出する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の検出により、対象中に当該疾病の疾病状態が示される方法。

【請求項 35】

対象がヘプシン発現の調節不全に関連する障害を発症するという予測を評価する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の検出により、対象が当該障害を発症するという予測が示される方法。

【請求項 36】

対象のヘプシン発現の調節不全に関する障害を診断する方法であって、対象が、正常な基準試料中におけるヘプシンの発現レベルより高いレベルでヘプシンを発現する細胞を有するかどうかを決定することを含み、前記細胞の検出により、対象が前記障害を有するこ

とが示される方法。

【請求項 37】

ヘプシンに対する結合能を有する、請求項 1 ないし 17 のいずれか一項に記載の抗ヘプシン抗体、又はその断片を一つ以上含んでなるアレイ又はタンパク質チップ。

【請求項 38】

請求項 37 に記載のアレイ又はタンパク質チップと、対象から採取した試料中におけるヘプシンの発現レベルが正常な基準試料中のヘプシン発現レベルを上回るかどうかを決定することにより、ヘプシンの調節不全に関連する障害を患者に検出するために、当該アレイ又はタンパク質チップを使用することについての指示書とを備えるキット。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2007/071688
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/30 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/033630 A (SCHERING AG [DE]; PARRY GORDON [US]; VOGEL DAVID [US]; WHITLOW MARC [U] 22 April 2004 (2004-04-22) cited in the application page 66, line 23 - page 68, line 10; examples 5-9  ----- -/-	1-30, 37, 38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search  10 December 2007		Date of mailing of the international search report  12/03/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Loubradou, Gabriel

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/071688

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>XUAN J-A ET AL: "Antibodies neutralizing hepsin protease activity do not impact cell growth but inhibit invasion of prostate and ovarian tumor cells in culture"            CANCER RESEARCH 01 APR 2006 UNITED STATES, vol. 66, no. 7, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 3611-3619, XP002461477            ISSN: 0008-5472            cited in the application abstract            page 3612, right-hand column, paragraph 4 - page 3613, left-hand column, paragraph 2; figures 2,4-6            page 3615, left-hand column, paragraph 3 - page 3617; paragraph 1            page 3618, right-hand column, paragraph 1</p>	1-30,37, 38
A	<p>WO 03/016484 A (AFFYMETRIX INC [US])            27 February 2003 (2003-02-27)            claims 13,50,71</p>	
A	<p>HAAB BRIAN B: "Antibody Arrays in cancer research"            MOLECULAR &amp; CELLULAR PROTEOMICS, vol. 4, no. 4, April 2005 (2005-04), pages 377-383, XP002461478            ISSN: 1535-9476            the whole document</p>	
A	<p>LANDERS K A ET AL: "Use of Multiple Biomarkers for a Molecular Diagnosis of Prostate Cancer"            INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 114, 10 May 2005 (2005-05-10), pages 950-956, XP003010224            ISSN: 0020-7136            the whole document</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/071688**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 24 to 30 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

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

1-30, 37, 38

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2007/071688

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-30, 37,38

subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7469, PTA-7470, PTA-7471, PTA-7472 and PTA-7473.

1.1. claims: 1-30, 37, 38 (partially)

Subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7469.

1.2. claims: 1-30, 37, 38 (partially)

subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7470

1.3. claims: 1-30, 37, 38 (partially)

subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7471

1.4. claims: 1-30, 37, 38 (partially)

subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7472.

1.5. claims: 1-30, 37, 38 (partially)

subject-matter related to the antibodies produced by the hybridoma cell line deposited at the ATCC under Accession N° PTA-7473.

2. claims: 31-36

Methods related to the detection of HEPsin in relation with disease/disorders associated with dysregulation of HEPsin expression

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/071688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004033630 A	22-04-2004	AU 2003279754 A1 EP 1558731 A2 JP 2006507813 T	04-05-2004 03-08-2005 09-03-2006
WO 03016484 A	27-02-2003	AU 2002335640 A1	03-03-2003

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/37 (2006.01)	C 1 2 Q	1/37	
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02	A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
		G 0 1 N	37/00	1 0 2

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

(72)発明者 ヴィジ , ラジェシュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2 , サン マテオ , デ サブラ ロード 1 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA14 BA54 CA02 DA02 EA04 HA01 HA15  
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ36 QQ58 QR48 QR55 QR82 QS33  
 4B064 AG26 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB19 CA25 CA44 CA46  
 4C085 AA14 AA19 AA21 BB22 CC23 DD63 EE01 HH03 HH11 KA04  
 KA27 KA29 LL18  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 CA41 DA76 EA22 EA51 FA74

【要約の続き】

細胞株	アイソタイプ <sup>3</sup>	エピトープグループ	直接ELISA <sup>4</sup>	FACS (メジアン蛍光)
3H10.1.2	κ, IgG1	A	[+]	LnCaP-34 <sup>1,5</sup> +Mab (1μg/ml)
				LnCaP-17 <sup>2,6</sup> +Mab (1μg/ml)
2D5.1.9	κ, IgG1	B	[+]	189.4
1F2.1.1	κ, IgG2b	A	[+]	86.6
				10.6
1E7.1.1	κ, IgG1	C	[+]	7.1
3H1.1.1	κ, IgG2b	A	[+]	4.8
				112.4
				10.6

<sup>1</sup> LnCaP-34; ルシフェラーゼ  
及びヘプシンで同時形質移入した  
LnCaP

<sup>2</sup> LnCaP-17; 内在性  
ヘプシンと共にルシフェラーゼ  
を過剰発現するLnCaP

<sup>3</sup> Isostrip (Roche  
Diagnostics Corporation,  
IN, USA) 及びモノ AB-ID  
SP kit (Zymed  
Laboratories, CA USA)

<sup>4</sup> ヒトヘプシン -His8

<sup>5</sup> LnCaP-34 コントロールメジアン  
蛍光 : 6.3

<sup>6</sup> LnCaP-17 コントロールメジアン  
蛍光 : 4.5

专利名称(译)	用于靶向hepsin的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009540835A</a>	公开(公告)日	2009-11-26
申请号	JP2009516706	申请日	2007-06-20
[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	キルヒホファーダニエルケイ ヴィジラジェシュ		
发明人	キルヒホファー, ダニエル ケイ. ヴィジ, ラジェシュ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 C07K16/40 A61K39/395 A61K51/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	C07K16/3069 A61K2039/505 C07K16/30 C07K16/40		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 C07K16/40 A61K39/395.L A61K39/395.Y A61K49/02.A A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA14 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ58 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS33 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA21 4C085/BB22 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/805589 2006-06-22 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了抗hepsin单克隆抗体，以及使用该抗体的方法。

Cell Line	Isotype <sup>1</sup>	Epitope Group	Direct ELISA <sup>4</sup>	FACS (Median Fluorescence)	
				LuCaP-34 <sup>2</sup> +MAb (1 µg/ml)	LuCaP-17 <sup>2</sup> -MAb (1 µg/ml)
3H11.12	κ IgG1	A	[+]	118.4	30.2
2D5.1.9	κ IgG1	B	[+]	189.4	32.8
1P2.1.1	κ IgG2b	A	[+]	94.6	10.6
1E7.1.1	κ IgG1	C	[+]	7.1	4.8
3H11.12	κ IgG2b	A	[+]	112.4	10.6

<sup>1</sup> LuCaP-34: LuCaP co-transfected with luciferase and hepsin  
<sup>2</sup> LuCaP-17: LuCaP overexpressing luciferase with endogenous hepsin  
<sup>3</sup> Isostrip (Eitest Diagnostis Corporation, IN, USA) and mono AB-ID SP kit (Zymed Laboratories, CA USA)  
<sup>4</sup> Human hepsin-1188  
<sup>5</sup> LuCaP-34 control median fluorescence: 6.3  
<sup>6</sup> LuCaP-17 control median fluorescence: 4.5