

(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2007-534694

(P2007-534694A)

(43) 公表日 平成19年11月29日(2007.11.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

- (21) 出願番号 特願2007-509713 (P2007-509713)
- (86) (22) 出願日 平成17年4月22日 (2005.4.22)
- (85) 翻訳文提出日 平成18年12月25日 (2006.12.25)
- (86) 国際出願番号 PCT/US2005/014084
- (87) 国際公開番号 W02005/117970
- (87) 国際公開日 平成17年12月15日 (2005.12.15)
- (31) 優先権主張番号 60/564, 885
- (32) 優先日 平成16年4月23日 (2004.4.23)
- (33) 優先権主張国 米国 (US)
- (31) 優先権主張番号 60/565, 158
- (32) 優先日 平成16年4月23日 (2004.4.23)
- (33) 優先権主張国 米国 (US)
- (31) 優先権主張番号 60/571, 566
- (32) 優先日 平成16年5月14日 (2004.5.14)
- (33) 優先権主張国 米国 (US)

- (71) 出願人 500203709  
アムジェン インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 913  
20, サウザンド オークス, ワン  
アムジェン センター ドライブ
- (74) 代理人 100089705  
弁理士 社本 一夫
- (74) 代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎
- (74) 代理人 100075270  
弁理士 小林 泰
- (74) 代理人 100080137  
弁理士 千葉 昭男
- (74) 代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD148の血管形成阻害ドメインの抗体

(57) 【要約】

抗CD148抗体およびその抗原結合性領域、並びにこうした抗体および抗原結合性領域を含む薬剤組成物を記載する。やはり記載するのは、こうした抗体および抗原結合性領域を用いて、CD148エピトープに結合させ、そしてCD148機能、例えば血管形成阻害を活性化する方法である。CD148機能および抗血管形成活性を活性化するのに使用可能なエピトープ、並びにこうしたエピトープに結合可能な剤を同定する方法もまた、記載する。

Ab-1 VS Domain

```

      10      20      30      40      50      60
Query : GAGGTCACCTGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGTTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTC
Frame1 : E V Q L L L E S G G G L V Q P G G S L R L
      70      80      90     100     110     120
Query : CCGTGGACGCTCTGGATCACTTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTC
Frame1 : S C K A S G F T F S G L A W V R Q A
      130     140     150     160     170     180
Query : CAGGGAGGCGCTGGAGTGGGTCCTCAAGAGGCTGGGGGTCCCTGAGACTC
Frame1 : P G K G L E H V S G L A W V R Q A
      190     200     210     220     230     240
Query : CGTTGGACGCTCTGGATCACTTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTC
Frame1 : S C K A S G F T F S G L A W V R Q A
      250     260     270     280     290     300
Query : CTGCAATGACAGCCTGAGGCGAGGACACGGCCCTCTATTACTGTCCGAGACTC
Frame1 : L Q M N S L R A E D T A V Y C A R G L
      310     320     330     340     350     360
Query : GGGGCGAAGGACAAAGTCAGCCCTCCGAGTCTGGGGGTCCCTGAGACTC
Frame1 : W G Q G T H V T V S G
  
```

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト CD148 エピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 2】

血管形成を阻害する、請求項 1 の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 3】

モノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 4】

ヒト抗体またはその抗原結合性領域である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 5】

s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、および一本鎖抗体からなる群より選択される抗体断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 6】

s c F v 断片を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項の単離ヒト抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 7】

s c F v - F c 融合体を含むかまたは s c F v - F c 融合体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 8】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト CD148 エピトープに対する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項のモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害する、単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 9】

血管形成を阻害する、請求項 8 の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 10】

モノクローナル抗体である、請求項 8 または 9 の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 11】

ヒト抗体である、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 12】

s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、および一本鎖抗体からなる群より選択される抗体断片である、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 13】

s c F v 断片を含む、請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項の単離ヒト抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 14】

s c F v - F c 融合体を含むかまたは s c F v - F c 融合体である、請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項の抗体またはその抗原結合性領域を産生する、ハイブリドーマ細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項の抗体またはその抗原結合性領域を産生する、トランスフェクターマ細胞。

## 【請求項 17】

ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物から得られ、不死化細胞に融合された、B 細胞を含む、ハイブリドーマによって産生された、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 18】

ヒト重鎖およびヒト軽鎖をコードする核酸を含むトランスフェクターマによって産生された、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項の単離抗体またはその抗原結合性領域。

10

## 【請求項 19】

請求項 15 のハイブリドーマ細胞または請求項 16 のトランスフェクターマ細胞によって産生された、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域。

## 【請求項 20】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項の抗体またはその抗原結合性領域を発現するトランスジェニック非ヒト動物であって、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、前記非ヒト動物。

## 【請求項 21】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるアミノ酸配列によって定義されるヒト CD148 エピトープに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合性領域を産生する方法であって：ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物を、配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるアミノ酸配列によって定義されるヒト CD148 エピトープ、またはこうしたヒト CD148 エピトープを発現する細胞で免疫して、該動物の B 細胞によって抗体が産生されるようにして；該動物の B 細胞を単離し；そして該 B 細胞を骨髄腫細胞と融合させて、抗体またはその抗原結合性領域を分泌する、不死ハイブリドーマ細胞を形成することを含む、前記方法。

20

30

## 【請求項 22】

請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体またはその抗原結合性領域、およびヒトにおいて薬学的に許容しうるキャリアーを含む、薬剤組成物。

## 【請求項 23】

抗体またはその抗原結合性領域が、療法的有効量で存在する、請求項 22 記載の組成物。

## 【請求項 24】

抗体またはその抗原結合性領域が、少なくとも約 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で存在する、請求項 22 または 23 記載の組成物。

40

## 【請求項 25】

抗体またはその抗原結合性領域が、IgG 抗体またはその抗原結合性領域である、請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項の組成物。

## 【請求項 26】

療法に使用するための請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体または抗原結合性領域。

## 【請求項 27】

血管形成阻害に使用するためである、請求項 26 に明記する使用のための請求項 26 の抗体またはその抗原結合性領域。

50

## 【請求項 28】

血管形成阻害用の薬剤組成物を調製するための、請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体または抗原結合性領域の使用。

## 【請求項 29】

抗体またはその抗原結合性領域が I g G 抗体またはその抗原結合性領域である、請求項 26 または 27 に明記する使用のための請求項 26 または 27 の抗体または抗原結合性領域、あるいは請求項 28 の使用。

## 【請求項 30】

抗体またはその抗原結合性領域が、抗体の s c F v、F v、F a b'、F a b、ディアボディ、直鎖抗体または F ( a b' ) 2 抗原結合性断片を含む、請求項 26、27 または 29 に明記する使用のための請求項 26、27 または 29 のいずれか 1 項の抗体または抗原結合性領域、あるいは請求項 28 または 29 の使用。

10

## 【請求項 31】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるアミノ酸配列、あるいは請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体に結合するその断片いずれかからなる、単離ポリペプチド。

## 【請求項 32】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるアミノ酸配列、あるいは請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体に結合するその断片いずれかから本質的になる、単離ポリペプチド。

20

## 【請求項 33】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるアミノ酸配列、あるいは請求項 1 ~ 14 または 17 ~ 19 のいずれか 1 項の抗体に結合するその断片いずれかを含む、単離ポリペプチドであって、配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択されるもの以外の C D 148 由来のアミノ酸を含まない、前記ポリペプチド。

30

## 【請求項 34】

( a ) 配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト C D 148 エピトープに特異的に結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域によって、ヒト C D 148 への結合が競合的に阻害されることが可能な、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域と、試験試料を接触させ；そして ( b ) 試験試料におけるヒト C D 148 の存在を決定する工程を含む、イムノアッセイ。

40

## 【請求項 35】

抗体またはその抗原結合性領域が、C D 148 が誘導する血管形成阻害を活性化する、請求項 34 のイムノアッセイ。

## 【請求項 36】

配列番号 33 のアミノ酸 315 ~ 329、318 ~ 332、321 ~ 335、324 ~ 338、324 ~ 329、324 ~ 332、324 ~ 335、447 ~ 725、533 ~ 725、715 ~ 973、200 ~ 536、533 ~ 725 および 200 ~ 725 からなる

50

る群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する化合物を同定するための方法であって：配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープと試験化合物を、複合体が形成されるのに十分な時間接触させて、そして複合体中のCD148エピトープまたは化合物を検出することによって、複合体の形成を検出し、複合体が検出されたならば、CD148エピトープに結合する化合物が同定されるようにすることを含む、前記方法。

#### 【請求項37】

配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する化合物を同定するための方法であって：配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるCD148エピトープの三次元構造を定義する原子座標を提供し、そして前記原子座標に基づいて、CD148エピトープに結合可能な化合物を設計するかまたは選択することを含む、前記方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 関連出願に対するクロスリファレンス

本出願は、米国仮出願第60/564,885号、2004年4月23日出願；米国仮出願第60/565,158号、2004年4月23日出願；米国仮出願第60/571,566号、2004年5月14日出願；および米国仮出願第60/585,686号、2004年7月6日出願の優先権を請求する。

#### 技術分野

本発明は、抗CD148抗体、およびこうした抗体を産生するのに用いるCD148の結合エピトープに関する。本発明はまた、こうした抗体を用いて血管形成を阻害する方法にも関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

#### 背景

既存の血管から新規血管を形成する血管形成は、多くの生理学的プロセスおよび病的プロセスに必須である。通常、血管形成は、血管形成促進性因子および抗血管形成因子によってしっかりと制御されているが、癌、目の血管新生病、関節炎、および乾癬などの疾患の場合、このプロセスがうまく働かなくなることがある。Folkman, J., *Nat. Med.*, 1:27-31 (1995)。

#### 【0003】

血管形成は、関節リウマチの炎症性組織拡大(パンナス)を維持する際に重要な役割を果たすと考えられる(Walshら, *Arthritis Res.*, 3:147-153 (2001))。実際、制御が解除された血管形成または望ましくない血管形成と関連することが知られるいくつかの疾患がある。Carmelietら, *Nature* 407:249-257 (2000)を参照されたい。こうした疾患には、限定されるわけではないが、目の血管新生、例えば網膜症(糖尿病網膜症を含む)、加齢性黄斑変性症、乾癬、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、炎症性疾患、例えばリウマトイドまたはリウマチ性炎症性疾患、特に関節炎(関節リウマチを含む)、または他の慢性炎症性障害

10

20

30

40

50

、例えば慢性喘息、動脈性または移植後アテローム硬化症、子宮内膜症、および新生物疾患、例えばいわゆる固形腫瘍および液性（または造血）腫瘍（例えば白血病およびリンパ腫）が含まれる。望ましくない血管形成に関連する他の疾患が、当業者には明らかであろう。

【0004】

多くのシグナル伝達系が血管形成の制御に関連付けられているが、最近性質決定された内皮細胞系は、CD148受容体チロシンキナーゼ（種およびcDNA起源に応じて、DEP-1（密度増進ホスファターゼ）、ECRTP（内皮細胞受容体チロシンホスファターゼ）、HPTP、またはBYPとも称される）を伴う。

【0005】

CD148は、哺乳動物膜貫通タンパク質であり、III型密度増進受容体タンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）としても知られる、内皮細胞表面受容体クラスに属する。タンパク質チロシンリン酸化は、増殖および分化、細胞周期進行、並びに細胞骨格機能を含む、基本的細胞プロセスを調節する、シグナル伝達経路の必須の要素である。受容体タンパク質チロシンキナーゼ（PTK）にリガンドが結合すると、酵素のターゲット基質中のチロシン残基の自己リン酸化が触媒され、一方、受容体PTPにリガンドが結合すると、脱リン酸化が触媒される。ターゲット基質の細胞内チロシンリン酸化レベルは、PTKおよびPTP間のバランスによって決定される。PTKは、細胞増殖促進に重要な役割を果たし、一方、PTPは細胞増殖を阻害することによって、PTK活性を下方制御する。CD148は、赤血球前駆細胞の分化を促進し、他のシグナル伝達タンパク質と架橋された際、リンパ球機能を調節し、そしてCD148タンパク質を過剰発現する乳癌細胞株のクローン性発現を阻害することが示されてきている。細胞増殖阻害剤としてのその役割を確認するものとして、最近、CD148は、細胞遊走および増殖に必要な必須の生物学的活性である血管形成を遮断する阻害性シグナルを仲介することもまた示されており、これによって、CD148は、CD148が仲介する腫瘍増殖関連血管形成の阻害を活性化することによる癌の治療の重要なターゲットとなる。

【0006】

他の受容体タンパク質チロシンホスファターゼと同様、CD148は、触媒ドメインを含む細胞内カルボキシル部分、単一の膜貫通ドメイン、および細胞外アミノ末端ドメイン（Ig様ドメインのものと類似のフォールディングパターンを有する、5つのタンデムなIII型フィブロネクチン（FNIII）リピートを含む）を有する。該FNIIIドメインは、ホスホチロシン残基に対する絶対的な特異性、基質タンパク質に対する高親和性、およびPTKのものより数桁高い比活性を有する。FNIIIドメインは、タンパク質/タンパク質相互作用に関与すると考えられる。CD148が活性化されると、CD148の自己リン酸化が誘発されて、生物学的シグナルが伝達され、血管形成の阻害が生じる。

【0007】

米国特許第6,552,169号は、ヒトDEP-1（CD148）に関連するポリヌクレオチド配列、および該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対して生成されたポリクローナル抗体を開示する。

【0008】

米国特許第6,248,327号は、血管形成におけるCD148の役割を開示し、そしてCD148の外部ドメインに特異的に結合する組成物を投与することによって、哺乳動物において血管形成を調節する方法を提供し、そしてまた、CD148外部ドメインの特定されない領域に特異的に結合して、CD148抗血管形成活性を活性化する、モノクローナル抗体の使用も開示する。

【0009】

大部分の固形腫瘍は、直径1~2ミリメートルを超えて増殖するには、血管新生を必要とするため、有効なCD148活性化療法は、非常に多数の癌患者集団に有益である可能性もある。こうした療法は、他の血管形成関連疾患、例えば網膜症、関節炎、および乾癬

10

20

30

40

50

においてもまた、より広い適用を有する可能性もある。

【0010】

CD148を特異的に認識し、そしてこれに結合する新規剤を同定する必要性があり、開発途上である。こうした剤は、CD148活性に関連する疾患状態における診断スクリーニングおよび療法介入に有用であろう。

【0011】

したがって、CD148活性を活性化する、CD148の特異的結合剤を提供するのが本発明の目的である。本発明のこうした剤は、CD148エピトープに特異的に結合する抗体およびその断片の形を取る。

【0012】

本明細書に引用する特許、特許出願、および他の文書すべての開示は、完全に、本明細書に明確に援用される。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明の開示

本発明は、炎症および/または血管形成の阻害に関与するCD148エピトープに結合する、抗CD148抗体、またはその抗原結合性領域を提供し、こうした抗体は、炎症および血管形成関連疾患の治療に使用可能である。特定の態様において、抗体またはその抗原結合性領域は、ヒト抗体またはその抗原結合性領域に由来する。他の態様において、抗体またはその抗原結合性領域は、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および一本鎖抗体からなる群より選択され、そして特に、scFv断片であることも可能であり、そしてより具体的には、scFv-Fc融合体であることも可能である。別の特定の態様において、抗体またはその抗原結合性領域は、IgGアイソタイプ、例えばIgG2アイソタイプである。

【0014】

本発明の1つの側面は、CD148のFN1ドメイン2、3、4または5によって定義されるCD148エピトープに結合する、単離抗体またはその抗原結合性領域を提供する。特定の態様において、本発明の抗体は、配列番号33のアミノ酸315~329、318~332、321~335、324~338、324~329、324~332、324~335、447~725、533~725、715~973、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合性領域を含む。さらに別の態様において、本発明の抗体は、配列番号33のアミノ酸315~329、318~332、321~335、324~338、324~329、324~332、324~335、447~725、533~725、715~973、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに対する上記モノクローナル抗体の結合を競合的に阻害する、単離抗体またはその抗原結合性領域を含む。さらに特定の態様において、本発明の抗体は、配列番号33のアミノ酸324~338および321~335からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合するが、配列番号33のアミノ酸残基324~331のポリペプチド配列には結合しない、単離抗体またはその抗原結合性領域を含む。こうした抗体の例には、抗体Ab-1、Ab-2、Ab-3、Ab-4、Ab-5、Ab-6、Ab-7、およびAb-8が含まれる。

【0015】

本発明の別の側面は、本発明の抗体またはその抗原結合性領域を産生するハイブリドーマ細胞およびトランスフェクター細胞、並びにこうしたハイブリドーマ細胞およびトランスフェクター細胞によって産生された抗体またはその抗原結合性領域を提供する。ハイブリドーマは、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するト

10

20

30

40

50

ランスジェニック非ヒト動物から得られ、不死化細胞に融合された、B細胞を含むことも可能である。トランスフェクターマは、ヒト重鎖およびヒト軽鎖をコードする核酸を含むことも可能である。

【0016】

本発明の別の側面は、本発明の抗体またはその抗原結合性領域を発現するランスジェニック非ヒト動物であって、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、前記非ヒト動物を提供する。

【0017】

本発明の別の側面は、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合性領域を産生する方法であって：ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するランスジェニック非ヒト動物を、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列によって定義されるヒトCD148エピトープ、またはこうしたヒトCD148エピトープを発現する細胞で免疫して、該動物のB細胞によって抗体が産生されるようにして；該動物のB細胞を単離し；そして該B細胞を骨髓腫細胞と融合させて、抗体またはその抗原結合性領域を分泌する、不死ハイブリドーマ細胞を形成することを含む、前記方法を提供する。

【0018】

本発明の別の側面は、抗体またはその抗原結合性領域、およびヒトにおいて薬学的に許容しうるキャリアーを含む、薬剤組成物を提供する。特定の態様は、療法的有効量で、例えば少なくとも約10μg/mlの濃度で存在する、抗体またはその抗原結合性領域を提供する。

【0019】

本発明の別の側面は、血管形成を阻害するための方法であって、こうした方法を必要とする患者に、療法的有効量の本発明の抗体またはその抗原結合性領域を投与することを含む、前記方法を提供する。

【0020】

本発明の別の側面は、CD148エピトープであって、これに結合するとCD148が仲介する生物学的活性が活性化される該エピトープを提供する。本発明のCD148エピトープには、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列、あるいは本発明の抗体またはその抗原結合性領域に結合するその断片いずれかを含む、単離ポリペプチドであって、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択されるもの以外のCD148由来のアミノ酸を含まない、前記ポリペプチドが含まれる。別の態様において、本発明は、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列、あるいは本発明の抗体またはその抗原結合性領域に結合するその断片いずれかからなる、単離ポリペプチドを提供する。さらに別の態様において、本発明は、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324



～ 3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のアミノ酸配列、あるいは本発明の抗体またはその抗原結合性領域に結合するその断片いずれかから本質的になる、単離ポリペプチドを提供する。

【0021】

本発明の別の側面は：(a) 配列番号 33 のアミノ酸 3 1 5～3 2 9、3 1 8～3 3 2、3 2 1～3 3 5、3 2 4～3 3 8、3 2 4～3 2 9、3 2 4～3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列、あるいは本発明の抗体またはその抗原結合性領域に結合するその断片いずれかによって定義されるヒト CD 1 4 8 エピトープに特異的に結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域によって、ヒト CD 1 4 8 への結合が競合的に阻害されることが可能な、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域と、試験試料を接触させ；そして (b) 試験試料におけるヒト CD 1 4 8 の存在を決定する工程を含む、イムノアッセイを提供する。

10

【0022】

本発明の別の側面は、配列番号 33 のアミノ酸 3 1 5～3 2 9、3 1 8～3 3 2、3 2 1～3 3 5、3 2 4～3 3 8、3 2 4～3 2 9、3 2 4～3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト CD 1 4 8 エピトープに特異的に結合する化合物を同定するための方法であって：配列番号 33 のアミノ酸 3 1 5～3 2 9、3 1 8～3 3 2、3 2 1～3 3 5、3 2 4～3 3 8、3 2 4～3 2 9、3 2 4～3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト CD 1 4 8 エピトープと試験化合物を、複合体が形成されるのに十分な時間接触させて、そして複合体中の CD 1 4 8 エピトープまたは化合物を検出することによって、複合体の形成を検出し、複合体が検出されたならば、CD 1 4 8 エピトープに結合する化合物が同定されるようにすることを含む、前記方法を含む。

20

【0023】

本発明のさらに別の側面は、配列番号 33 のアミノ酸 3 1 5～3 2 9、3 1 8～3 3 2、3 2 1～3 3 5、3 2 4～3 3 8、3 2 4～3 2 9、3 2 4～3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義されるヒト CD 1 4 8 エピトープに特異的に結合する化合物を同定するための方法であって：配列番号 33 のアミノ酸 3 1 5～3 2 9、3 1 8～3 3 2、3 2 1～3 3 5、3 2 4～3 3 8、3 2 4～3 2 9、3 2 4～3 3 2、3 2 4～3 3 5、4 4 7～7 2 5、5 3 3～7 2 5、7 1 5～9 7 3、2 0 0～5 3 6、5 3 3～7 2 5 および 2 0 0～7 2 5 からなる群より選択される 1 以上のポリペプチド配列によって定義される CD 1 4 8 エピトープの三次元構造を定義する原子座標を提供し、そして前記原子座標に基づいて、CD 1 4 8 エピトープに結合可能な化合物を設計するかまたは選択することを含む、前記方法である。

30

40

発明を実行する最適の様式 (単数または複数)

本発明をより容易に理解可能にするため、特定の用語をまず定義する。さらなる定義を詳細な説明の全体に示す。

定義

単位、接頭辞、および記号を、SI に認められる型で表示しうる。別に示さない限り、核酸を、5' から 3' の配向で、左から右に書き；アミノ酸配列を、アミノからカルボキシの配向で、左から右に書く。本明細書に列挙する数値範囲は、範囲を定義する数字を包括し、そして定義する範囲内の各整数を含み、そして支持する。アミノ酸は、一般的に知られる 3 文字記号、または IUPAC - IUBMB 命名委員会に推奨される 1 文字記号の

50

いずれかによって、本明細書に言及されうる。同様に、ヌクレオチドは、一般的に認められる1文字暗号によって言及されうる。別に記載しない限り、用語「a」または「an」は、「少なくとも1つの」を意味すると解釈されるものとする。本明細書に用いるセクシヨンの見出しは、構成目的のみのためであり、そして記載する主題を限定すると解釈してはならない。本出願に引用する全文書または文書の一部は、限定されるわけではないが、特許、特許出願、論文、書籍、および専門書を含めて、いかなる目的のためにも、完全に、本明細書に明確に援用される。本出願内で、アミノ酸または核酸配列に相違がある場合は、図が支配する。

#### 【0024】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養および形質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）には、標準的技術を用いる。製造者の指定にしたがって、または当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載するように、酵素反応および精製技術を行う。概して、当該技術分野に周知の慣用法にしたがって、そして本明細書全体に引用され、そして論じられる、多様な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載されるように、前述の技術および方法を行う。例えば、本明細書に援用される、Sambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1989））を参照されたい。本明細書記載の分析化学、合成有機化学、並びに医学的および薬学的化学と関連して利用する命名法、並びにこうした化学の実験法および技術は、当該技術分野に周知であり、そして一般的に知られるものである。化学合成、化学分析、薬剤調製、配合、および送達、並びに患者の治療には、標準的技術を用いる。

#### 【0025】

本開示にしたがって利用するような、以下の用語は、別に示さない限り、以下の意味を有すると理解すべきである：

用語「ヒトCD148」は、本明細書に援用されるOstmanら、Proc Natl Acad Sci USA 91:9680-9684（1994）において、ヒトECRTP/DEPと同定されるタンパク質であり、そのアレル変異体を含む。「ヒトCD148の細胞外ドメイン」によって、本明細書に援用され、そしてワールドワイドウェブ上、ncbi.nlm.nih.govで入手可能な、NCBI（米国バイオテクノロジー情報センター）寄託番号AAB36687、バージョンAAB36687.1 GI:1685075、1996年11月26日提出のほぼ残基36~973（残基1~35はリーダー配列であり、そして成熟型には存在しない）の間に位置するヒトCD148の部分の意味する。

#### 【0026】

用語「抗体」は、アイソタイプまたはサブクラスあるいはその組み合わせのいずれかのグリコシル化免疫グロブリンおよび非グリコシル化免疫グロブリンを両方含み、こうした抗体が、完全にまたは部分的に、免疫を介して、組換え技術を通じて、in vitro合成手段によって、あるいは別の方法で産生されるのであれ、ヒト（CDR移植抗体を含む）、ヒト化、キメラ、多重特異性、モノクローナル、ポリクローナル、およびそのオリゴマーを含む。したがって、用語「抗体」には、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離されるもの、例えば（a）ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物（例えばマウス）、または該動物から調製されたハイブリドーマから単離される抗体、（b）抗体を発現するようにトランスフェクションされた宿主細胞から、例えばトランスフェクターマから単離される抗体、（c）組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、および（d）免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む他の手段いずれかによって、調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体が含まれる。こうした抗体は、2つの別個の動物種の生殖系列免疫グロブリン配列に由来する、可変領域および定常領域を有する。しかし、特定の態様において、こうした抗体をin vitro突

10

20

30

40

50

然変異誘発（またはヒト免疫グロブリン配列に関してトランスジェニックである動物を用いる場合、*in vivo*体細胞突然変異誘発）に供することも可能であり、そしてしたがって、抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、特定の種（例えばヒト）の生殖系列VH配列およびVL配列に由来し、そしてこうした配列に関連する一方、*in vivo*で、その種の抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しない可能性もある配列である。

【0027】

完全抗体は、ジスルフィド結合によって相互に連結された、少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖、またはその抗原結合性領域を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において、VHと略す）、および3つのドメインで構成される重鎖定常領域（本明細書において、CH1、CH2およびCH3と略す）で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において、VLと略す）、および1つのドメインで構成される軽鎖定常領域（本明細書において、CLと略す）で構成される。VH領域およびVL領域をさらに、より保存されるフレームワーク領域（FR）と称される領域が散在する、相補性決定領域（CDR）と称される超可変性領域に分割することも可能である。各VHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFRで構成され、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下の順序で配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の多様な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第一の構成要素（C1q）を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を仲介しうる。重鎖または軽鎖のCDRと実質的に同じアミノ酸配列は、参照配列に比較した際、かなりの量または度合いの配列同一性を示し、そして参照配列を有する抗体によって特異的に結合される抗原の特異的結合に有利に貢献する。こうした同一性は、特定のヒト・モノクローナル抗体のアミノ酸配列を代表するものとして、明確に知られ、そして認識可能である。実質的に同じ重鎖および軽鎖CDRアミノ酸配列は、特定の抗原に結合する能力が維持されている限り、例えば、アミノ酸の重大でない修飾または保存的置換を有することも可能である。用語「ヒト・モノクローナル抗体」は、例えば、組換え法、リンパ球またはハイブリドーマ細胞によって産生された、実質的にヒトであるCDRアミノ酸配列を含む、モノクローナル抗体を含むように意図される。

【0028】

用語、抗体の「抗原結合性領域」は、本明細書に開示するように、参照抗体に特異的に結合される抗原（例えばCD148）に特異的に結合する能力を保持する、1以上の抗体断片を意味する。抗体の「抗原結合性領域」には、例えば個々の重鎖または軽鎖およびその断片、例えばVL、VHおよびFd領域；一価断片、例えばFv、Fab、およびFab'領域；二価断片、例えばF(ab')<sub>2</sub>；一本鎖抗体、例えば一本鎖Fv(scFv)領域；Fc断片；ディアボディ；Fd（VHおよびCH1ドメインからなる）、マキシボディ（IgG1のFc（CH2~CH3ドメイン）のアミノ末端に融合した二価scFv）、並びに相補性決定領域（CDR）ドメインが含まれることも可能である。こうした用語は、例えば、本明細書に援用される、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州（1989）；Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R.A. (監修), ニューヨーク: VCH Publisher, Inc.)；Houstonら, *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993)；PluckthunおよびSkerran, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989)およびDay, E.D., *Advanced Immunochimistry*, 第2版, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク（1990）に記載される。用語「抗原結合性領域」はまた、例えば、ヒト・モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化または還元によって、そして当業者に知られる組換えDNA法によって、産生

10

20

30

40

50

される断片も含む。当業者は、断片が機能活性を維持する限り、ヒト・モノクローナル抗体断片の正確な境界は多様であることも可能であることを知っている。周知の組換え法を用いて、当業者は、核酸が、特定の適用に望ましい終点いずれかを持つ機能性断片を発現するように操作することも可能である。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは、別個の遺伝子にコードされるが、組換え法を用いて、VL領域およびVH領域が対を作って一価分子を形成する、一本鎖タンパク質鎖としての作製を可能にする合成リンカーによって、VLおよびVHを連結することも可能である（一本鎖Fv(scFv)として知られる；例えばBirdら(1988) *Science* 242:423-426；およびHoustonら(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883を参照されたい)。こうした一本鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合性領域」内に含まれるよう意図される。当業者に知られる慣用的技術を用いて、これらの抗体断片を得て、そして損なわれていない(intact)抗体と同じ方式で、有用性に関して断片をスクリーニングする。こうした断片には、アミノ末端欠失および/またはカルボキシ末端欠失によって得られるものが含まれるが、この場合、残りのアミノ酸配列は、例えば全長cDNA配列から推定される、天然存在配列中の対応する位と、実質的に同一である。抗原結合性領域はまた、特定の相補性決定領域(CDR)の少なくとも1つの(例えば1、2、3またはそれより多い)重鎖配列および/または少なくとも1つの(例えば1、2、3またはそれより多い)軽鎖配列(すなわち重鎖および/または軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/またはCDR3の少なくとも1以上)を保持する抗体断片も含む。Fc領域(またはその定常重鎖2(CH2)もしくは定常重鎖3(CH3)含有領域)へのCDR含有配列の融合体がこの定義の範囲内に含まれ、例えば、Fcに直接または間接的に融合されたscFvが本明細書に含まれる。抗原結合性領域は、限定されるわけではないが、抗体またはその断片由来のもの(例えば酵素消化またはジスルフィド結合の還元による)、組換え法(例えばトランスフェクターマ)を用いて合成的に産生されるもの、in vitro合成手段(例えばメリフィールド樹脂)を介して生成されるもの、その組み合わせ、あるいは他の手段を通じるものを包括する。抗原結合性領域はまた、合成的、化学的、または別の方式で、オリゴマーの形に一緒に連結された多数の断片、例えばCDR断片を含むことも可能である。したがって、本発明の抗原結合性領域は、いくつかの方法によって産生された、本発明のVH鎖またはVL鎖由来の少なくとも1つのCDRを含む、ポリペプチドを含む(例えばAb-1~Ab-8)。

#### 【0029】

用語「VL断片」は、CDRを含む軽鎖可変領域のすべてまたは一部を含む、ヒト・モノクローナル抗体の軽鎖の断片を意味する。VL断片は、軽鎖定常領域配列をさらに含むことも可能である。

#### 【0030】

用語「Fd断片」は、CDRを含むVH重鎖可変領域のすべてまたは一部を含む、ヒト・モノクローナル抗体の重鎖の断片を意味する。Fd断片は、CH1重鎖定常領域配列をさらに含むことも可能である。

#### 【0031】

用語「Fv断片」は、重鎖および軽鎖の可変領域のすべてまたは一部を含み、そして重鎖および軽鎖の定常領域が存在しない、ヒト・モノクローナル抗体の一価抗原結合性断片を意味する。重鎖および軽鎖の可変領域には、例えばCDRが含まれる。例えば、Fv断片には、重鎖および軽鎖両方の約110アミノ酸のアミノ末端可変領域のすべてまたは一部が含まれる。

#### 【0032】

用語「Fab断片」は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる抗体の一価抗原結合性断片を意味し、Fv断片より大きい。例えば、Fab断片は、重鎖および軽鎖の可変領域、および第一の定常ドメインのすべてまたは一部を含む。したがって、Fab断片は、例えば重鎖および軽鎖の約110~約220のアミノ酸残基をさらに含む。

#### 【0033】

10

20

30

40

50

用語「F a b'断片」は、F a b断片より大きい、ヒト・モノクローナル抗体の一価抗原結合性断片を意味する。例えば、F a b'断片には、軽鎖のすべて、重鎖の可変領域のすべて、並びに重鎖の第一および第二の定常ドメインのすべてまたは一部が含まれる。例えば、F a b'断片には、重鎖のアミノ酸残基220～330のある程度またはすべてがさらに含まれることも可能である。

【0034】

用語「F(a b')<sub>2</sub>断片」は、ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結された2つのF a b断片を含む、ヒト・モノクローナル抗体の二価抗原結合性断片を意味する。F(a b')<sub>2</sub>断片には、例えば、2つの重鎖および2つの軽鎖の可変領域のすべてまたは一部が含まれ、そして2つの重鎖および2つの軽鎖の第一の定常ドメインのすべてまたは一部がさらに含まれることも可能である。

10

【0035】

用語「d A b断片」は、Wardら(1989)Nature 341:544-546に記載されるような、VHドメインからなる断片を意味する。

用語「CDR」は、重鎖および軽鎖ポリペプチド両方の可変領域内に見られる非連続性抗原組み合わせ部位を意味する。この特定の領域は、本明細書に援用される、Kabataら、米国保健福祉省、“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)によって、そしてChothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)によって、そしてさらに、MacCallumら、J. Mol. Biol. 262:732-745(1996)によって、記載されており、定義には、互いに対して比較した際の、アミノ酸残基の重複またはサブセットも含まれる。にもかかわらず、抗体またはその機能性断片のCDRに言及するいずれかの定義の適用は、本明細書に定義し、そして用いるような用語の範囲内にあると意図される。特定のCDRを含む正確なアミノ酸残基数は、CDRの構造に応じて多様であろう。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮して、どの残基が特定のCDRを含むかを日常的に決定可能である。当業者は、同じCDR定義を持つそれぞれの配列の領域または個々のアミノ酸位を定義することによって、2以上の抗体配列を比較することも可能である。

20

【0036】

用語「CDR移植」は、ヒト・フレームワーク上に移植されたネズミCDR(「ヒト」抗体)のように、1つの種由来のCDRが、異なる種のフレームワークに挿入された、抗体または抗原結合性領域を指す。

30

【0037】

用語「類似体」は、推定されるアミノ酸配列の一部に対して実質的同一性を有し、そして以下の特性の少なくとも1つを有する、少なくとも25アミノ酸のセグメントで構成されるポリペプチドを意味する：(1)適切な結合条件下でのCD148に対する特異的結合、(2)CD148リガンドがCD148に結合するのを遮断する能力、または(3)CD148が仲介する血管形成を阻害する能力。典型的には、ポリペプチド類似体は、天然存在配列に対する保存的アミノ酸置換(または付加または欠失)を含む。類似体は、典型的には、少なくとも長さ20アミノ酸、好ましくは少なくとも長さ50アミノ酸以上であり、そしてしばしば、全長天然存在ポリペプチドと同じ長さであることも可能である。

40

【0038】

用語「単離された」は、天然に抗体またはポリペプチドと一緒に見られる1以上の化合物、あるいは例えば試薬、前駆体または他の反応産物を含む、抗体を産生するのに用いる合成反応において見られる1以上の化合物から分離されており、そして好ましくは、療法的使用または診断的使用に干渉するであろう他の混入哺乳動物ポリペプチドのいずれも実質的に含まないことを意味する。単離された剤にはまた、実質的に純粋な剤も含まれる。該用語は、生合成反応の産物などの天然存在分子、または合成分子を含むことも可能である。抗体はまた、例えば、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない場合、「単離された」と見なされる。また、物質が、天然では結合していないポリペプチドまた

50

は他の物質に結合しているかまたはコンジュゲート化されている場合、該物質は「単離され」ている。

【0039】

用語「実質的に純粋な」は、存在する主な種であり（すなわちモル濃度に基づいて、組成物中の他の個々の種いずれよりもより豊富である）、そして存在するすべての巨大分子種の少なくとも約50パーセント（モル濃度に基づいて）を含む、物質を意味する。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての巨大分子種の約80%より多くを含み、あるいは約85%、90%、95%、および99%より多くを含むであろう。物質を本質的に均質に精製し（慣用的検出法によって、組成物中に混入種が検出不能である）、ここで組成物は本質的に単一の巨大分子種からなる。同様に、製造または配合の過程において、物質が、上述のように「単離される」かまたは「実質的に純粋」であり、そして次いで、よく定義された組成物中で他の剤と組み合わせられる場合、よく定義された組成物において、該物質が存在する主な種でないにもかかわらず、該物質は「単離されて」いる。

10

【0040】

本明細書において、用語「特異的に結合する」および「特異的結合」は、化合物が、CD148の成熟、全長または部分長エピトープ、あるいはそのオルソログを優先的にまたは選択的に認識し、そしてこれらに優先的にまたは選択的に結合し、その親和性（例えば、本明細書に記載するような、親和性ELISAまたはBIACOREアッセイによって決定されるようなもの）またはその中和能（例えば、本明細書に記載する中和ELISAアッセイ、または類似のアッセイによって決定されるようなもの）が、他のポリペプチドいずれかに対する該化合物の親和性または中和能の、少なくとも10倍大きく、しかし場合によっては50倍大きく、100倍、250倍または500倍大きく、または少なくとも1000倍にまで大きいほどであることを意味し、ここでこうしたアッセイにおいて評価するため、ペプチボディのペプチド部分は、まず、ヒトFc部分に融合される。典型的には、抗体は、少なくとも約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性で結合し、そしてあらかじめ決定された抗原または緊密に関連する抗原以外の、非特異的抗原（例えばBSA、カゼイン）への結合に関する親和性より、少なくとも2倍高い親和性で、あらかじめ決定された抗原に結合する。本明細書において、抗原を「認識する」か、または抗原に「特異的な」抗体は、抗原に「特異的に結合する」と同等と見なされる。しかし、ヒトCD148の明記するエピトープ、アイソフォームまたは変異体に特異的に結合する抗体は、なお、他の関連抗原、例えば他の種由来の抗原（例えばCD148種相同体）に交差反応性を有する可能性もあり、そしてなお、明記するCD148エピトープに「特異的に結合する」と見なすことも可能である。

20

30

【0041】

用語「エピトープ」は、結合剤の1以上の抗原結合性領域で、明記する結合剤、例えば抗体によって、認識され、そして結合されることが可能な分子いずれかの部分を指す。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的活性表面団からなり、そして通常、特定の三次元構造特性、並びに特定の荷電特性を有する。コンホメーション性エピトープおよび非コンホメーション性エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者に対する結合が失われるが、後者に対する結合が失われない点で区別される。抗体は、解離定数が、約 $1 \mu\text{M}$ 以下、好ましくは約 $100 \text{ nM}$ 以下、そして最も好ましくは $10 \text{ nM}$ 未満である場合、抗原に特異的に結合すると見なされる。本発明の抗体およびこうした抗体の抗原結合性領域には、本明細書に定義するエピトープ決定基を用いて生成されるか、または本明細書に定義するエピトープ決定基に対して実質的同一性を有するエピトープ決定基を用いて生成される、抗体およびその抗原結合性領域が含まれる。これに関連して、用語「実質的同一性」は、修飾エピトープ決定基に結合する抗体が、本明細書記載のエピトープ決定基に対する抗体の結合を競合的に阻害するのに十分な同一性を、配列が共有することを意味する。

40

【0042】

50

句「結合を競合的に阻害する」は、抗体が、別の抗体またはその抗原結合性領域と同じかまたは実質的に同じエピトープまたはその断片を認識するか、これらに結合するか、またはこれらに対する免疫特異性を有することを意味する。本発明に関連して、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択されるアミノ酸配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害する、単離抗体またはその抗原結合性領域は、CD148に対する結合に関して、測定可能に競合することが可能である。典型的には、競合的阻害は、試験する抗体またはその抗原結合性領域の存在下で、ターゲットタンパク質（例えばヒトCD148）に結合する参照抗体または抗原結合性領域の量を決定することによって、測定される。通常、試験する抗体または試験する抗原結合性領域は、5倍、10倍、25倍、または50倍過剰など、過剰に存在する。競合的に結合する抗体または抗原結合性領域は、過剰に存在する場合、統計的に有意な度合いで、しばしば、少なくとも10%、25%、50%、75%、90%またはそれより高い度合いで、ヒトCD148の細胞外ドメインに対する参照抗体または抗原結合性領域の特異的結合を阻害するであろう。競合的阻害アッセイは当該技術分野に周知である。例えばHarlowおよびLane(1998), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, ニューヨークを参照されたい。本明細書において、結合阻害は、部分的小および完全阻害/遮断の両方を含む。阻害および遮断はまた、本発明の抗CD148抗体と接触させた際、CD148に対する特定の抗CD148抗体の結合親和性の測定可能な減少いづれか、例えば少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%の結合遮断を含むよう意図される。

#### 【0043】

配列番号33のアミノ酸447～725、533～725、715～973、324～335、200～536、533～725および200～725からなる群より選択されるアミノ酸配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害する1以上の抗体の同定は、こうしたアミノ酸に定義される上記エピトープの決定を考慮すれば、単純な技術的問題である。配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択されるアミノ酸配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する抗体の生成に際して、CD148に対するこうした抗体の結合を競合的に阻害する抗体の同定は、単純に、参照抗体に比較することによって、容易に決定される。

#### 【0044】

交差反応性抗体の同定は、抗体競合を評価可能な、多様な免疫学的スクリーニングアッセイのいづれか1つを用いて、容易に決定可能である。こうしたアッセイは、当該技術分野において日常的であり、そして本明細書にさらに詳細に記載される。米国特許第5,660,827号、1997年8月26日発行は、所定の抗体と同じかまたは実質的に同じエピトープに結合する抗体をどのように作製するかに関する、現在の解説のさらなる補足を含む目的で、本明細書に具体的に援用される。

#### 【0045】

例えば、調べようとする試験抗体が異なる動物供給源から得られる場合、または異なるアイソタイプのものでさえある場合、単純な競合アッセイを使用することも可能であり、こうしたアッセイにおいて、対照抗体および試験抗体を混合し（またはあらかじめ吸着させ）、そして本明細書記載のCD148エピトープを含有するCD148抗原組成物に適用する。したがって、ELISAおよびウェスタンブロッティングに基づくプロトコルが、こうした単純な競合研究で使用するのに適している。

## 【0046】

特定の態様において、対照抗体と、多様な量の試験抗体（例えば1：10または1：100）を、抗原組成物に適用する前のある期間、あらかじめ混合する。他の態様において、対照および多様な量の試験抗体を、抗原組成物への曝露中に単純に混合することも可能である。いかなる場合も、種またはアイソタイプ二次抗体を用いることによって、結合した対照抗体のみを検出することが可能であり、この結合は、実質的に同じエピトープを認識する試験抗体の存在によって減少するであろう。

## 【0047】

対照抗体および試験抗体いずれかの間の抗体競合研究を行う際（種またはアイソタイプにかかわらず）、対照を、例えばビオチンまたは酵素（または放射性でもよい）標識などの検出可能標識でまず標識して、続く同定を可能にすることも可能である。これらの場合、標識した対照抗体と、調べようとする試験抗体を、多様な比（例えば1：10または1：100）であらかじめ混合するかまたはインキュベーションして、そして（場合によって適切な時間を置いた後）次いで、標識した対照抗体の反応性をアッセイし、そしてこの反応性を、潜在的に競合する試験抗体がインキュベーションに含まれなかった場合の対照の値と比較する。

## 【0048】

ここでも、アッセイは、抗体ハイブリダイゼーションに基づく、ある範囲の免疫学的アッセイのいかなる1つであることも可能であり、そして標識を検出することによって、例えばビオチン化抗体の場合、ストレプトアビジンを用いて、または酵素標識と組み合わせる色素原基質を用いる（例えば3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質とペルオキシダーゼ酵素など）ことによって、または単純に放射性標識を検出することによって、対照抗体を検出する。対照抗体と同じエピトープに結合する抗体は、結合に関して効果的に競合可能であり、そしてしたがって、結合した標識の減少によって立証されるように、対照抗体結合を有意に減少させるであろう。

## 【0049】

完全に無関係の抗体の非存在下では、（標識した）対照抗体の反応性は、対照高値であろう。対照低値は、正確に同じ種類の非標識抗体と標識抗体をインキュベーションすることによって得られ、この場合、競合が起こり、そして標識抗体の結合が減少するであろう。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下で標識抗体反応性が有意に減少することは、試験抗体が同じエピトープを認識する、すなわち試験抗体が標識抗体と「交差反応する」、指標となる。

## 【0050】

句「血管形成を阻害する」は、未処置対照に比較した、血管形成レベルの統計的に有意な減少を意味する。典型的な減少は、少なくとも5～99%であり、そしてしたがって、陰性対照に比較した、血管形成の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の減少を含む。角膜マイクロポケットアッセイおよびヒト腎臓微小血管内皮細胞（HRMEC）平面遊走アッセイなどの血管形成の広く認められた機能アッセイが当該技術分野に知られる。例えば、米国特許第5,712,291号および第5,871,723号を参照されたい。簡潔には、HRMEC平面遊走アッセイは、創傷閉鎖であり、このアッセイは、本発明の抗体または抗原結合性領域による、*in vitro*の血管形成の阻害を定量化するのに使用可能である。このアッセイでは、内皮細胞遊走を、培養細胞単層中の環状創傷の閉鎖速度として測定する。創傷閉鎖速度は線形であり、そして*in vivo*で血管形成を刺激する剤および阻害する剤によって、動的に制御される。マウス角膜ポケットアッセイもまた、本発明の抗体または抗原結合性領域による、*in vivo*の血管形成の阻害を定量化するのに使用可能である。このアッセイにおいて、血管形成活性または抗血管形成活性に関して試験しようとする剤を、ハイドロソール（hydron）ペレット中の緩慢放出型で固定し、これを麻酔したマウスの角膜上皮に生成したマイクロポケットに移植する。血管新生角膜縁から、通常は無血管の角膜内への、血管内部成長の出現、密度、および度合いとして、血管新生を測定する。



## 【0051】

抗体ポリペプチド配列、またはその断片に実質的に同一であり、そしてなお、本発明のCD148エピトープに結合するように、本発明の抗体を修飾可能であることが理解される。ポリペプチド配列は、デフォルト・ギャップ加重を用いたGAPまたはBESTFITなどのプログラムを用いて、最適に並列させた際に、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、または少なくとも99%の配列同一性を共有するならば、「実質的に同一」である。好ましくは、同一でない残基位は、保存的アミノ酸置換によって異なる。保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシ側鎖を有するアミノ酸群は、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸群は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；そしてイオウ含有側鎖を有するアミノ酸群は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、およびアスパラギン - グルタミンである。

10

## 【0052】

本明細書に論じるように、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列の重要でない変動は、アミノ酸配列におけるその変動が、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、そして最も好ましくは99%を維持するという条件で、本発明に含まれると意図される。特に、保存的アミノ酸置換が意図される。保存的置換は、側鎖が関連するアミノ酸ファミリー内で行われるものである。遺伝子にコードされるアミノ酸は、一般的にファミリーに分けられる：(1)酸性(アスパラギン酸、グルタミン酸)；(2)塩基性(リジン、アルギニン、ヒスチジン)；(3)非極性(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)；および(4)非荷電極性(グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン)。より好ましいファミリーは以下のとおりである：セリンおよびスレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり；アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリーであり；アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり；そしてフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、イソロイシンまたはバリンでのロイシンの単一置換、グルタミン酸でのアスパラギン酸の単一置換、セリンでのスレオニンの単一置換、または構造的に関連するアミノ酸でのアミノ酸の類似の置換は、特に置換がフレームワーク部位内のアミノ酸に関与しない場合には、生じる分子の結合または特性に大きな影響を持たないであろう。アミノ酸変化が、機能するペプチドを生じるかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることによって、容易に決定可能である。本明細書にアッセイを詳細に記載する。一般の当業者は、抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体を容易に調製可能である。断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能ドメイン境界近くに存在する。公共のまたは私有の(proprietary)配列データベースに、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを比較することによって、構造ドメインおよび機能ドメインを同定することも可能である。好ましくは、コンピュータ比較法を用いて、既知の構造および/または機能を持つ他のタンパク質に存在する配列モチーフまたは予測されるタンパク質コンホメーションドメインを同定する。既知の三次元構造にフォールディングするタンパク質配列を同定する方法が知られる。Bowieら Science 253:164(1991)。したがって、前述の例は、本発明記載の構造ドメインおよび機能ドメインを定義するのに使用可能な配列モチーフおよび構造コンホメーションを、当業者が認識可能であることを立証する。

20

30

40

## 【0053】

好ましいアミノ酸置換は：(1)タンパク質分解に対する感受性を減少させ、(2)酸

50

化に対する感受性を減少させ、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を改変し、(4)結合親和性を改変し、そして(4)こうした類似体に、他の物理化学特性または機能特性を与えるか、またはこうした類似体のこうした特性を修飾するものである。類似体には、天然存在ペプチド配列以外の配列の多様な突然変異タンパク質(mut<sub>e</sub>i<sub>n</sub>)が含まれることも可能である。例えば、天然存在配列中(好ましくは分子間接触を形成するドメイン(単数または複数)の外のポリペプチド部分)に、単一のまたは多数のアミノ酸置換(好ましくは保存的アミノ酸置換)を作製することも可能である。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的に変化させてはならない(例えば置換アミノ酸は、親配列に存在するらせんを破壊する傾向があってはならないし、また親配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊する傾向があってはならない)。当該技術分野に認識されるポリペプチド二次構造および三次構造の例が、各々、本明細書に援用される、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton監修, W. H. Freeman and Company, ニューヨーク(1984)); Introduction to Protein Structure (C. BrandenおよびJ. Tooze監修, Garland Publishing, ニューヨーク州ニューヨーク(1991)); および Thorntonら Nature 354:105(1991)に記載されている。

#### 【0054】

本発明の抗体はまた、本明細書に開示するエピトープ決定基のペプチド類似体を用いて生成することも可能であり、この類似体は、テンプレートペプチドのものと類似の特性を有する非ペプチド化合物からなることも可能である。これらの種類の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体(peptide mimeticsまたはpeptidomimetics)」と称される。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29(1986); VerberおよびFreidinger TINS p. 392(1985); およびEvansら J. Med. Chem. 30:1229(1987)。こうした化合物はしばしば、コンピュータ分子モデリングの補助で開発される。療法的に有用なペプチドに構造的に類似のペプチド模倣体を用いて、同等の療法的効果または予防的効果を生じることにも可能である。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体などのパラダイム・ポリペプチド(すなわち、生化学的特性または薬理学的活性を有するポリペプチド)に構造的に類似であるが、当該技術分野に周知の方法によって、1以上のペプチド連結が、場合によって: - - CH<sub>2</sub> NH - -、 - - CH<sub>2</sub> S - -、 - - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - -、 - - CH = CH - - (シスおよびトランス)、 - - CH<sub>2</sub> - -、 - - CH(OH) CH<sub>2</sub> - -、 および CH<sub>2</sub> SO - - からなる群より選択される連結に置換されている。同じ種類のDアミノ酸(例えばL-リジンの代わりにD-リジン)でのコンセンサス配列の1以上のアミノ酸の体系的置換を用いて、より安定なペプチドを生成することも可能である。さらに、当該技術分野に知られる方法によって、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変動を含む、拘束されたペプチドを生成することも可能であり(本明細書に援用されるRizoおよびGierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387(1992)); 例えばペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成可能な内部システイン残基を付加することによって、生成することも可能である。

#### 【0055】

用語「二重特異性分子」は、少なくとも2つの異なる結合特異性を有する剤いづれか、例えばタンパク質、ペプチド、あるいはタンパク質複合体またはペプチド複合体を含むよう意図される。例えば、分子は、(a)細胞表面抗原および(b)エフェクター細胞表面上のFc受容体に結合するかまたはこれらと相互作用することも可能である。用語「多重特異性分子」または「異種特異性分子」は、2より多い、異なる結合特異性を有する剤いづれか、例えばタンパク質、ペプチド、あるいはタンパク質複合体またはペプチド複合体を含むよう意図される。例えば、分子は、(a)細胞表面抗原、(b)エフェクター細胞表面上のFc受容体、および(c)少なくとも1つの他の構成要素に結合するかまたはこ

れらと相互作用することも可能である。したがって、本発明には、限定されるわけではないが、CD148エピトープに、そしてエフェクター細胞上のFc受容体などの他のターゲットに対して向けられる、二重特異性、三重特異性、四重特異性、および他の多重特異性分子が含まれる。用語「二重特異性抗体」にはまた、ディアボディも含まれる。ディアボディは、二価の二重特異性抗体であり、VHドメインおよびVLドメインが単一ポリペプチド鎖上で発現されるが、同一鎖上の2つのドメイン間で対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用い、それによってドメインが、別の鎖の相補ドメインと対形成するのを余儀なくされ、そして2つの抗原結合性部位が生成されるものである(例えばHolliger, P.ら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J.ら(1994)Structure 2:1121-1123を参照されたい)。二重特異性抗体には、共に連結された2以上の抗体、抗体の結合性断片(例えばFab)、その誘導体、または抗原結合性領域であって、そのうち少なくとも2つが異なる特異性を有するものが含まれる。これらの異なる特異性には、エフェクター細胞上のFc受容体に対する結合特異性、およびターゲット細胞、例えば腫瘍細胞上の抗原またはエピトープに対する結合特異性が含まれる。

10

## 【0056】

用語「ヒト抗体」は、ヒト抗体が、ヒト宿主に投与された際に、それ自体に対する免疫原性反応を実質的にまったく誘発せず、そして好ましくは検出可能な免疫原性反応をまったく誘発しないように、定常領域およびフレームワークの両方が、完全にまたは実質的にヒト配列からなる抗体を指す。「ヒト抗体」は、抗体をヒト宿主に投与した際に、免疫原性反応を誘発しない限り、完全にヒト配列からなる必要はなく、非ヒト配列部分を含有することも可能であることが理解されるものとする。例えば、「ヒト抗体」は、マウスなどの非ヒト種のCDR領域が、ヒト・フレームワーク上に移植されている抗体を含む。特定の態様において、ヒト抗体は、限定されるわけではないが、マウス、ラット、およびウサギ目を含む、非ヒト哺乳動物で産生される。他の態様において、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン・レパートリーを有するトランスジェニック動物由来のハイブリドーマ細胞で産生される。他の態様において、完全ヒト抗体を、トランスフェクターマにおけるように、組換え的に産生する。

20

## 【0057】

用語「ヒト化抗体」は、実質的に定常領域のすべてがヒト由来であるが、1以上の可変領域のすべてまたは一部が、別の種、例えばマウス由来である抗体を指す。

30

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書において、単一の分子組成物の抗体分子の調製物をさす。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。したがって、用語「ヒト・モノクローナル抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を指す。1つの態様において、ヒト・モノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られ、不死化細胞に融合された、B細胞を含む、ハイブリドーマによって、産生される。

40

## 【0058】

本明細書において、抗体に関する用語「組換え体」は、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離されるヒト抗体すべて、例えば(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物(例えばマウス)、または該動物から調製されるハイブリドーマから、単離される抗体(以下のセクションIにさらに記載される)、(b)抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクターマから、単離される抗体、(c)組換えコンビナトリアル・ヒト抗体ライブラリーから、単離される抗体、および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む他の手段いずれかによって、調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体を含むよう意図される。こうした組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する、可変領域および定常領域を有

50

する。しかし、特定の態様において、こうした組換えヒト抗体を *in vitro* 突然変異誘発（またはヒト Ig 配列に関してトランスジェニックである動物を用いる場合、*in vivo* 体細胞突然変異誘発）に供することも可能であり、そしてしたがって、組換え抗体の V H 領域および V L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 V H 配列および V L 配列に由来し、そしてこうした配列に関連する一方、*in vivo* で、ヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しない可能性もある配列である。

【0059】

本明細書において、「異種抗体」は、こうした抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物からなるのではない生物で見られるものに対応するアミノ酸配列またはコード核酸配列を有し、そして一般的に、トランスジェニック非ヒト動物のもの以外の種由来の抗体を指す。

10

【0060】

本明細書において、「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖および重鎖を有する抗体を指す。例えば、ネズミ軽鎖と会合するヒト重鎖を有する抗体は、ヘテロハイブリッド抗体である。ヘテロハイブリッド抗体の例には、上に論じるようなキメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

【0061】

本明細書において、「アイソタイプ・スイッチング」は、抗体のクラスまたはアイソタイプが、1つの Ig クラスから、他の Ig クラスの1つに変化する現象を指す。

本明細書において、「非スイッチング・アイソタイプ」は、アイソタイプ・スイッチングが起きなかった場合に産生される、重鎖のアイソタイプ・クラスを指し；非スイッチング・アイソタイプをコードする C H 遺伝子は、典型的には、機能性に再編成された V D J 遺伝子のすぐ下流の最初の C H 遺伝子である。アイソタイプ・スイッチングは、古典的または非古典的アイソタイプ・スイッチングに分類されている。古典的アイソタイプ・スイッチングは、導入遺伝子の少なくとも1つのスイッチ配列領域を伴う組換え事象によって起こる。非古典的アイソタイプ・スイッチングは、例えば、ヒト・テータ・ミューおよびヒト・テータ・ミュー間の相同組換え（デルタ関連欠失）によって起こることも可能である。別の非古典的スイッチング機構、例えばとりわけ、導入遺伝子間および/または染色体間組換えが起こり、そしてアイソタイプ・スイッチングを達成することも可能である。

20

【0062】

本明細書において、用語「スイッチ配列」は、スイッチ組み換えに関与する DNA 配列を指す。「スイッチ・ドナー」配列は、典型的にはミュー・スイッチ領域であり、スイッチ組換え中に欠失される構築物領域の 5'（すなわち上流）にあるであろう。「スイッチ・アクセプター」領域は、欠失されることになる構築領域および置換定常領域（例えばガンマ、イプシロンなど）の間にあるであろう。組換えが常に起こる特定の場所はないため、最終遺伝子配列は、典型的には、構築物から予測可能ではないであろう。

30

【0063】

本明細書において、「グリコシル化パターン」は、タンパク質、より具体的には免疫グロブリン・タンパク質に共有結合する炭水化物単位のパターンと定義される。異種抗体のグリコシル化パターンは、導入遺伝子の C H 遺伝子が由来する種よりも、非ヒト・トランスジェニック動物の種に天然に生じるグリコシル化パターンのものにより類似であると、一般の当業者が認識する場合、非ヒト・トランスジェニック動物の種に産生される抗体に天然に生じるグリコシル化パターンに実質的に類似であると特徴付けることも可能である。

40

【0064】

用語「天然存在」は、本明細書において、物質に適用された場合、該物質が天然に見出されることが可能な事実を指す。例えば、天然の供給源から単離可能であり、そして実験室において人によって意図的に修飾されていない、生物（ウイルスを含む）に存在する、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然存在である。

【0065】

50

用語「再編成」は、本明細書において、重鎖または軽鎖の免疫グロブリン遺伝子座の立体配置を指し、ここで、本質的に完全なVHドメインまたはVLドメインをコードするコンホメーションにおいて、Vセグメントは、それぞれ、D-JセグメントまたはJセグメントにすぐ隣接して配置される。再編成された免疫グロブリン遺伝子の遺伝子座は、生殖系列DNAに比較することによって同定可能であり；再編成された遺伝子座は、少なくとも1つの組換えヘプタマー/ナノマー相同性要素を有するであろう。

【0066】

Vセグメントに関連して、用語「未再編成」または「生殖系列立体配置」は、本明細書において、Vセグメントが、DセグメントまたはJセグメントにすぐ隣接するように組み換えられていない立体配置を指す。

10

【0067】

用語「トランスフェクターマ」は、本明細書において、CHO細胞またはNS/O細胞などの、抗体を発現する組換え真核宿主細胞を含む。

用語「トランスジェニック非ヒト動物」は、1以上のヒト重鎖および/または軽鎖の導入遺伝子またはトランス染色体(trans chromosome)(動物の天然ゲノムDNAに組み込まれているかまたは組み込まれていないかいずれか)を含むゲノムを有し、そして完全ヒト抗体を発現可能である、非ヒト動物を指す。例えば、トランスジェニックマウスは、CD148および/またはCD148を発現する細胞で免疫された際、該マウスがヒト抗CD148抗体を産生するように、ヒト軽鎖導入遺伝子、およびヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖トランス染色体のいずれかを有することも可能である。トランスジェニック、例えばHuMAbマウスの場合のように、ヒト重鎖導入遺伝子がマウスの染色体DNAに組み込まれることも可能であるし、またWO 02/43478に記載されるトランス染色体(例えばKM)マウスの場合のように、ヒト重鎖導入遺伝子が染色体外で維持されることも可能である。こうしたトランスジェニックマウスおよびトランス染色体マウスは、V-D-J組換えおよびアイソタイプ・スイッチングを経ることによって、CD148に対するヒト・モノクローナル抗体の多数のアイソタイプ(例えばIgG、IgAおよび/またはIgE)を産生することが可能である。

20

【0068】

本発明の多様な側面を、以下のサブセクションにさらに詳細に記載する。

CD148に対する抗体の産生

30

CD148が仲介する炎症および/または血管形成活性の活性化において、役割を果たすと決定された、CD148の特定のエピトープに結合する、抗体またはその抗原結合性領域によって、本発明を例示する。こうした抗体またはその抗原結合性領域には、CD148への結合が、本明細書に開示する抗体またはその抗原結合性領域に競合的に阻害されることが可能な、抗CD148抗体およびその抗原結合性領域が含まれる。本発明の抗体およびその抗原結合性領域をコードするポリヌクレオチド配列、並びにこうしたポリヌクレオチド配列に発現されるポリペプチド配列が、その内容が本明細書に完全に援用される、同時係属米国仮特許出願第60/564,885号および第60/585,686号に開示される。

【0069】

40

本発明は、配列番号33のアミノ酸447~725、533~725、715~973、324~335、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープと、実質的に同じエピトープに結合する、抗CD148抗体を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号33のアミノ酸315~329、318~332、321~335、324~338、324~329、324~332、324~335、447~725、533~725、715~973、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープ、または実質的に同じエピトープに結合する、抗CD148抗体およびその抗原結合性領域を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号33のアミノ酸3

50

15～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープ、または実質的に同じエピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合性領域を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号33のアミノ酸315～329、318～332、321～335、324～338、324～329、324～332、324～335、447～725、533～725、715～973、200～536、533～725および200～725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープ、または実質的に同じエピトープに特異的に結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域を提供する。以下に開示するいくつかのプロセスのいずれか1つによって、こうした抗体またはその抗原結合性領域を調製することも可能であり、例えば少なくとも第一のCD148抗原性組成物で動物を免疫し、そして免疫した動物から、本発明のモノクローナル抗体と実質的に交差反応する抗体を選択することによって、調製する。

10

#### 【0070】

こうした特性の組み合わせを持つ抗体を、受容体競合、ELISA、共沈、および/または本明細書記載の機能アッセイおよび交差反応性アッセイの1以上、または組み合わせによって、容易に同定することも可能である。

#### 【0071】

本発明に含まれる抗体には、IgG、IgA、IgG1～4、IgE、IgM、およびIgD抗体、例えばIgG1またはIgG1アイソタイプ、あるいはIgG4またはIgG4アイソタイプが含まれる。特定の態様において、本発明の抗体は、IgG2アイソタイプである。1つの態様において、V-D-J組換えおよびアイソタイプ・スイッチングを経ることによって、CD148に対するヒト抗体の多数のアイソタイプ（例えばIgG、IgAおよび/またはIgE）を産生することが可能な非ヒト・トランスジェニック動物、例えばトランスジェニックマウスにおいて、ヒト抗体を産生する。したがって、本発明の側面は、抗体、抗体断片、およびその薬剤組成物だけでなく、モノクローナル抗体を産生する、非ヒト・トランスジェニック動物、B細胞、宿主細胞トランスフェクター、およびハイブリドーマも含む。in vitroまたはin vivoのいずれかで、CD148または関連する交差反応性増殖因子受容体を発現する細胞を検出するために、あるいはCD148を発現する細胞の増殖、分化および/または運動性を阻害するために、本発明の抗体を用いる方法もまた、本発明に含まれる。本発明はさらに、本発明の抗体を含有する薬剤調製物、および本発明の抗体を投与することによって、生理学的障害を治療する方法を含む。

20

30

#### 【0072】

動物の免疫を介して（例えばAb-1～Ab-8の抗体に特異的に結合し、そしてこれらの抗体の少なくとも1つの結合を競合的に阻害する抗体の産生を誘発する抗原を用いる）；ハイブリドーマを介して（例えばトランスジェニックまたは非トランスジェニック動物由来のB細胞を使用する）；組換え法を介して（例えばCHOトランスフェクター； Morrison, S. (1985) Science 229:1202を参照されたい）；またはin vitro合成手段（例えば固相ポリペプチド合成）によって、本発明の抗体およびその抗原結合性領域を構築することも可能である。

40

#### 【0073】

いくつかの態様において、抗体および抗原結合性領域は、ヒトであるか、またはヒト化されている。非ヒト抗体をヒト化するための方法が当該技術分野に周知である。ヒト化は、本質的に、Winterおよび同僚ら（Jonesら, Nature, 321:522 (1986)；Riechmannら, Nature, 332:323 (1988)；Verhoevenら, Science, 239:1534 (1988)）の方法にしたがって実行可能である。簡潔には、ヒト定常領域遺伝子を、適切なヒトまたは

50

非ヒト可変領域遺伝子に連結する。例えば、親ネズミ・モノクローナル抗体の抗原結合性部位（CDR、または相補性決定領域）に相当するアミノ酸配列を、ヒト可変領域フレームワーク配列上に、DNAレベルで移植する。ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabataら（1991）*Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H.* 刊行物第91-3242号に見出される。ヒトC領域遺伝子は、既知のクローンから容易に入手可能である。抗体アイソタイプの選択は、補体結合などの望ましいエフェクター機能によって、または抗体依存性細胞傷害性における活性によって、導かれるであろう。特定の態様において、アイソタイプはIgG<sub>2</sub>である。

【0074】

また、限定されるわけではないが、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技術を含むディスプレイ型技術によって、当該技術分野に周知の技術を用いて、ヒトまたはヒト化抗体または抗原結合性領域を生成することも可能であり、そして当該技術分野に周知の技術であるような、親和性成熟などのさらなる成熟に、生じた分子を供することも可能である。HanesおよびPluckhau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (リボソームディスプレイ)、ParmleyおよびSmith *Gene* 73:305-318 (1988) (ファージディスプレイ)、Scott *TIBS* 17:241-245 (1992)、Cwirllaら *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990)、Russellら *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993)、Hoganboomら *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992)、ChiswellおよびMcCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992)、並びに米国特許第5,733,743号。

【0075】

コンピュータ・モデリングによって、適切なヒト抗体配列の同定を容易にすることも可能である。モデリングは当該技術分野に周知であり、そして例えば、ヒト可変フレームワーク領域と非ヒトCDR領域が不自然に並列し、不自然なコンホメーション拘束が生じ、そして同時に結合親和性の損失が生じうるのを回避するために用いられる。免疫グロブリン分子の三次元画像を産生するためのコンピュータ・ハードウェアおよびソフトウェアが広く入手可能である。一般的に、免疫グロブリン鎖またはそのドメインの解明された構造から出発して、分子モデルを産生する。モデリングしようとする鎖を、解明された三次元構造を持つ鎖またはドメインとのアミノ酸類似性に関して比較し、そして最大の配列類似性を示す鎖またはドメインを、分子モデル構築の出発点として選択する。解明された出発構造を修飾して、モデリングしようとする免疫グロブリン鎖またはドメイン中の実際のアミノ酸、および出発構造中のアミノ酸の間の相違を許容するようにする。次いで、修飾された構造を合成免疫グロブリンに組み立てる。最後に、エネルギー最小化によって、そしてすべての原子が互いに適切な距離内にあり、そして結合長および角度が化学的に許容しうる限界内にあることを検証することによって、モデルを精緻化する。

【0076】

免疫した際に、内因性免疫グロブリン産生を伴わずに、ヒト抗体の完全レパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を産生することが、現在可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域（JH）遺伝子のホモ接合体欠失によって、内因性抗体産生の完全な阻害が生じる。こうした生殖系列突然変異体マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを導入すると、抗原に曝露した際、ヒト抗体の産生が生じるであろう。例えばJakobovitsら, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, *Nature*, 362:255 (1993); Bruggemannら, *Year in Immunol.*, 207:33 (1993)を参照されたい。Xenomouseなどの商業的に入手可能なトランスジェニックマウス系統が記載されてきている; Greenら *Nature Genetics*

10

20

30

40

50

7 : 1 3 - 2 1 ( 1 9 9 4 ) を参照されたい。

【 0 0 7 7 】

本発明の抗体または抗原結合性領域を産生するための組換え法は、A b - 1 ~ A b - 8 のいずれかに存在するものなどの、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の所望の領域の単離核酸から始まる。こうした領域は、例えば、重鎖および軽鎖の変領域のすべてまたは一部を含むことも可能である。こうした領域は、特に、A b - 1 ~ A b - 8 由来の、重鎖および/または軽鎖の少なくとも1つのC D R、およびしばしば少なくとも1つのC D R 対を含むことも可能である。当該技術分野に知られる *in vitro* オリゴヌクレオチド合成法によって、本発明の抗体または抗原結合性領域をコードする核酸を直接合成することも可能である。あるいは、当該技術分野に知られる組換え法を用いて、より小さい断片を合成し、そして連結して、より大きい断片を形成することも可能である。F a b または F ( a b ' )<sub>2</sub> などの抗体の結合性領域を、損なわれていないタンパク質の切断によって、例えばプロテアーゼまたは化学的切断によって、調製することも可能である。あるいは、一部切除 ( *truncated* ) 遺伝子を設計することも可能である。

【 0 0 7 8 】

抗体またはその抗原結合性領域を発現するため、標準的分子生物学技術 ( 例えば P C R 増幅、部位特異的突然変異誘発 ) によって、部分的または全長軽鎖および重鎖をコードする D N A を得ることも可能であり、そして該遺伝子が、転写および翻訳制御配列に、機能可能であるように連結されるように、該 D N A を発現ベクターに挿入することも可能である。本発明の抗体または抗原結合性領域をコードする核酸を、適切な発現ベクターにクローニングし、そして適切な宿主で発現させることも可能である。適切なベクターおよび宿主細胞系は、例えば、A b - 1 ~ A b - 8 の少なくとも1つの可変重鎖および可変軽鎖、またはその C D R 含有ポリペプチドの同時発現および組み立てを可能にしよう。当業者によって、適切な発現系を決定することも可能である。

【 0 0 7 9 】

本発明のポリヌクレオチドを含む核酸を、適切な哺乳動物または非哺乳動物宿主細胞のトランスフェクションに用いることも可能である。いくつかの態様において、軽鎖および重鎖の発現のため、標準的技術によって、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター ( 単数または複数 ) を宿主細胞にトランスフェクションする。用語「トランスフェクション」の多様な型は、原核または真核宿主細胞に外因性 D N A を導入するのに一般的に用いられる非常に多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、D E A E - デキストラン・トランスフェクション等を含むよう意図される。原核または真核宿主細胞いずれかにおいて、本発明の抗体を発現することが理論的に可能であるが、真核細胞、そして最も好ましくは哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が、最も典型的であり、これは、真核細胞、そして特に哺乳動物細胞が、原核細胞よりも、適切にフォールディングし、そして免疫学的に活性である抗体または抗原結合性領域を、組み立て、そして分泌する可能性がより高いためである。

【 0 0 8 0 】

発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、Y A C、E B V 由来エピソーム等が含まれる。好適なベクターは、機能的に完全なヒト C H ( 定常重鎖 ) または C L ( 定常軽鎖 ) 免疫グロブリン配列をコードし、いかなる V H 配列または V L 配列も容易に挿入され、そして発現可能であるように、操作された適切な制限部位を含むものである。こうしたベクターにおいて、スプライシングは、通常、挿入された J 領域中のスプライス・ドナー部位、およびヒト C 領域に先行するスプライス・アクセプター部位の間で起こり、そしてまた、ヒト C H エクソン内に存在するスプライス領域でも起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域下流の天然染色体部位で起こる。

【 0 0 8 1 】

用いる発現宿主細胞と適合するように、発現ベクターおよび発現調節配列を選択する。本発明の抗体可変重鎖核酸および抗体可変軽鎖核酸を別個のベクターに挿入することも可能であるし、または頻繁に、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。標準法によっ



て、核酸を発現ベクターに挿入することも可能である（例えば抗体核酸断片およびベクター上の相補的制限部位の連結、または制限部位が存在しない場合、平滑端連結）。VHセグメントが、ベクター内のCHセグメント（単数または複数）に機能可能であるように連結され、そしてVLセグメントが、ベクター内のCLセグメントに機能可能であるように連結されるように、所望のアイソタイプ（およびサブクラス）の重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクター内に、本明細書記載のAb-1～Ab-8の重鎖および軽鎖の可変領域を挿入することによって、これらを用いて抗体アイソタイプいずれの全長抗体遺伝子を生成することも可能である。さらに、またはあるいは、発現ベクターは、宿主細胞からの抗体または抗原結合性領域鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることも可能である。シグナルペプチドが、抗体/抗原結合性領域鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体または抗原結合性領域鎖遺伝子をベクターにクローニングすることも可能である。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち非免疫グロブリン・タンパク質由来のシグナルペプチド）であることも可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0082】

CDRを含む配列に加えて、本発明の発現ベクターは、宿主細胞における配列の発現を調節する制御配列を所持する。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサー、および抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を調節する他の発現調節要素（例えばポリアデニル化シグナル）を含むよう意図される。こうした制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ(1990)に記載される。当業者は、発現ベクターの設計は、制御配列の選択を含めて、形質転換しようとする宿主細胞の選択、タンパク質の所望の発現レベル等の要因に応じる可能性もあることを認識するであろう。哺乳動物宿主細胞発現に好ましい制御配列には、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を導くウイルス要素、例えばサイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス（例えばアデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)）およびポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。あるいは、ユビキチン・プロモーターまたはベータ-グロビン・プロモーターなどの非ウイルス制御配列を使用することも可能である。

#### 【0083】

抗体または抗原結合性領域核酸および制御配列に加えて、本発明の発現ベクターは、さらなる配列、例えば宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（例えば複製起点）および選択可能マーカー遺伝子を所持することも可能である。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする（例えばすべてAxelらによる、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号を参照されたい）。例えば、典型的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、薬剤、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬剤に対する抵抗性を与える。好ましい選択可能マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子（メトトレキセート選択/増幅とともに、dhfr-宿主細胞で使用する）およびneo遺伝子（G418選択）が含まれる。

#### 【0084】

本発明の組換え抗体または抗原結合性領域を発現するのに好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(DHFR選択可能マーカー、例えばR. J. KaufmanおよびP. A. Sharp(1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載されるようなものと用いる、UrlaubおよびChasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載される、dhfr-CHO細胞を含む)、NS/0骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2.0細胞が含まれる。特に、NS/0骨髄腫細胞と共に使用するため、別の好ましい発現系は、WO 87/04462、WO 89/01036お

よびEP 338 841に開示される、GS遺伝子発現系である。本発明の発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞における、抗体または抗原結合性領域の発現、あるいはより好ましくは宿主細胞を増殖させている培地中への、抗体または抗原結合性領域の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって、抗体または抗原結合性領域を産生する。

#### 【0085】

ひとたび発現されたら、HPLC精製、分画カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等（例えばScopes, Protein Purification, Springer-Verlag, ニューヨーク州, 1982）を含む、当該技術分野の標準法にしたがって、本発明の抗体および抗原結合性領域を精製することも可能である。特定の態様において、クロマトグラフィー技術および/または電気泳動技術を用いて、ポリペプチドを精製する。典型的な精製法には、限定されるわけではないが、硫酸アンモニウムでの沈殿；PEGでの沈殿；免疫沈降；熱変性後の遠心分離；限定されるわけではないが、アフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインA-セファロース）、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、および逆相クロマトグラフィーを含む、クロマトグラフィー；ゲルろ過；ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィー；等電点電気泳動；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；並びにこうした技術および他の技術の組み合わせが含まれる。特定の態様において、迅速タンパク質液体クロマトグラフィーによって、または高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、ポリペプチドを精製する。

10

20

#### CD148に対するヒト・モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

本発明の別の側面は、本発明の抗体またはその抗原結合性領域を産生するハイブリドーマ細胞を含む。ハイブリドーマ細胞は、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物から得られ、不死化細胞に融合された、B細胞を含み、ここでハイブリドーマは、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性領域を検出可能な量で産生する。

#### 【0086】

標準プロトコルに基づいて、マウス脾臓細胞を単離し、そしてPEGを用いてマウス骨髄腫細胞株に融合させることも可能である。次いで、生じたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングする。例えば、50%PEGを用いて、免疫マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁物を、6分の1の数のP3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞（ATCC, CRL 1580）に融合させる。平底マイクロタイタープレート中、およそ $2 \times 10^5$ で細胞を蒔き、その後、20%胎児クローン血清（fetal Clone Serum）、18%「653」馴化培地、5%オリゲン（IGEN）、4mM L-グルタミン、1mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50単位/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、50mg/mlゲンタマイシンおよび1xHAT（Sigma；HATは融合24時間後に添加される）を含有する選択培地中で2週間インキュベーションする。2週間後、HATをHTと交換した培地中で細胞を培養する。次いで、ヒト抗CD148モノクローナルIgMおよびIgG抗体に関して、ELISAによって個々のウェルをスクリーニングする。通常、10~14日後、大規模なハイブリドーマ増殖が起きたら、培地を観察する。抗体を分泌するハイブリドーマを再度蒔き、再びスクリーニングし、そしてヒトIgG、抗CD148モノクローナル抗体に関してなお陽性であれば、限界希釈によって、少なくとも2回、サブクローニングすることも可能である。次いで、安定なサブクローンをin vitroで培養して、性質決定のため、組織培地中に少量の抗体を生成させる。

30

40

#### CD148に対するヒト・モノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの生成

当該技術分野に周知であるような、例えば組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを用いて、宿主細胞トランスフェクターマにおいて、本発明のヒト抗体を産生することも可能である（Morrisson, S. (1985) Scien

50

ce 229:1202)。トランスフェクター細胞は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖をコードする核酸を含むことも可能であり、ここでトランスフェクターは、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性領域を検出可能な量で産生する。

【0087】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現するため、標準的分子生物学技術（例えばPCR増幅、部位特異的突然変異誘発）によって、部分的または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを得ることも可能であり、そして該遺伝子が、転写および翻訳調節配列に、機能可能であるように連結されるように、該DNAを発現ベクターに挿入することも可能である。これに関連して、用語「機能可能であるように連結される」は、ベクター内の転写および翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を制御する、意図される機能に役立つように、抗体遺伝子がベクター内に連結されることを意味するよう意図される。用いる発現宿主細胞と適合するように、発現ベクターおよび発現調節配列を選択する。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別個のベクターに挿入することも可能であるし、またはより典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。標準法によって、抗体遺伝子が発現ベクターに挿入する（例えば抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位の連結、または制限部位が存在しない場合、平滑端連結）。VHセグメントが、ベクター内のCHセグメント（単数または複数）に機能可能であるように連結され、そしてVLセグメントが、ベクター内のCLセグメントに機能可能であるように連結されるように、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクター内に、本明細書記載の抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を挿入することによって、これらを用いて抗体アイソタイプいずれの全長抗体遺伝子を生成することも可能である。さらに、またはあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることも可能である。シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることも可能である。シグナルペプチドは、免疫グロブリン・シグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち非免疫グロブリン・タンパク質由来のシグナルペプチド）であることも可能である。

10

20

【0088】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を所持する。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサー、および抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を調節する他の発現調節要素（例えばポリ阿德ニル化シグナル）を含むよう意図される。こうした制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ(1990)に記載される。当業者は、発現ベクターの設計は、制御配列の選択を含めて、形質転換しようとする宿主細胞の選択、タンパク質の所望の発現レベル等の要因に応じる可能性もあることを認識するであろう。哺乳動物宿主細胞発現に好ましい制御配列には、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を導くウイルス要素、例えばサイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))およびポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。あるいは、ユビキチン・プロモーターまたはベータ-グロビン・プロモーターなどの非ウイルス制御配列を使用することも可能である。

30

40

【0089】

抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、さらなる配列、例えば宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列(例えば複製起点)および選択可能マーカー遺伝子を所持することも可能である。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする(例えばすべてAxelらによる、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号を参照されたい)。例えば、典型的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されて

50

いる宿主細胞に、薬剤、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬剤に対する抵抗性を与える。好ましい選択可能マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子(メトトレキセート選択/増幅とともに、dhfr-宿主細胞で使用する)およびneo遺伝子(G418選択)が含まれる。本発明の好ましい態様において、抗体鎖遺伝子および制御配列は、その内容が本明細書に明確に援用される、Bianchi, A.A.およびMcGrew, J.T.(2003) "High-level expression of full antibodies using trans-complementing expression vectors," *Bioengineering and Biotechnology*, 84(4): 439-444; 並びにMcGrew, J.T.およびBianchi, A.A.(2002) "Selection of cells expressing heteromeric proteins", 米国特許出願第20030082735号に開示されるような、「分割dhfrベクター」、PDC323およびPDC324で発現される。

10

#### 【0090】

軽鎖および重鎖の発現のため、標準的技術によって、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター(単数または複数)を宿主細胞にトランスフェクションする。用語「トランスフェクション」の多様な型は、原核または真核宿主細胞に外因性DNAを導入するのに一般的に用いられる非常に多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン・トランスフェクション等を含むよう意図される。原核または真核宿主細胞いずれかにおいて、本発明の抗体を発現することが理論的に可能であるが、真核細胞、そして最も好ましくは哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が、最も好ましく、これは、こうした真核細胞、そして特に哺乳動物細胞が、原核細胞よりも、適切にフォールディングし、そして免疫学的に活性である抗体を、組み立て、そして分泌する可能性がより高いためである。

20

#### 【0091】

本発明の組換え抗体を発現するのに好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(DHFR選択可能マーカー、例えばR.J. KaufmanおよびP.A. Sharp(1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621に記載されるようなものと用いる、UrlaubおよびChasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220に記載される、dhfr-CHO細胞を含む)、NS/O骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2.0細胞が含まれる。特に、NS/O骨髓腫細胞と共に使用するため、別の好ましい発現系は、WO 87/04462、WO 89/01036およびEP 338 841に開示される、GS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは宿主細胞を増殖させている培地中への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって、抗体を産生する。標準的タンパク質精製法を用いて、培地から抗体を回収することも可能である。

30

#### 損なわれていない抗体を発現するための部分的抗体配列の使用

40

抗体は、主に、重鎖および軽鎖の6つの相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を通じて、ターゲット抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列よりも、個々の抗体間でより多様である。CDR配列は、大部分の抗体-抗原相互作用に参与するため、異なる特性を持つ異なる抗体由来のフレームワーク配列上に移植された、特定の天然存在抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然存在抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である(例えばRiechmann, L.ら, 1998, *Nature* 332: 323-327; Jones, P.ら, 1986, *Nature* 321: 522-525; およびQueen, C.ら, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033を参照されたい)。生殖系

50

列抗体遺伝子配列を含む公共DNAデータベースから、こうしたフレームワーク配列を得ることも可能である。これらの生殖系列配列は、B細胞成熟中のV(D)J連結によって形成される、完全に組み立てられた可変遺伝子を含まないであろうため、成熟抗体遺伝子配列とは異なるであろう。生殖系列遺伝子配列はまた、可変領域全体に渡って、個々の高親和性二次レパートリー抗体の配列とも異なるであろう。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分では比較的頻繁ではない。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分では比較的頻繁でない。さらに、多くの体細胞突然変異は、抗体の結合特性を有意に改変しない。このため、元来の抗体のものと類似の結合特性を有する、損なわれていない組換え抗体を再現するために、特定の抗体の全DNA配列を得る必要はない(すべての目的のため、本明細書に援用される、PCT/US99/05535、1999年3月12日出願を参照されたい)。この目的のためには、典型的には、CDR領域に渡る部分的重鎖および軽鎖配列で十分である。部分的配列を用いて、どの生殖系列可変遺伝子および連結遺伝子セグメントが、組換え抗体可変遺伝子に寄与しているかを決定する。次いで、生殖系列配列を用いて、可変領域の失われた部分を埋める。タンパク質成熟中に、重鎖および軽鎖リーダー配列は切断され、そしてこれらは、最終抗体の特性には寄与しない。このため、発現構築物に対応する生殖系列リーダー配列を用いる必要がある。失われた配列を付加するため、連結またはPCR増幅によって、クローニングされたcDNA配列を合成オリゴヌクレオチドと組み合わせることも可能である。あるいは、短い重複するオリゴヌクレオチドセットとして、全可変領域を合成し、そしてPCR増幅によって組み合わせ、完全な合成可変領域クローンを生成することも可能である。このプロセスは、特定の制限部位の排除または包含、あるいは特定のコドンの最適化などの特定の利点を有する。

10

20

#### 【0092】

ハイブリドーマ由来の重鎖および軽鎖転写物のヌクレオチド配列を用いて、合成オリゴヌクレオチドの重複するセットを設計して、天然配列と同一のアミノ酸コード能力を持つ合成V配列を生成する。合成重鎖およびカッパ鎖配列は、3つの点で天然配列と異なることも可能である：オリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅を容易にするため、一連の反復ヌクレオチド塩基が中断されている；Kozakのルール(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)にしたがって、最適翻訳開始部位が取り込まれている；およびHindIII部位が翻訳開始部位上流に設計されている。

30

#### 【0093】

重鎖および軽鎖可変領域両方に関して、最適化コード鎖配列および対応する非コード鎖配列は、対応する非コードオリゴヌクレオチドのほぼ中間点で、30~50ヌクレオチドに分解される。したがって、各鎖に関して、150~400ヌクレオチドのセグメントに渡る、重複二本鎖セットに、オリゴヌクレオチドを組み立てることも可能である。次いで、テンプレートとしてこのプールを用いて、150~400ヌクレオチドのPCR増幅産物を産生する。典型的には、単一可変領域オリゴヌクレオチドセットは、2つのプールに分けられ、これを別個に増幅して、2つの重複PCV産物を生成する。次いで、これらの重複産物をPCT増幅によって合わせて、完全可変領域を形成する。発現ベクター構築物内に容易にクローニング可能な断片を生成するため、PCR増幅中に、重鎖または軽鎖定常領域の重複断片(カッパ軽鎖のBbsI部位、またはガンマ重鎖の場合AgeI部位を含む)もまた含むことが望ましい可能性もある。

40

#### 【0094】

次いで、再構築された重鎖および軽鎖可変領域を、クローニングされたプロモーター配列、翻訳開始配列、定常領域配列、3'非翻訳配列、ポリアデニル化配列、および転写終結配列と合わせて、発現ベクター構築物を形成する。重鎖および軽鎖発現構築物を、単一のベクター中で合わせるか、同時トランスフェクションするか、連続トランスフェクションするか、または宿主細胞に別個にトランスフェクションして、次いで融合させて、両方の鎖を発現する宿主細胞を形成することも可能である。

50

## 【0095】

ヒトIgGの発現ベクターの構築に用いるプラスミドを以下に記載する。PCR増幅されたV重鎖およびVカッパ軽鎖cDNA配列を用いて、完全重鎖および軽鎖ミニ遺伝子を再構築可能であるように、プラスミドを構築した。これらのプラスミドを用いて、完全ヒト抗体、あるいはキメラIgG1抗体またはIgG4抗体を発現させることも可能である。他の重鎖アイソタイプを発現するため、またはラムダ軽鎖を含む抗体を発現するため、類似のプラスミドを構築することも可能である。

## 【0096】

したがって、本発明の別の側面において、本発明のヒト抗CD148抗体の構造的特徴を用いて、本発明の抗体の少なくとも1つの機能的特性、例えばCD148への結合を保持する、構造的に関連するヒト抗CD148抗体を生成する。より具体的には、抗CD148抗体の1以上のCDR領域を、既知のヒト・フレームワーク領域およびCDRと組換え的に組み合わせて、さらなる組換え的に操作された本発明のヒト抗CD148抗体を生成することも可能である。

## 【0097】

したがって、本発明の抗CD148抗体を用いて、(1)ヒト重鎖フレームワーク領域およびヒト重鎖CDR；並びに(2)ヒト軽鎖フレームワーク領域およびヒト軽鎖CDRを含む抗CD148抗体であって、CD148に結合する能力を保持する、前記抗体を調製することによって、抗CD148抗体を調製することも可能である。

## 【0098】

標準的結合アッセイ(例えばELISA)を用いて、抗体がCD148に結合する能力を決定することも可能である。抗体重鎖および軽鎖CDR3ドメインが、抗原に対する抗体の結合特異性/親和性に特に重要な役割を果たすことが、当該技術分野に周知であるため、上述のように調製される本発明の組換え抗体は、好ましくは、抗CD148抗体の重鎖および軽鎖CDR3を含む。抗体はさらに、抗CD148抗体のCDR2を含むことも可能である。抗体はさらに、抗CD148抗体のCDR1を含むことも可能である。したがって、本発明は：(1)ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖CDR1領域、ヒト重鎖CDR2領域、およびヒト重鎖CDR3領域を含み、ここでヒト重鎖CDR3領域が抗CD148抗体のCDR3である、抗CD148抗体；および(2)ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域、およびヒト軽鎖CDR3領域を含み、ここでヒト軽鎖CDR3領域が抗CD148抗体のCDR3である、を含む抗CD148抗体であって、当該抗体はCD148に結合する、前記抗CD148抗体を提供する。抗体はさらに、抗CD148抗体の重鎖CDR2および/または軽鎖CDR2を含むことも可能である。抗体はさらに、抗CD148抗体の重鎖CDR1および/または軽鎖CDR1を含むことも可能である。

## 【0099】

好ましくは、上述の操作された抗体のCDR1、2、および/または3は、本明細書に開示する抗CD148抗体のものと正確に同じアミノ酸配列(単数または複数)を含む。しかし、一般の当業者は、抗体がCD148に有効に結合する能力を保持しつつ、正確なCDR配列からのある程度の逸脱が可能である可能性もあることを認識するであろう。(例えば保存的置換)。したがって、別の態様において、操作された抗体は、抗CD148抗体の1以上のCDRと、例えば90%、95%、98%または99.5%同一である、1以上のCDRで構成されることも可能である。

CD148に対するヒト・モノクローナル抗体の結合の性質決定

本発明の抗ヒトCD148ヒト・モノクローナル抗体の結合を性質決定するため、免疫したマウス由来の血清を、例えばELISAによって試験することも可能である。簡潔には、マイクロタイプレートに、PBS中、0.25μg/mlの精製CD148でコーティングし、そして次いで、PBS中の5%ウシ血清アルブミンでブロッキングする。CD148免疫マウス由来の血漿の希釈物を、各ウェルに添加して、そして37で1~2時間インキュベーションする。PBS/Tweenでプレートを洗浄し、そして次いで

10

20

30

40

50

、アルカリホスファターゼとコンジュゲート化したヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬と、37で1時間インキュベーションする。洗浄後、pNPP基質(1mg/ml)でプレートを発色させ、そして405~650のODで分析する。好ましくは、最高の力価を生じたマウスを、融合に用いる。

#### 【0100】

上述のようなELISAアッセイを用いて、CD148抗原と陽性の反応性を示すハイブリドーマに関してスクリーニングすることも可能である。CD148に高親和性で結合するハイブリドーマをサブクロニングし、そしてさらに性質決定する。-140で保存する5~10バイアルの細胞バンクを作製するため、そして抗体精製のため、親細胞の反応性を維持する(ELISAによる)、各ハイブリドーマ由来の1つのクローンを選択することも可能である。

10

#### 【0101】

ヒト抗CD148抗体を精製するため、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製の2リットルのスピナーフラスコ中で増殖させることも可能である。上清をろ過し、そしてプロテインA-セファロース(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いたアフィニティークロマトグラフィー前に、濃縮することも可能である。ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって、溶出したIgGをチェックして、純度を保証することも可能である。緩衝溶液をPBSに交換し、そして1.43吸光係数を用いて、OD<sub>280</sub>によって濃度を測定することも可能である。モノクローナル抗体をアリコットして、そして-80で保存することも可能である。

20

#### 【0102】

選択したヒト抗CD148モノクローナル抗体が、ユニークなエピトープに結合するかどうかを決定するため、商業的に入手可能な試薬(Pierce、イリノイ州ロックフォード)を用いて、各抗体をビオチン化することも可能である。上述のようなCD148コーティングELISAプレートを用いて、非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を用いた競合研究を行うことも可能である。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブを用いて、ビオチン化MAb結合を検出することも可能である。

#### 【0103】

精製抗体のアイソタイプを決定するため、アイソタイプELISAを行うことも可能である。マイクロタイタープレートのウェルを、10g/mlの抗ヒトIgGで、4で一晩コーティングすることも可能である。5%BSAでブロックした後、プレートを10g/mlのモノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照と、周囲温度で2時間反応させる。次いで、ウェルをヒトIgG1またはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼ・コンジュゲート化プローブのいずれかと反応させる。上述のようにプレートを発色させ、そして分析する。

30

#### 【0104】

CD148を発現している生存細胞に対するモノクローナル抗体の結合を立証するため、フローサイトメトリーを用いることも可能である。簡潔には、CD148を発現する細胞株(標準的増殖条件下で増殖させる)を、0.1%Tween80および20%マウス血清を含有するPBS中、多様な濃度のモノクローナル抗体と混合し、そして37で1時間インキュベーションする。洗浄後、一次抗体染色と同じ条件下で、フルオレセイン標識抗ヒトIgG抗体と細胞を反応させる。単一細胞に対してゲート処理するため、光および側方散乱特性を用いて、FACSscan装置によって、試料を分析することも可能である。蛍光顕微鏡を用いた別のアッセイを、(フローサイトメトリーアッセイに加えて、またはその代わりに)用いることも可能である。細胞を正確に上述のように染色し、そして蛍光顕微鏡によって調べることも可能である。この方法は、個々の細胞の視覚化を可能にするが、抗原の密度に応じて、減少した感度を有する可能性もある。

40

#### 【0105】

ウェスタンブロットティングによって、CD148抗原との反応性に関して、抗CD14

50

8 ヒト Ig G をさらに試験することも可能である。簡潔には、CD148 を発現する細胞由来の細胞抽出物を調製し、そしてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することも可能である。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース膜にトランスファーして、20% マウス血清でブロックし、そして試験しようとするモノクローナル抗体で探査する。抗ヒト Ig G アルカリホスファターゼを用いて、ヒト Ig G 結合を検出し、そして BCIP / NBT 基質錠剤 (Sigma Chem. Co.、ミズーリ州セントルイス) で発色させることも可能である。

#### ヒト・モノクローナル抗 CD148 抗体を生成するトランスジェニック非ヒト動物

マウス系でなく、ヒト免疫系の一部を所持するトランスジェニックマウスを用いて、CD148 ポリペプチドに対して向けられるヒト・モノクローナル抗体を生成することも可能である。これらのトランスジェニックマウスは、本明細書において、「HuMAb」マウスと称され、再編成されていないヒト重鎖 (μ および ) および 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有するとともに、内因性 μ および 鎖遺伝子座を不活性化するターゲティング突然変異を含む (Lonberg ら (1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859)。したがって、マウスは、マウス Ig M または の減少した発現を示し、そして免疫に反応して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラススイッチングおよび体細胞突然変異を経て、高親和性ヒト Ig G モノクローナル抗体が生成される (Lonberg, N. ら (1994) 上記; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49 - 101; Lonberg, N. および Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 : 65 - 93、並びに Harding, F. および Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764 : 536 - 546 に概説される)。HuMAb マウスの調製は、以下に詳細に記載され、そしてその内容がすべて完全に本明細書に援用される、Taylor, L. ら (1992) Nucleic Acids Research 20 : 6287 - 6295; Chen, J. ら (1993) International Immunology 5 : 647 - 656; Tuailon ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci US A 90 : 3720 - 3724; Choi ら (1993) Nature Genetics 4 : 117 - 123; Chen, J. ら (1993) EMBO J. 12 : 821 - 830; Tuailon ら (1994) J. Immunol. 152 : 2912 - 2920; Lonberg ら (1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49 - 101; Taylor, L. ら (1994) International Immunology 6 : 579 - 591; Lonberg, N. および Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 : 65 - 93; Harding, F. および Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764 : 536 - 546; Fishwild, D. ら (1996) Nature Biotechnology 14 : 845 - 851 に記載される。さらに、その開示がすべて本明細書に完全に援用される、すべて Lonberg および Kay、並びに GenPharm International に対する、米国特許第 5,545,806 号; 第 5,569,825 号; 第 5,625,126 号; 第 5,633,425 号; 第 5,789,650 号; 第 5,877,397 号; 第 5,661,016 号; 第 5,814,318 号; 第 5,874,299 号; および 第 5,770,429 号; Surani ら に対する米国特許第 5,545,807 号; 国際公報第 WO 98/24884 号、1998 年 6 月 11 日公開; 第 WO 94/25585 号、1994 年 11 月 10 日公開; 第 WO 93/1227 号、1993 年 6 月 24 日公開; 第 WO 92/22645 号、1992 年 12 月 23 日公開; 第 WO 92/03918 号、1992 年 3 月 19 日公開もまた、参照されたい。あるいは、トランスジェニックマウスを用いて、ヒト抗 CD148 抗体を



生成することも可能である。

【0106】

CD148に対する完全ヒト・モノクローナル抗体を生成するため、HuMAbマウスを、Lonberg, N.ら(1994)Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D.ら(1996)Nature Biotechnology 14:845-851およびWO 98/24884に記載されるように、CD148抗原を精製したかまたは濃縮した調製物、および/またはCD148を発現する細胞で免疫することも可能である。好ましくは、マウスは、最初の注入時、6~16週齢であろう。例えば、CD148抗原の精製したかまたは濃縮した調製物(例えばCD148を発現するLNCaP細胞から精製したもの)(5~20 $\mu$ g)を用いて、HuMAbマウスを腹腔内免疫することも可能である。CD148抗原を精製したかまたは濃縮した調製物を用いた免疫が抗体を生じない場合には、マウスをCD148発現細胞、例えば腫瘍細胞株でも免疫して、免疫応答を促進することも可能である。

10

【0107】

まず、完全フロイントアジュバント中の抗原で腹腔内(IP)免疫され、次いで不完全フロイントアジュバント中の抗原で、1週おきにi.p.免疫(総数6まで)された際に、多様な抗原での累積する経験によって、HuMAbトランスジェニックマウスが、よく応答することが示されている。後眼窩出血によって得た血漿試料を用いて、免疫プロトコル過程に渡って、免疫応答を監視することも可能である。血漿をELISA(以下に記載するようなもの)によってスクリーニングし、そして十分な力価の抗CD148ヒト免疫グロブリンを持つマウスを、融合に用いることも可能である。屠殺および脾臓除去の3日前に、抗原でマウスを静脈内追加免疫することも可能である。各抗原に対して2~3回の融合を行う必要があることが予期される。各抗原に関して数匹のマウスを免疫する。例えば、HC07およびHC012系統の総数12匹のHuMAbマウスを免疫することも可能である。

20

【0108】

さらに別の側面において、本発明は、本発明のCD148エピトープに特異的に結合するヒト・モノクローナル抗体を発現可能な、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスを提供する。好ましい態様において、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウス(HuMAbマウス)は、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。1つの態様において、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスは、CD148抗原を精製したかまたは濃縮した調製物および/またはCD148を発現している細胞で免疫されている。好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスは、V-D-J組換えおよびアイソタイプ・スイッチングを経ることによって、CD148に対するヒト・モノクローナル抗体の多数のアイソタイプ(例えばIgG、IgAおよび/またはIgE)を産生することが可能である。アイソタイプ・スイッチングは、例えば古典的または非古典的アイソタイプ・スイッチングによって起こることも可能である。

30

【0109】

異種抗体レパートリーでの外来抗原刺激に応答するトランスジェニック非ヒト動物の設計には、トランスジェニック動物に含有される異種免疫グロブリン導入遺伝子が、B細胞発生経路全体で正確に機能することが必要である。好ましい態様において、異種重鎖導入遺伝子の正確な機能には、アイソタイプ・スイッチングが含まれる。したがって、本発明の導入遺伝子は、アイソタイプ・スイッチング、および以下の1以上を生じるように構築される:(1)高レベルでそして細胞種特異的な発現、(2)機能する遺伝子再編成、(3)アレレル排除の活性化およびこれに対する応答、(4)十分な一次レパートリーの発現、(5)シグナル伝達、(6)体細胞超変異、および(7)免疫応答中の導入遺伝子抗体遺伝子座の支配。

40

【0110】

前述の基準すべてが満たされる必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性

50

免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されている態様では、導入遺伝子は、アレル排除を活性化する必要がない。さらに、導入遺伝子が、機能する、再編成された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む態様では、機能する遺伝子再編成の第二の基準は、少なくとも既に再編成されている導入遺伝子に関しては、不要である。分子免疫学の背景に関しては、本明細書に援用される、*Fundamental Immunology*, 第2版(1989), Paul William E. 監修 Raven Press, ニューヨーク州を参照されたい。

#### 【0111】

特定の態様において、本発明のヒト・モノクローナル抗体を生成するのに用いるトランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニック動物の生殖系列に、再編成された異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子、再編成されていない異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子、または再編成されたものおよび再編成されていないものの組み合わせを含有する。重鎖導入遺伝子は各々、少なくとも1つの $C_H$ 遺伝子を含む。さらに、重鎖導入遺伝子は、機能するアイソタイプ・スイッチ配列を含有することも可能であり、これは、トランスジェニック動物のB細胞において、多数の $C_H$ 遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプ・スイッチングを支持することが可能である。こうしたスイッチ配列は、導入遺伝子 $C_H$ 遺伝子の供給源として働く種由来の生殖系列免疫グロブリン遺伝子座に天然に存在するものであることも可能であるし、またはこうしたスイッチ配列は、導入遺伝子構築物を受け入れる種(トランスジェニック動物)に存在するものに由来することも可能である。例えば、トランスジェニックマウスを産生するのに用いられるヒト導入遺伝子構築物は、マウス重鎖遺伝子座に天然に存在するものと類似のスイッチ配列を取り込むと、より高い頻度のアイソタイプ・スイッチング事象を生じ、これはおそらく、マウス・スイッチ配列が最適化されて、マウス・スイッチ・レコンピナーゼ酵素系と機能するように最適化される一方、ヒト・スイッチ配列がそうでないためであろう。慣用的クローニング法によって、スイッチ配列を単離し、そしてクローニングすることも可能であるし、また免疫グロブリン・スイッチ領域配列に関連する、公表された配列情報に基づいて設計された重複合成オリゴヌクレオチドから、デノボで合成することも可能である(本明細書に援用される、Millsら, *Nucl. Acids Res.* 15:7305-7316(1991); Siderasら, *Intl. Immunol.* 1:631-642(1989))。前述のトランスジェニック動物各々に関して、機能する、再編成された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子は、トランスジェニック動物のB細胞のかなりの割合で(少なくとも10パーセント)見られる。

#### 【0112】

本発明のトランスジェニック動物を生成するのに用いる導入遺伝子には、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメント、および少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含む重鎖導入遺伝子が含まれる。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメント、および少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含む。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、これらが、トランスジェニック非ヒト動物からなるのではない種に由来する免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに由来するか、またはこうしたDNAに対応する点で、トランスジェニック非ヒト動物に対して異種である。導入遺伝子は、例えば、個々の遺伝子セグメントが再編成されないように、すなわち機能する免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするように再編成されないように、構築することも可能である。こうした未再編成導入遺伝子は、V、D、およびJ遺伝子セグメントの組換え(機能する再編成)を支持し、そして好ましくは、CD148抗原に曝露された際、トランスジェニック非ヒト動物内で生じる再編成免疫グロブリン重鎖において、D領域遺伝子セグメントのすべてまたは一部の取り込みを支持する。

#### 【0113】

導入遺伝子はまた、未再編成「ミニ遺伝子座」を含むことも可能である。こうした導入

遺伝子は、典型的には、C、D、およびJセグメントの実質的な部分、並びにV遺伝子セグメントのサブセットを含む。こうした導入遺伝子構築物において、多様な制御配列、例えばプロモーター、エンハンサー、クラス・スイッチ領域、RNAプロセシングのためのスプライス・ドナーおよびスプライス・アクセプター配列、組換えシグナル等は、異種DNA由来の対応する配列を含む。本発明で用いる非ヒト動物と同じ種または関連する種由来の導入遺伝子に、こうした制御配列を取り込むことも可能である。例えば、トランスジェニックマウスにおいて使用するため、導入遺伝子中で、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを、げっ歯類免疫グロブリン・エンハンサー配列と組み合わせることも可能である。あるいは、合成制御配列を導入遺伝子に取り込むことも可能であり、ここで、こうした合成制御配列は、哺乳動物ゲノムに天然に存在することが知られる機能するDNA配列と相同でない。コンセンサス・ルール、例えばスプライス・アクセプター部位またはプロモーター/エンハンサー・モチーフの許容される配列を特定するルールにしたがって、合成制御配列を設計する。例えば、ミニ遺伝子座は、天然存在生殖系列Ig遺伝子座に比較した際、必須でないDNA部分(例えば介在配列;イントロンまたはその一部)の少なくとも1つの内部(すなわち部分の末端でない)欠失を有する、ゲノム免疫グロブリン遺伝子座の部分を含む。

10

## 【0114】

その内容が本明細書に明確に援用される、WO 98/24884の実施例12に記載される導入遺伝子(例えばpHC1またはpHC2)を少なくとも1コピー、典型的には2~10コピー、そしてときに25~50またはそれより多いコピー数で含有するトランスジェニック動物を用いて、WO 98/24884の実施例5、6、8、または14に記載される軽鎖導入遺伝子の単一コピーを含有する動物と交配し、そしてその子孫をWO 98/24884の実施例10に記載されるJ<sub>H</sub>欠失動物と交配して、CD148に対するヒト抗体を生成することも可能である。これらの3つの特質各々に関して、動物はホモ接合体になるように交配される。こうした動物は、以下の遺伝子型を有する: ヒト重鎖未再編成ミニ遺伝子座の単一コピー(染色体の一倍体セットあたり)(WO 98/24884の実施例12に記載される)、再編成ヒト・カッパ軽鎖構築物の単一コピー(染色体の一倍体セットあたり)(WO 98/24884の実施例14に記載される)、および機能するJ<sub>H</sub>セグメントすべてを取り除く、各内因性マウス重鎖遺伝子座での欠失(WO 98/24884の実施例10に記載される)。こうした動物をJ<sub>H</sub>セグメントの欠失に関してホモ接合体であるマウス(WO 98/24884の実施例10に記載される)と交配して、J<sub>H</sub>欠失に関してホモ接合体であり、そしてヒト重鎖および軽鎖構築物に関して半接合体である子孫を産生する。生じた動物に抗原を注射し、そしてこれらの抗原に対するヒト・モノクローナル抗体の産生に用いる。

20

30

## 【0115】

こうした動物から単離されるB細胞は、各遺伝子の単一コピーしか含有しないため、ヒト重鎖および軽鎖に関して、単一特異性である。さらに、これらは、WO 98/24884の実施例9および12に記載されるように導入されたJ<sub>H</sub>領域に渡る欠失のために、内因性マウス重鎖遺伝子コピーがどちらも機能しないため、ヒトまたはマウス重鎖に関して単一特異性であろう。さらに、再編成されたヒト・カッパ軽鎖遺伝子の単一コピーの発現が、アレルのにそしてアイソタイプ的に、B細胞のかなりの割合の内因性マウス・カッパおよびラムダ鎖遺伝子の再編成を排除するため、B細胞のかなりの割合が、ヒトまたはマウス軽鎖に関して単一特異性であろう。

40

## 【0116】

好ましい態様のトランスジェニックマウスは、理想的には、天然マウスのものと実質的に類似の、有意なレパトリーを持つ免疫グロブリン産生を示すであろう。したがって、例えば、内因性Ig遺伝子が不活性化されている態様では、総免疫グロブリンレベルは、約0.1~10mg/血清ml、好ましくは0.5~5mg/ml、理想的には、少なくとも約1.0mg/mlの範囲であろう。IgMからIgGへのスイッチを達成することが可能な導入遺伝子をトランスジェニックマウスに導入する場合、成体マウスの血清Ig

50

G対IgMの比は、好ましくは約10:1である。未成熟マウスでは、IgG対IgMの比ははるかにより低いであろう。一般的に、脾臓およびリンパ節B細胞の約10%より多く、好ましくは40~80%が、ヒトIgGタンパク質のみを発現する。レポトリーは、理想的には、非トランスジェニックマウスで示されるものを近似し、通常、少なくとも約10%の高さであり、好ましくは25~50%、またはそれより高い。一般的に、マウス・ゲノムに導入された異なるV、JおよびD領域の数に主に依存して、少なくとも約1000の異なる免疫グロブリン(理想的にはIgG)、好ましくは $10^4 \sim 10^6$ またはそれより多くが産生されるであろう。これらの免疫グロブリンは、典型的には、非常に抗原性であるタンパク質、例えばブドウ球菌プロテインAの約半分以上を認識するであろう。典型的には、免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは約 $10^9 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、またはそれより高く、例えば $10^{13} M^{-1}$ 以上までの、あらかじめ選択した抗原に対する親和性を示すであろう。

10

#### 【0117】

いくつかの態様において、あらかじめ決定した抗原種に対する抗体応答で示されるV遺伝子の選択を限定する、あらかじめ決定したレポトリーを持つマウスを生成することが好ましい可能性もある。あらかじめ決定したレポトリーを有する重鎖導入遺伝子は、例えば、ヒトにおいてあらかじめ決定した抗原種に対する抗体反応で優先的に用いられる、ヒト $V_H$ 遺伝子を含むことも可能である。あるいは、多様な理由で(例えばあらかじめ決定した抗原に対して高親和性V領域をコードする可能性が低い;体細胞突然変異および親和性鮮鋭化を経る傾向が低い;または特定のヒトに対して免疫原性である)、定義するレポトリーからいくつかの $V_H$ 遺伝子を排除することも可能である。したがって、多様な重鎖または軽鎖遺伝子セグメントを含有する導入遺伝子の再編成前に、こうした遺伝子セグメントを、例えばハイブリダイゼーションまたはDNA配列決定によって、トランスジェニック動物以外の生物種に由来するとして、容易に同定することも可能である。

20

#### 【0118】

先に記載するように、CD148抗原を精製したかまたは濃縮した調製物、および/またはCD148を発現する細胞で、本発明のトランスジェニックマウスを免疫することも可能である。マウスはB細胞を産生し、この細胞は導入遺伝子内スイッチ組換え(シス・スイッチング)を経て、そしてCD148に反応性である免疫グロブリンを発現するであろう。免疫グロブリンは、ヒト配列抗体であることも可能であり、ここで、重鎖および軽鎖ポリペプチドは、ヒト導入遺伝子配列にコードされ、該配列は、体細胞突然変異およびV領域組換え連結によって得られる配列、並びに生殖系列コード配列を含むことも可能であり;体細胞突然変異、並びに示差V-JおよびV-D-J組換え連結の結果として、他の非生殖系列配列が存在する可能性もあるが、これらのヒト配列免疫グロブリンを、ヒト $V_L$ または $V_H$ 遺伝子セグメントおよびヒト $J_L$ または $J_H$ セグメントにコードされるポリペプチド配列と実質的に同一と称することも可能である。こうしたヒト配列抗体に関して、各鎖の可変領域は、典型的には、その少なくとも80%が、ヒト生殖系列V、J、および重鎖の場合、D遺伝子セグメントによってコードされ;しばしば可変領域の少なくとも85%が、導入遺伝子上に存在するヒト生殖系列配列にコードされ;しばしば、可変領域配列の90または95パーセント以上が、導入遺伝子上に存在するヒト生殖系列配列にコードされる。しかし、非生殖系列配列が、体細胞突然変異、並びにVJおよびVDJ連結によって導入されるため、ヒト配列抗体は、しばしば、マウスの生殖系列中のヒト導入遺伝子(単数または複数)に見られるような、ヒトV、D、またはJ遺伝子セグメントにコードされない、いくつかの可変領域配列(およびより頻繁でなく、定常領域配列)を有するであろう。典型的には、こうした非生殖系列配列(または個々のヌクレオチド位)は、CDR内またはCDR近傍、あるいは体細胞突然変異がクラスター形成することが知られる領域で、クラスター形成するであろう。

30

40

#### 【0119】

あらかじめ決定した抗原に結合するヒト配列抗体は、ヒト配列鎖(1、2a、

50

2 B、または 3 など) およびヒト配列軽鎖(カッパ軽鎖など)を含むヒト抗体が産生されるような、アイソタイプ・スイッチングから生じることにも可能である。こうしたアイソタイプ・スイッチングしたヒト配列抗体は、しばしば、抗原による親和性成熟およびB細胞の選択の結果として、特に二次(または続く)抗原曝露に続いて、1以上の体細胞突然変異(単数または複数)を、典型的には可変領域に、そしてしばしばCDRの約10残基中または10残基内に含有する。

#### 【0120】

マウス生殖系列が、JおよびC遺伝子セグメントを含有するヒトIg導入遺伝子には実質的に存在しない、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する、機能するYACを含有するように操作されたならば、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する、機能するYACを、異なるヒトIg導入遺伝子を有するマウス生殖系列内に交配する場合の背景を含めて、他の遺伝子背景にこの特質を伝播させて、そして交配することも可能である。拡大されたVセグメント・レパートリーを有する多数の機能するYACを生殖系列内に交配して、ヒトIg導入遺伝子(または多数のヒトIg導入遺伝子)とともに作用させることも可能である。本明細書において、YAC導入遺伝子と称するが、ゲノムに組み込まれた際には、こうした導入遺伝子は、酵母配列、例えば酵母における自律複製に必要な配列を実質的に欠くことも可能であり;酵母における複製がもはや必要でなくなった後(すなわちマウスES細胞またはマウス・プロ接合体(prozygote)に導入する前)、場合によって、遺伝子操作(例えば制限消化およびパルスフィールドゲル電気泳動または他の適切な方法)によって、こうした配列を取り除くことも可能である。ヒト配列免疫グロブリン発現の特質を伝播する方法は、ヒトIg導入遺伝子(単数または複数)を有し、そして場合によって、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する、機能するYACを有するトランスジェニック動物を、交配することを含む。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子セグメントの両方がYAC上に存在することも可能である。ヒトIg導入遺伝子および/または他のヒト・リンパ球タンパク質をコードする導入遺伝子を含む、他のヒト導入遺伝子を宿する背景を含めて、実験者が望むいかなる背景に、トランスジェニックマウスを交配することも可能である。本発明はまた、拡大されたV領域レパートリーYAC導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスによって産生される、高親和性ヒト配列免疫グロブリンも提供する。前述のものは、本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様を記載するが、(1)未再編成重鎖および再編成軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物; (2)未再編成重鎖および未再編成軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物; (3)再編成重鎖および未再編成軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物; 並びに(4)再編成重鎖および再編成軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物を含む、他の態様が意図される。

#### CD148に結合する二重特異性/多重特異性分子

本発明のさらに別の態様において、CD148に対するヒト・モノクローナル抗体またはその抗原結合性領域を誘導体化するか、または別の機能分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えばFab'断片)に連結して、多数の結合部位またはターゲット・エピトープに結合する、二重特異性分子または多重特異性分子を生成することも可能である。例えば、本発明の抗体または抗原結合性領域を、1以上の他の結合性分子、例えば別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合性模倣体に、(例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合またはその他の方式によって)機能可能であるように連結することも可能である。

#### 【0121】

したがって、本発明は、CD148に対する少なくとも1つの第一の結合特異性および第二のターゲット・エピトープに対する第二の結合特異性を含む、二重特異性分子および多重特異性分子を含む。本発明の特定の態様において、第二のターゲット・エピトープは、Fc受容体、例えばヒトFcRI(CD64)またはヒトFc受容体(CD89)である。したがって、本発明には、FcR、FcRまたはFcCR発現エフェクタ

10

20

30

40

50

一細胞（例えば単球、マクロファージまたは多形核細胞（PMN））、およびCD148を発現するターゲット細胞の両方に結合可能な、二重特異性分子および多重特異性分子が含まれる。これらの二重特異性分子および多重特異性分子は、CD148発現細胞をエフェクター細胞にターゲティングし、そして本発明のヒト・モノクローナル抗体同様、Fc受容体が仲介するエフェクター細胞活性、例えばCD148発現細胞の食作用、抗体依存性細胞仲介性細胞傷害（ADCC）、サイトカイン放出、またはスーパーオキシド・アニオンの生成を誘発する。

#### 【0122】

本発明の二重特異性分子および多重特異性分子は、抗Fc結合特異性および抗CD148結合特異性に加えて、第三の結合特異性をさらに含むことも可能である。1つの態様において、第三の結合特異性は、抗増進因子（EF）部分、例えば細胞傷害活性に關与する表面タンパク質に結合し、そしてそれによって、ターゲット細胞に対する免疫応答を増加させる分子である。「抗増進因子部分」は、所定の分子、例えば抗原または受容体に結合し、そしてそれによってFc受容体またはターゲット細胞抗原に対する結合性決定基の効果の増進を生じる、抗体、機能する抗体断片、またはリガンドであることも可能である。「抗増進因子部分」は、Fc受容体またはターゲット細胞抗原に結合することも可能である。あるいは、抗増進因子部分は、第一および第二の結合特異性が結合する実体とは異なる実体に結合することも可能である。例えば、抗増進因子部分は、細胞傷害性T細胞（例えば、CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1を介して、またはターゲット細胞に対する免疫応答増加を生じる他の免疫細胞に）に結合することも可能である。

#### 【0123】

1つの態様において、本発明の二重特異性分子および多重特異性分子は、結合特異性として、少なくとも1つの抗体、あるいは例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、または一本鎖Fvを含む、その抗体断片を含む。抗体はまた、軽鎖または重鎖二量体、あるいはその内容が本明細書に明確に援用される、Ladnerら、米国特許第4,946,778号に記載されるような、Fvまたは一本鎖構築物などの最小断片いずれかであることも可能である。

#### 【0124】

別の態様において、本発明の二重特異性分子および多重特異性分子は、エフェクター細胞表面に存在するFcRまたはFcRに対する結合特異性、およびターゲット細胞抗原、例えばCD148に対する第二の結合特異性を含む。

#### 【0125】

別の態様において、ヒト・モノクローナル抗体による、Fc受容体に対する結合特異性であって、その結合がヒト免疫グロブリンG（IgG）によってブロックされない、前記特異性を提供する。本明細書において、用語「IgG受容体」は、染色体1上に位置する8つの鎖遺伝子のいずれかを指す。これらの遺伝子は、総数12の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードし、これらは、3つのFc受容体クラス：FcRI（CD64）、FcRII（CD32）、およびFcRIII（CD16）に分類される。1つの好ましい態様において、Fc受容体は、ヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは、72kDa分子であり、単量体IgGに高親和性を示す（ $10^8 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ）。

#### 【0126】

これらの好ましいモノクローナル抗体の産生および性質決定は、Fangerら、PCT出願WO88/00052および米国特許第4,954,617号に記載され、これらの解説は、本明細書に完全に援用される。これらの抗体は、受容体のFc結合部位とは異なる部位で、FcRI、FcRIIまたはFcRIIIのエピトープに結合し、そしてしたがって、これらの結合は、生理学的レベルのIgGによっては、実質的に遮断されない。本発明で有用な、特異的抗FcRI抗体は、MAb22、MAb32、MAb44、MAb62およびMAb197である。MAb32を産生するハイブリドーマが

、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC寄託番号HB9469から入手可能である。抗FcRI MA b 2 2、MA b 2 2のF(ab')<sub>2</sub>断片は、Medarex, Inc (ニュージャージー州アナンデール)から得られうる。他の態様において、抗Fc受容体抗体は、モノクローナル抗体22のヒト化型(H22)である。H22抗体の産生および性質決定は、Graziano, R. F.ら(1995) J. Immunol 155(10):4996-5002およびPCT/US93/10384に記載される。H22抗体産生細胞株が、1992年11月4日、名称HA022CL1でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、そして寄託番号RL11177を有する。

#### 【0127】

さらに他の好ましい態様において、ヒトIgA受容体、例えばFcアルファ受容体(FcRI(CD89))に結合する抗体によって、Fc受容体に対する結合特異性を提供し、この結合は、好ましくは、ヒト免疫グロブリンA(IgA)によって遮断されない。用語「IgA受容体」は、染色体19上に位置する1つの遺伝子(FcRI)の遺伝子産物を含むように意図される。この遺伝子は、55~110kDaのいくつかの選択的スプライシング膜貫通アイソフォームをコードすることが知られる。FcRI(CD89)は、単球/マクロファージ、好酸性および好中性の顆粒球上で恒常的に発現されるが、非エフェクター細胞集団上では発現されない。FcRIは、IgA1およびIgA2両方に対して、中程度の親和性(およそ $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ に等しい)を有し、G-CSFまたはGM-CSFなどのサイトカインに曝露されると増加する(Mortonら, Critical Reviews in Immunology 16:423-440(1996))。IgAリガンド結合性ドメイン外部でFcRIに結合する、A3、A59、A62およびA77と同定される4つのFcRI特異的モノクローナル抗体が、例えば、Monteiroら, J. Immunol. 148:1764(1992)に記載されてきている。

#### 【0128】

別の態様において、本発明の抗体は、ヒトIgG1アイソタイプのFc部分(CH2およびCH3)に直接融合したscFv断片の形(本明細書においてscFv-Fc構築物と称される)を取ることにも可能である。scFv-Fc融合体の構築は、例えばFredricksら, Protein Engineering Design and Selection 17:95-106(2003)、Powersら, J. Immunological Methods 251:123-135(2001)、Shuら, PNAS 90:7995-7999(1993)、およびHaydenら, Therapeutic Immunology 1:3-15(1994)に開示される。

#### 【0129】

FcRIおよびFcRIは、(1)主に、免疫エフェクター細胞、例えば単球、PMN、マクロファージおよび樹状細胞上で発現され；(2)高レベル(例えば細胞あたり5,000~100,000)で発現され；(3)細胞傷害活性(例えばADCC、食作用)の仲介因子であり；(4)自身をターゲットとする、自己抗原を含む抗原の抗原提示増進を仲介するため、本発明で使用するのが好ましい誘発受容体である。

#### 【0130】

他の態様において、本発明の二重特異性分子および多重特異性分子は、ターゲット細胞抗原、例えばCD148を認識し、例えばこれに結合する、結合特異性をさらに含む。1つの特定の態様において、結合特異性は、本発明のヒト・モノクローナル抗体によって提供される。

#### 【0131】

ヒト・モノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異性分子または多重特異性分子で使用可能な他の抗体は、ネズミ、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体である。

キメラ・マウス-ヒト・モノクローナル抗体(すなわちキメラ抗体)は、当該技術分野

10

20

30

40

50

に知られる組換えDNA技術によって産生可能である。例えば、ネズミ（または他の種）のモノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子を、制限酵素で消化して、ネズミFcをコードする領域を取り除き、そしてヒトFc定常領域をコードする遺伝子の同等の部分と交換する。（Robinsonら、国際特許公報PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願184,187；Taniguchi, M., 欧州特許出願171,496；Morrissonら、欧州特許出願173,494；Neubergerら、国際出願WO 86/01533；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願125,023；Betterら, Science 240:1041-1043(1988)；Liら, PNAS 84:3439-3443(1987)；Liuら, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら(1987) PNAS 84:214-218；Nishimuraら, Canc. Res. 47:999-1005(1987)；Woodら, Nature 314:446-449(1985)；およびShawら, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559(1988)を参照されたい。

#### 【0132】

抗原結合に直接関与しないFv可変領域の配列を、ヒトFv可変領域由来の同等の配列と交換することによって、キメラ抗体をさらにヒト化することも可能である。ヒト化キメラ抗体の一般的な概説は、Morrisson, Science 229:1202-1207(1985)およびOira, BioTechniques 4:214(1986)に提供される。これらの方法は、少なくとも1つの重鎖または軽鎖由来の免疫グロブリンFv可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離し、操作し、そして発現させることを含む。こうした核酸の供給源は、当業者に周知であり、そして例えば、抗GPII<sub>b</sub>III<sub>a</sub>抗体産生ハイブリドーマである、7E3から得ることも可能である。次いで、キメラ抗体をコードする組換えDNA、またはその断片を適切な発現ベクターにクローニングすることも可能である。あるいは、適切なヒト化抗体をCDR置換によって産生することも可能である。米国特許第5,225,539号；Jonesら, Nature 321:552-525(1986)；Verhoeyanら, Science 239:1534(1988)；およびBeidlerら, J. Immunol. 141:4053-4060(1988)。

#### 【0133】

特定のヒト抗体のCDRを、非ヒトCDRの少なくとも一部で置き換えるか、またはCDRのいくつかのみを、非ヒトCDRで置き換えることも可能である。Fc受容体へのヒト化抗体の結合に必要な数のCDRを置き換えればよい。

#### 【0134】

ヒト抗体のCDRの少なくとも一部を、非ヒト抗体由来のCDRで置き換えることが可能ないかなる方法によって、抗体をヒト化することも可能である。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するのに使用可能な方法を記載し（UK特許出願GB2188638A、1987年3月26日出願）、該出願の内容は、本明細書に明確に援用される。Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytesと題される、国際出願WO 94/10332に記載されるように、オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発を用いて、ヒトCDRを非ヒトCDRで置き換えることも可能である。

#### 【0135】

やはり本発明の範囲内にあるのは、特定のアミノ酸が置換されているか、欠失されているかまたは付加されている、キメラおよびヒト化抗体である。特に、好ましいヒト化抗体は、抗原への結合を改善するなどのため、フレームワーク領域でアミノ酸置換を有する。例えば、マウスCDRを有するヒト化抗体において、ヒト・フレームワーク領域に位置するアミノ酸を、マウス抗体の対応する位に位置するアミノ酸で置き換えることも可能であ



る。こうした置換は、いくつかの場合、抗原に対するヒト化抗体の結合を改善することが知られる。アミノ酸が付加されているか、欠失されているか、または置換されている抗体を、本明細書において、修飾抗体または改変抗体と称する。

【0136】

用語、修飾抗体はまた、抗体の一部を例えば欠失させるか、付加するか、または置換することによって、修飾されている、モノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体などの抗体を含むよう意図される。例えば、定常領域を欠失させ、そして抗体の半減期、例えば血清半減期、安定性または親和性を増加させることを意図する定常領域で置き換えることによって、抗体を修飾することも可能である。二重特異性分子および多重特異性分子が、Fc Rに特異的な少なくとも1つの抗原結合性領域を有し、そして少なくとも1つのエフェクター機能を誘発する限り、いかなる修飾も本発明の範囲内である。

【0137】

本発明の二重特異性分子および多重特異性分子を、化学的技術(例えば、D. M. Krantzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807(1981)、「ポリオーマ」技術(Readingに対する米国特許第4,474,893号を参照されたい)、または組み換えDNA技術を用いて作製することも可能である。

【0138】

特に、当該技術分野に知られ、そして本明細書に提供する実施例に記載する方法を用いて、恒常的結合特異性、例えば抗FcRおよび抗CD148結合特異性をコンジュゲート化することによって、本発明の二重特異性分子および多重特異性分子を調製することも可能である。例えば、二重特異性分子および多重特異性分子の各結合特異性を別個に生成し、そして次いで互いにコンジュゲート化することも可能である。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、共有コンジュゲート化には、多様なカップリング剤または架橋剤が使用可能である。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)(例えば、Karpovskiyら(1984)J. Exp. Med. 160:1686;Liu, M. A.ら(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい)。他の方法には、Paulus(Behring Ins. Mitt. (1985)No. 78, 118-132);Brennanら(Science(1985)229:81-83)およびGlennieら(J. Immunol. (1987)139:2367-2375)に記載されるものが含まれる。好ましいコンジュゲート化剤は、SATAおよびスルホ-SMCCであり、どちらもPierce Chemical Co.(イリノイ州ロックフォード)から入手可能である。

【0139】

いかなる「リンカー」基も任意である。存在する場合、主にスペーサーとして働くため、リンカーの化学構造は重要ではない。リンカーは、好ましくは、ペプチド結合によって共に連結されたアミノ酸で構成される。したがって、好ましい態様において、リンカーは、ペプチド結合によって連結された1~20のアミノ酸で構成され、ここで、アミノ酸は20の天然存在アミノ酸から選択される。当業者によく理解されるように、これらのアミノ酸の1以上がグリコシル化されていることも可能である。より好ましい態様において、1~20のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリジンから選択される。さらにより好ましくは、リンカーは、アミノ酸の大部分が、グリシンおよびアラニンなどの立体的に障害がないアミノ酸で構成される。したがって、好ましいリンカーは、ポリグリシン(特に(Gly)<sub>5</sub>、(Gly)<sub>8</sub>)ポリ(Gly-Ala)、およびポリアラニンである。GlyおよびAlaの組み合わせもまた好ましい

10

20

30

40

50

。

## 【0140】

非ペプチド・リンカーもまた可能である。例えば、 $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$ 、式中、 $s = 2 \sim 20$ などのアルキルリンカーを使用することも可能である。低次アルキル（例えばC1～C6）、低次アシル、ハロゲン（例えばCl、Br）、CN、NH<sub>2</sub>、フェニルなどの非立体障害基いずれかによって、これらのアルキルリンカーをさらに置換することも可能である。典型的な非ペプチド・リンカーはPEGリンカーであり、そして100～5000kDa、好ましくは100～500kDaの分子量を有する。上述のものと同じ方式で、ペプチドリンカーを改変して、誘導体を形成することも可能である。

10

## 【0141】

結合特異性が抗体（例えば2つのヒト化抗体）である場合、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフィドリル結合を介して、これらをコンジュゲート化することも可能である。特定の好ましい態様において、ヒンジ領域を修飾して、コンジュゲート化前に、奇数、好ましくは1つのスルフィドリル残基を含有させる。

## 【0142】

あるいは、両方の結合特異性が同じベクターにコードされ、そして発現され、そして同じ宿主細胞中で組み立てられることも可能である。二重特異性分子および多重特異性分子が、 $Mab \times MA b$ 、 $Mab \times Fab$ 、 $Fab \times F(ab')_2$ 、またはリガンド $\times Fab$ 融合タンパク質である場合、この方法は、特に有用である。本発明の二重特異性分子および多重特異性分子、例えば二重特異性分子は、一本鎖分子、例えば一本鎖二重特異性抗体、1つの一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子、または2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であることも可能である。二重特異性分子および多重特異性分子はまた、一本鎖分子であることも可能であるし、または少なくとも2つの一本鎖分子を含むことも可能である。二重特異性分子および多重特異性分子を調製するための方法は、例えば米国特許第5,260,203号；米国特許第5,455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；および米国特許第5,482,858号に記載される。

20

## 【0143】

特異的ターゲットへの二重特異性分子および多重特異性分子の結合を、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、FACS分析、バイオアッセイ（例えば増殖阻害）、またはウェスタンブロットアッセイによって、確認することも可能である。これらのアッセイは各々、一般的に、特定の関心対象のタンパク質-抗体複合体に特異的な標識試薬（例えば抗体）を使用することによって、関心対象の複合体の存在を検出する。例えば、抗体-FcR複合体を認識し、そしてこれに特異的に結合する、例えば酵素連結抗体または抗体断片を用いて、FcR-抗体複合体を検出することも可能である。あるいは、多様な他のイムノアッセイいずれかを用いて、複合体を検出することも可能である。例えば、抗体を放射標識して、そしてラジオイムノアッセイ（RIA）で用いることも可能である（例えば、本明細書に援用される、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい）。カウンターまたはシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、あるいはオートラジオグラフィーによって、放射性同位体を検出することも可能である。

30

40

## 【0144】

特定の位置にターゲティング送達するため、抗体およびその抗原結合性領域を、ビヒクルと組み合わせることもまた可能である。

1つの態様において、本発明は、ペプチド（単数または複数）のN末端、C末端または

50

アミノ酸残基の1つの側鎖を通じて、少なくとも1つのビヒクル(F1、F2)に付着した、抗体、またはその抗原結合性領域を提供する。多数のビヒクルを使用することもまた可能である；例えば各末端にFcを、または、一方の末端にFcを、そして他方の末端または側鎖にPEG基を使用してもよい。

【0145】

Fcドメインは、1つの好ましいビヒクルである。Fcドメインを、ペプチドのNまたはC末端に、あるいはNおよびC末端の両方に融合させることも可能である。

上述のように、Fc変異体は、本発明の範囲内の適切なビヒクルである。サルベージ受容体への結合が維持されることを条件として、天然Fcを徹底的に修飾して、本発明にしたがったFc変異体を形成することも可能である。例えば、WO 97/34631およびWO 96/32478を参照されたい。こうしたFc変異体において、本発明の融合分子に必要でない構造特徴または機能活性を提供する天然Fcの1以上の部位を除去することも可能である。例えば残基を置換するかまたは欠失させるか、該部位内に残基を挿入するか、または該部位を含有する部分を一部切除することによって、これらの部位を取り除くことも可能である。挿入されたかまたは置換された残基はまた、改変されたアミノ酸、例えばペプチド模倣体またはD-アミノ酸であることも可能である。Fc変異体は、いくつかの理由で望ましい可能性もあり、そのうちのいくつかを以下に記載する。典型的なFc変異体には、以下のような分子および配列が含まれる：

1. ジスルフィド結合形成に關与する部位を除去する。こうした除去は、本発明の分子を産生するのに用いる宿主細胞に存在する、他のシステイン含有タンパク質との反応を回避することも可能である。この目的のため、N末端のシステイン含有セグメントを一部切除することも可能であるし、あるいはシステイン残基を欠失させるかまたは他のアミノ酸(例えばアラニル、セリル)で置換することも可能である。システイン残基を取り除く場合であっても、一本鎖Fcドメインは、非共有的に一緒に保持される二量体Fcドメインをなお形成可能である。

【0146】

2. 天然Fcを修飾して、選択した宿主細胞により適合するようにする。例えば、プロリン・イミノペプチダーゼなどの大腸菌(E. coli)の消化酵素に認識されうる、典型的な天然FcのN末端近傍のPA配列を除去することも可能である。また、特に、分子が、大腸菌などの細菌細胞において、組換え的に発現される場合には、N末端メチオニル残基を付加することも可能である。

【0147】

3. 天然FcのN末端部分を除去して、選択した宿主細胞で発現させた際のN末端不均一性を防止する。この目的のため、N末端の最初の20アミノ酸残基のいずれか、特に1位、2位、3位、4位および5位のを欠失させることも可能である。

【0148】

4. 1以上のグリコシル化部位を除去する。典型的にはグリコシル化される残基(例えばアスパラギン)は、細胞溶解応答を与えうる。こうした残基を欠失させるか、または非グリコシル化残基(例えばアラニン)で置換することも可能である。

【0149】

5. 補体との相互作用に關与する部位、例えばC1q結合性部位を除去する。例えば、ヒトIgG1のEKK配列を欠失させるかまたは置換することも可能である。補体補充は、本発明の分子には好適でない可能性もあり、そしてしたがって、これをこうしたFc変異体で回避することも可能である。

【0150】

6. サルベージ受容体以外のFc受容体への結合に影響を及ぼす部位を除去する。天然Fcは、本発明の融合分子に必要でない、特定の白血球との相互作用のための部位を有することも可能であるし、そしてしたがって、こうした部位を除去することも可能である。

【0151】

7. ADC C部位を除去する。ADC C部位は、当該技術分野に知られる。例えば、I

10

20

30

40

50

g G 1におけるA D C C部位に関しては、M o l e c . I m m u n o l . 2 9 ( 5 ) : 6 3 3 - 9 ( 1 9 9 2 )を参照されたい。これらの部位もまた、本発明の融合分子には必要でなく、そしてしたがって、除去可能である。

【 0 1 5 2 】

8 . 天然 F c が非ヒト抗体に由来する場合、天然 F c をヒト化することも可能である。典型的には、天然 F c をヒト化するため、非ヒト天然 F c 中の選択した残基を、ヒト天然 F c で通常見られる残基で置換する。抗体ヒト化のための技術は当該技術分野に周知である。

【 0 1 5 3 】

別のビヒクルは、サルベージ受容体に結合可能な、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗体断片、または小分子（例えばペプチド模倣体化合物）であろう。例えば、P r e s t a に対する米国特許第 5 , 7 3 9 , 2 7 7 号、1 9 9 8 年 4 月 1 4 日発行に記載されるようなポリペプチドを、ビヒクルとして使用することも可能である。また、F c R n サルベージ受容体への結合に関して、ファージディスプレイによってペプチドを選択することも可能である。こうしたサルベージ受容体結合性化合物もまた、「ビヒクル」の意味に含まれ、そして本発明の範囲内にある。こうしたビヒクルは、半減期増加（例えばプロテアーゼに認識される配列を回避することによる）および免疫原性減少（例えば抗体ヒト化において発見されるような、非免疫原性配列を支持することによって）に関して選択されるべきである。

10

【 0 1 5 4 】

上述のように、F 1 および F 2 には、ポリマービヒクルもまた使用可能である。ビヒクルとして有用な化学部分を付着させる多様な手段が、現在、利用可能であり、例えば本明細書に完全に援用される、“N - T e r m i n a l l y C h e m i c a l l y M o d i f i e d P r o t e i n C o m p o s i t i o n s a n d M e t h o d s ”と題される、特許協力条約（「P C T」）国際公報第 W O 9 6 / 1 1 9 5 3 号を参照されたい。この P C T 公報は、とりわけ、タンパク質の N 末端への水溶性ポリマーの選択的付着を開示する。

20

【 0 1 5 5 】

好ましいポリマービヒクルは、ポリエチレングリコール（P E G）である。P E G 基は、好適な分子量いずれかであることも可能であり、そして直鎖または分枝鎖であることも可能である。P E G の平均分子量は、好ましくは、約 2 キロダルトン（「k D a」）～約 1 0 0 k D a、より好ましくは約 5 k D a ～約 5 0 k D a、最も好ましくは約 5 k D a ～約 1 0 k D a の範囲であろう。一般的に、P E G 部分上の反応性基（例えばアルデヒド、アミノ、チオール、またはエステル基）を通じた、本発明の化合物上の反応性基（例えばアルデヒド、アミノ、またはエステル基）への、アシル化または還元性アルキル化を介して、P E G 基を本発明の化合物に付着する。

30

【 0 1 5 6 】

合成ペプチドの P E G 化に有用な戦略は、溶液中でコンジュゲート連結を形成することを通じて、各々互いに対して反応性である特別の官能性を所持する、ペプチドおよび P E G 部分を結合させることからなる。当該技術分野に知られるように、慣用的固相合成で、ペプチドを容易に調製することも可能である。特定の部位で、適切な官能基を用いて、ペプチドを「あらかじめ活性化」する。P E G 部分と反応させる前に、前駆体を精製し、そして完全に性質決定する。ペプチドと P E G の連結は、通常、水性相で起こり、そして逆相分析用 H P L C によって、容易に監視可能である。調製用 H P L C によって P E G 化ペプチドを容易に精製し、そして分析用 H P L C、アミノ酸分析およびレーザー脱離質量分析によって、性質決定することも可能である。

40

【 0 1 5 7 】

多糖ポリマーは、タンパク質修飾に使用可能な別の種類の水溶性ポリマーである。デキストランは、主に α 1 - 6 連結によって連結された個々のグルコース・サブユニットで構成される多糖ポリマーである。デキストラン自体は、多くの分子量範囲で入手可能であり

50

、そして約1 kDa ~ 約70 kDaの分子量で、容易に入手可能である。デキストランは、それ自体、ビヒクルとして、または別のビヒクル（例えばFc）と組み合わせて、本発明で使用するのに適した水溶性ポリマーである。例えばWO 96/11953およびWO 96/05309を参照されたい。療法的または診断的免疫グロブリンにコンジュゲート化されたデキストランの使用が報告されてきており；例えば本明細書に援用される欧州特許出願第0 315 456号を参照されたい。デキストランを本発明にしたがったビヒクルとして用いる場合、約1 kDa ~ 約20 kDaのデキストランが好ましい。

#### 抗体コンジュゲート / 免疫毒素

別の側面において、本発明は、細胞毒素、薬剤または放射性同位体などの療法部分にコンジュゲート化された、ヒト抗CD148モノクローナル抗体またはその断片を特徴とする。細胞毒素にコンジュゲート化されると、これらの抗体コンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒素および細胞傷害剤には、細胞に有害な（例えば細胞を死滅させる）いかなる剤も含まれる。例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンB、エチジウムプロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、並びにその類似体または相同体が含まれる。療法剤には、限定されるわけではないが、代謝拮抗剤（例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル、デカルバジン（*decarbazine*））、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオエパ（*thioepa*））、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド（*cyclophosphamide*）、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）、シスプラチン）、アントラサイクリン（例えばダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えばダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および有糸分裂阻害剤（例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン）が含まれる。本発明の抗体にコンジュゲート化可能な療法的細胞毒素の他の例には、カリケアマイシンおよびデュオカルマイシンが含まれる。本発明の抗体を、放射性同位体、例えば放射性ヨウ素にコンジュゲート化して、CD148関連障害、例えば癌の治療のための細胞傷害性放射性薬剤を生成することも可能である。

#### 【0158】

本発明の抗体コンジュゲートを用いて、所定の生物学的反応を修飾することも可能であり、そして薬剤部分は、古典的薬学療法剤に限定されると解釈されないものとする。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を所持するタンパク質またはポリペプチドであることも可能である。こうしたタンパク質には、例えば、酵素的活性毒素、またはその活性断片、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素；腫瘍壊死因子またはインターフェロン・ガンマなどのタンパク質；あるいは生物学的反応修飾剤、例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の増殖因子が含まれることも可能である。

#### 【0159】

こうした療法部分を抗体にコンジュゲート化するための技術が周知であり、例えば、Arnoldら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy中、Reisfeldら（監修）、pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)；Hellstromら、"Antibodies For

10

20

30

40

50

Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery 中(第2版), Robinsonら(監修), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications 中, Pincheraら(監修), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy 中, Baldwinら(監修), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、および Thorpeら, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) を参照されたい。

#### 薬剤組成物

抗CD148抗体の薬剤組成物は、本発明の範囲内である。抗体を含む薬剤組成物が、例えば、Lamに対する米国特許第6,171,586号、2001年1月9日発行に詳細に記載される。こうした組成物は、薬学的に許容しうるキャリアーおよび/または薬学的に許容しうる塩と混合された、本明細書記載の抗体、あるいはその断片、変異体、誘導体、または融合体を、療法的または予防的有効量で含む。好ましい態様において、薬剤組成物は、CD148エピトープに結合し、CD148活性を活性化する抗体であって、薬学的に許容しうるキャリアーおよび/または薬学的に許容しうる塩と混合された、前記抗体を含む。典型的には、特異的結合剤は、動物への投与のため、十分に精製されるであろう。

#### 薬学的に許容しうるキャリアー

本明細書において、「薬学的に許容しうるキャリアー」には、生理学的に適合する、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張性剤および吸収遅延剤等が含まれる。特定の態様において、キャリアーは、静脈内、筋内、皮下、非経口、脊髄または硬膜外投与(例えば注射または注入による)に適している。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち抗体、二重特異性分子および多重特異性分子を、物質中でコーティングして、化合物を不活性化しうる酸の作用および他の天然条件から化合物を保護することも可能である。別の特定の態様において、ヒトにおいて薬学的に許容しうるキャリアーを用いて、薬剤組成物を配合する。

#### 【0160】

本発明の薬剤組成物で使用可能な、適切な水性および非水性キャリアーの例には、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、およびその適切な混合物、植物油、例えばオリーブオイル、並びに注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルが含まれる。例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することによって、分散の場合は、必要な粒子サイズを維持することによって、そして界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することも可能である。

#### 【0161】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントも含有することも可能である。上記の滅菌法、並びに多様な抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の包含の両方によって、微生物の存在の防止を確実にすることも可能である。等張性剤、例えば糖、塩化ナトリウム等を組成物中に含むことが望ましい可能性もまたある。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの、吸収を遅延させる剤を包含することによって、注射用薬剤型の緩

慢な吸収を達成することも可能である。

【0162】

「薬学的に許容しうる塩」は、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、そしていかなる望ましくない毒物学的効果も与えない塩を指す（例えば、Berge, S.M.ら(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい）。こうした塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸等の非毒性無機酸に由来するもの、並びに脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸等の非毒性有機酸に由来するものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属に由来するもの、並びにN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等の非毒性有機アミンに由来するものが含まれる。

10

【0163】

本発明の薬剤組成物は、例えば組成物のpH、モル浸透圧濃度、粘性、透明度、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解または放出速度、吸収または浸透速度を修飾するか、維持するか、または保存するための配合材料を含有することも可能である。適切な配合材料には、限定されるわけではないが、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなど）；抗菌剤；酸化防止剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウムなど）；緩衝剤（ホウ酸、重炭酸、Tris-HCl、クエン酸、リン酸、他の有機酸など）；充填剤（マンニトールまたはグリシンなど）、キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンなど）；増量剤；単糖；二糖および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど）；着色剤；フレーバー剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成性対イオン（ナトリウムなど）；保存剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニックス、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えばポリソルベート20、ポリソルベート80など、Triton、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパルなど）；安定性増進剤（スクロースまたはソルビトール）；等張化増進剤（アルカリ金属ハロゲン化物（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール））；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および/または薬剤佐剤が含まれる（Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A.R. Gennaro, 監修, Mack Publishing Company, 1990）。

20

30

【0164】

例えば意図する投与経路、送達形式、および所望の投薬量に応じて、当業者が最適な薬剤組成物を決定するであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、上記を参照されたい。こうした組成物は、特定の抗体の物理的状态、安定性、in vivo放出速度、およびin vivoクリアランス速度に影響を及ぼすことも可能である。

40

【0165】

薬剤組成物中の主なビヒクルまたはキャリアーは、性質が水性または非水性のどちらであることも可能である。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアーは、注射用水、生理食塩水溶液または人工脳脊髄液であることも可能であり、非経口投与用の組成物で一般的な他の物質を補充することも可能である。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合

50

された生理食塩水が、さらなる典型的なビヒクルである。他の典型的な薬剤組成物は、約 pH 7.0 ~ 8.5 の Tris 緩衝液または約 pH 4.0 ~ 5.5 の酢酸緩衝液を含み、これらはさらに、ソルビトールまたはその適切な代用物を含むことも可能である。本発明の1つの態様において、望ましい度合いの純度を有する、選択した組成物を、場合による配合剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences、上記) と、凍結乾燥ケーキまたは水性溶液の形で、混合することによって、結合剤組成物を調製することも可能である。さらに、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて、凍結乾燥物として、結合剤産物を配合することも可能である。

【0166】

非経口送達のため、薬剤組成物を選択することも可能である。あるいは、吸入、または 10 経口、耳、眼、直腸もしくは膣などの腸送達のため、組成物を選択することも可能である。こうした薬学的に許容しうる組成物の調製が、当該技術分野の技術範囲内である。

【0167】

配合物構成要素は、投与部位に許容されうる濃度で存在する。例えば、緩衝剤を用いて、組成物を、生理学的 pH またはわずかに低い pH に、典型的には約 5 ~ 約 8 の pH 範囲内に維持する。

【0168】

本発明の化合物を、薬剤として、ヒトおよび動物に投与する場合、これらを単独で、または薬学的に許容しうるキャリアーと組み合わせ、例えば 0.01 ~ 99.5% (より好ましくは 0.1 ~ 90%) の活性成分を含有する薬剤組成物として、投与することも可能 20 である。例えば、本発明の薬剤組成物は、約 1 mg/ml ~ 約 30 mg/ml、あるいは約 5 mg/ml ~ 約 30 mg/ml の濃度で、抗 CD148 抗体またはその抗原結合性領域を含有することも可能である。

【0169】

特定の態様において、in vivo での適切な分布を確実にするように、本発明のヒト・モノクローナル抗体を配合することも可能である。例えば、血液脳関門 (BBB) は、非常に親水性である化合物の多くを排除する。本発明の療法化合物が BBB を横断するのを確実にするため (所望の場合)、これらを例えばリポソーム中に配合することも可能である。リポソームを製造する方法に関しては、例えば米国特許第 4,522,811 号 ; 第 5,374,548 号 ; および第 5,399,331 号を参照されたい。特定の細胞 30 または臓器に選択的に輸送され、こうしてターゲティング薬剤送達を増進する 1 以上の部分を、リポソームが含むことも可能である (例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 を参照されたい)。典型的なターゲティング部分には、葉酸またはビオチン (例えば、Lowらに対する米国特許第 5,416,016 号) ; マンノシド (Umezawaら, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038) ; 抗体 (P.G. Bloemanら (1995) FEBS Lett. 357:140 ; M. Owaisら (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180) ; サーフアクトタンパク質 A 受容体 (Briscoeら (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)、この異なる種は、本発明の分子の 40 構成要素だけでなく本発明の配合物を含むことも可能である ; p120 (Schreierら (1994) J. Biol. Chem. 269:9090) が含まれ ; K. Keinänen ; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123 ; J.J. Killion ; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 もまた、参照されたい。本発明の1つの態様において、本発明の療法化合物をリポソーム中に配合し ; より好ましい態様において、リポソームには、ターゲティング部分が含まれる。最も好ましい態様において、リポソーム中の療法化合物は、腫瘍または感染の近位の部位へのボーラス注射によって送達される。組成物は、容易にシリンジ投与される度合いに流動的でなければならない。製造および貯蔵条件下で安定でなければならないし、そして細菌および真菌などの微生物の混入作用に対して 50



保護されなければならない。

#### 療法的有効投薬量

選択した投与経路にかかわらず、適切な水和型で使用可能な本発明の化合物、および/または本発明の薬剤組成物を、当業者に知られる慣用法によって、薬学的に許容しうる投薬型に配合する。「療法的有効投薬量」は、未治療被験者に比較して、腫瘍増殖を、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約80%阻害する。ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において、化合物が癌を阻害する能力を評価することも可能である。あるいは、当業者に知られるアッセイにより、こうした化合物が *in vitro* で阻害する能力を調べることによって、組成物のこの特性を評価することも可能である。療法化合物の療法的有効量は、腫瘍サイズを減少させることが可能であるか、または別の方式で被験者の症状を改善することも可能である。一般の当業者は、被験者のサイズ、被験者の症状の重症度、および選択する特定の組成物または投与経路などの要因に基づいて、こうした量を決定することが可能であろう。

10

20

30

40

50

#### 【0170】

療法的に使用しようとする薬剤組成物の有効量は、例えば、療法的状況および目的に応じるであろう。当業者は、治療に適した投薬レベルが、部分的に、送達する分子、抗体または抗原結合性領域が用いられる徴候、投与経路、並びに患者のサイズ（体重、体表面積または臓器サイズ）および状態（年齢および全身健康状態）に応じて多様であろうことを認識するであろう。したがって、臨床医は、投薬量を滴定し、そして最適療法効果を得るために、投与経路を修飾することも可能である。

#### 【0171】

好ましい抗CD148抗体またはその抗原結合性領域は、溶液中で、1  $\mu$ M未満、好ましくは0.1  $\mu$ M未満、そしてより好ましくは0.01  $\mu$ M未満の濃度のCD148に実質的に結合する能力を有する。「実質的に」によって、抗CD148抗体またはその抗原結合性領域の存在下での調節によって、内皮細胞増殖および遊走の少なくとも50%の減少が観察されることを意味し、そして50%の減少は、本明細書において、IC50値を指す。

#### 【0172】

本発明の抗CD148抗体またはその抗原結合性領域の療法的有効量は、典型的には、生理学的に許容しうる組成物中で投与した際、例えば約0.01  $\mu$ g/ml ~ 約300  $\mu$ g/mlの血漿濃度（抗体の単回用量後のcmaxデータに基づく）を達成するのに十分である量である。別の態様において、濃度は、約1  $\mu$ g/ml ~ 約300  $\mu$ g/mlであることも可能である。さらに別の態様において、濃度は、約1  $\mu$ g/ml ~ 約75  $\mu$ g/mlであることも可能である。さらに別の態様において、濃度は、約15  $\mu$ g/ml ~ 約50  $\mu$ g/mlであることも可能である。投薬量は、もちろん、投与頻度および期間に応じて多様であることも可能である。

#### 【0173】

ポリペプチドの形の本発明の抗CD148抗体またはその抗原結合性領域の療法的有効量は、典型的には、生理学的に許容しうる組成物中で投与した際、約0.001  $\mu$ g/ml ~ 約10  $\mu$ g/ml、または約0.05  $\mu$ g/ml ~ 約1.0  $\mu$ g/mlの血漿濃度を達成するのに十分であるようなポリペプチドの量である。モルあたり約15,000グラムの質量（すなわち15,000 Da）を有するポリペプチドに基づく、モル血漿濃度は、例えば、約0.0001  $\mu$ M ~ 約1 mMであることも可能である。別の言い方をすると、体重あたりの投薬量は、毎日1以上の用量を1日または数日間投薬して、約0.01 mg/kg ~ 約30 mg/kg、または約0.05 mg/kg ~ 約20 mg/kgで多様であることも可能である。典型的な投薬量は、上述の要因に応じて、約0.1 mg/kg ~ 約100 mg/kg以上までの範囲であることも可能である。他の態様において、投薬量は、1 mg/kg ~ 約100 mg/kgまで；または5 mg/kg ~ 約100 mg/kgまでの範囲であることも可能である。

## 【0174】

いかなる化合物に関しても、まず、細胞培養アッセイ、あるいはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、またはサルなどの動物モデルのいずれかにおいて、療法的有効用量を概算することも可能である。動物モデルを用いて、適切な濃度範囲および投与経路を決定することもまた、可能である。次いで、こうした情報を用いて、ヒトにおける投与に有用な用量および経路を決定することも可能である。

## 【0175】

治療が必要な被験者に関する要因を考慮して、正確な投薬量を決定する。投薬量および投与を調節して、十分なレベルの活性化化合物を提供するか、または所望の効果を維持することも可能である。考慮に入れることが可能な要因には、疾患状態の重症度、被験者の全身健康状態、被験者の年齢、体重、および性別、投与の時間および頻度、薬剤の併用（単数または複数）、反応感度、並びに療法に対する反応が含まれる。特定の配合物の半減期およびクリアランス速度に応じて、長期作用薬剤組成物を、3～4日ごと、毎週、または1週おきに投与することも可能である。

10

## 【0176】

投薬頻度は、用いる配合物中の結合剤分子の薬学的パラメータに応じるであろう。典型的には、投薬型が所望の効果を達成するにいたるまで、組成物を投与する。したがって、組成物を単一用量として、またはある期間に渡る多数の用量として（同じまたは異なる濃度/投薬量で）、あるいは連続注入として、投与することも可能である。適切な投薬型のさらなる改良が日常的に行われる。適切な用量-反応データを用いることによって、適切な投薬型を確かめることも可能である。

20

## 【0177】

本発明の薬剤組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対して毒性になることなく、特定の患者、組成物、および投与様式に関して、所望の療法反応を達成するのに有効な活性成分の量を達成するため、多様でありうる。選択する投薬量レベルは、使用する本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用する特定の化合物の排出速度、治療期間、使用する特定の組成物と併用する他の薬剤、化合物および/または物質、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康状態および以前の病歴、並びに医学業に周知の同様の要因を含む、多様な薬物動態学的要因に応じるであろう。

30

## 【0178】

当該技術分野の通常の技術を有する医師または獣医師は、必要な薬剤組成物の有効量を容易に決定し、そして処方することも可能である。例えば、医師または獣医師は、薬剤組成物中で使用する本発明の化合物の出発用量を、所望の療法効果を達成するために必要なレベルより低いレベルで開始して、そして所望の効果が達成されるまで、投薬量を次第に増加させることも可能である。一般的に、本発明の組成物の適切な1日用量は、療法効果を生じるのに有効な最低の用量である、化合物の量であろう。こうした有効用量は、一般的に、上述の要因に応じるであろう。好ましくはターゲット部位近位に、静脈内、筋内、腹腔内、または皮下投与することが好ましい。所望の場合、療法組成物の有効1日用量を、1日全体に適切な間隔で分けて、2回、3回、4回、5回、6回またはそれより多い下位用量として、場合によって単位投薬型で投与することも可能である。本発明の化合物を単独で投与することも可能であるが、該化合物を薬剤配合物（組成物）として投与することが好ましい。

40

## 【0179】

組成物は無菌でなければならないし、そしてシリンジによって組成物を送達可能である程度合いに流動的でなければならない。水に加えて、キャリアーは、等張性緩衝生理食塩水溶液、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびその適切な混合物であることも可能である。例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散の場合は、必要な粒子サイズを維持することによって、そして界面活性剤を使用することによって、適切な流動性

50

を維持することも可能である。多くの場合、等張性剤、例えば糖、マンニトールまたはソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムを、組成物中に含むことが好ましい。組成物中に、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを含むことによって、注射用組成物の長期吸収を行うことも可能である。

#### 【0180】

上述のように、活性化化合物を適切に保護した場合、化合物を、例えば不活性希釈剤または同化可能食用キャリアーとともに、経口投与することも可能である。

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）を投与する方法が、当該技術分野に知られる。用いる分子の適切な投薬量は、被験者の年齢および体重、並びに用いる特定の薬剤に応じるであろう。Goldenberg, D. M.ら（1981）Cancer Res. 41: 4354-4360、およびEP 0365997に記載されるように、<sup>131</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>105</sup>Rh、インジウム-111などの放射性核種に分子をカップリングすることも可能である。別の側面において、本発明は、放射性同位体、細胞傷害性剤（例えばカリケアマイシンおよびデュオカルマイシン）、細胞増殖抑制剤、または化学療法薬剤に連結された、本発明記載の抗体を含む、免疫コンジュゲートに関する。本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）をまた、抗感染性剤にカップリングすることも可能である。

#### 投与経路

薬剤組成物の投与経路は、既知の方法にしたがい、例えば経口、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内経路、髄内、鞘内、心室内、経皮、皮下、腹腔内による注射を通じるか、鼻内、腸内、局所、舌下、尿道、膣、または直腸手段、徐放系によるか、あるいは移植装置による。所望の場合、ポータル注射によって、または注入によって連続して、または移植装置によって、組成物を投与することも可能である。

#### 【0181】

あるいはまたはさらに、所望の分子が吸収されているかまたは被包されている、膜、スポンジ、または別の適切な物質の移植を介して、組成物を局所投与することも可能である。移植装置を用いる場合、装置を適切な組織または臓器いずれかに移植することも可能であり、そして所望の分子の送達は、分散、時限放出ポータル、または連続投与を介することも可能である。

#### 【0182】

いくつかの場合、*ex vivo*方式で、薬剤組成物を用いることが望ましい可能性もある。こうした場合、患者から取り除いた細胞、組織または臓器を、薬剤組成物に曝露し、その後、続いて、細胞、組織および/または臓器を患者に移植して戻す。

#### 【0183】

他の場合、本明細書記載のものなどの、ポリペプチドを発現させ、そして分泌させる方法を用いて、遺伝子操作されている特定の細胞を移植することによって、本発明の結合剤、例えば抗体またはその抗原結合性領域を送達することも可能である。こうした細胞は、動物またはヒト細胞であることも可能であるし、そして自己、異種（heterologousまたはxenogeneic）であることも可能である。場合によって、細胞は不活化されていることも可能である。免疫学的応答の可能性を減少させるため、細胞を被包して、周囲組織への浸潤を回避することも可能である。被包材料は、典型的には、生体適合性の半浸透性ポリマー封入体（enclosures）または膜であって、タンパク質産物（単数または複数）の放出を可能にするが、患者免疫系による、または周囲組織由来の他の有害な因子による、細胞の破壊を防止するものである。

#### 【0184】

当該技術分野に知られる医学的装置を用いて、療法組成物を投与することも可能である。例えば、好ましい態様において、米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；または第4,596,556号に開示される装置などの、無針

10

20

30

40

50

皮下注射装置を用いて、本発明の療法組成物を投与することも可能である。本発明で有用な周知の移植体およびモジュールの例には：調節された速度で薬剤を分配するための移植可能微量注入ポンプを開示する、米国特許第4,487,603号；皮膚を通じて薬剤を投与するための療法装置を開示する、米国特許第4,486,194号；正確な注入速度で薬剤を送達する薬剤注入ポンプを開示する、米国特許第4,447,233号；連続薬剤送達用の、可変フロー移植可能注入装置を開示する、米国特許第4,447,224号；マルチチャンバー区画を有する浸透圧薬剤送達系を開示する、米国特許第4,439,196号；および浸透圧薬剤送達系を開示する、米国特許第4,475,196号が含まれる。これらの特許は、本明細書に援用される。多くの他のこうした移植体、送達系、およびモジュールが当業者に知られる。

10

**【0185】**

非経口投与が意図される場合、本発明で使用する療法組成物は、薬学的に許容しうるビヒクル中に、所望の特異的結合剤を含む、発熱物質不含の非経口的に許容しうる水性溶液の形であることも可能である。非経口注射に特に適切なビヒクルは、無菌蒸留水であり、この中に、適切に保護された無菌等張溶液として、結合剤を配合する。さらに別の調製物は、産物の調節放出または徐放を提供する、注射可能微小球体、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズ、またはリポソームなどの剤とともに、所望の分子の配合物を含むことも可能であり、次いでこれを、デポ注射を介して送達することも可能である。ヒアルロン酸もまた使用可能であり、そしてヒアルロン酸は、循環中にある期間の持続を促進する効果を有しうる。所望の分子の導入のための他の適切な手段には、移植可能薬剤送達装置が含まれる。

20

**【0186】**

別の側面において、非経口投与に適した薬剤組成物を、水性溶液中、好ましくはハंक ス溶液、リンゲル溶液、または生理学的緩衝生理食塩水などの生理学的に適合する緩衝液中に配合することも可能である。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘性を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有することも可能である。さらに、適切な油性注射懸濁物として、活性化合物の懸濁物を調製することも可能である。適切な親油性溶媒またはビヒクルには、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル、トリグリセリド、またはリポソームが含まれる。非脂質ポリカチオン性アミノポリマーもまた、送達に使用可能である。場合によって、懸濁物はまた、適切な安定化剤、または化合物の可溶性を増加させ、そして非常に濃縮された溶液の調製を可能にする剤も含有することも可能である。

30

**【0187】**

別の態様において、薬剤組成物を吸入用に配合することも可能である。例えば、吸入用の乾燥粉末として、結合剤を配合することも可能である。エアロゾル送達用の噴霧剤を用いて、ポリペプチドまたは核酸分子吸入溶液を配合することもまた可能である。さらに別の態様において、溶液を噴霧することも可能である。肺投与は、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達を記載する、PCT出願第PCT/US94/001875にさらに記載される。

**【0188】**

経口投与に適した投薬型で、当該技術分野に周知の薬学的に許容しうるキャリアーを用いて、経口投与用の薬剤組成物を配合することもまた可能である。こうしたキャリアーは、薬剤組成物を、患者が摂取するための、錠剤、ピル、ドラジェー、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物等として配合するのを可能にする。本発明の1つの態様において、この様式で投与される結合剤分子を、錠剤およびカプセルなどの固形投薬型で配合するのに通例用いられるキャリアーを伴い、または伴わず、配合することも可能である。例えば、生物学的利用能が最大となりそして前全身分解が最小となる胃腸管で、配合物の活性部分が放出されるように、カプセルを設計することも可能である。結合剤分子の吸収を促進する、さらなる剤を含むことも可能である。希釈剤、フレーバー剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた、使用可能である。

40

50

## 【0189】

活性化化合物と固体賦形剤を合わせ、そして生じた顆粒混合物を（場合によって粉碎した後）プロセッシングして、錠剤またはドラジェー・コアを得ることを通じて、経口使用のための薬剤調製物を得ることも可能である。所望の場合、適切な補助剤を添加することも可能である。適切な賦形剤には、炭水化物またはタンパク質増量剤、例えばラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトールを含む糖；コーン、コムギ、イネ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントを含むゴム；並びにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質が含まれる。所望の場合、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、およびアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤または可溶化剤を添加することも可能である。

10

## 【0190】

アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、並びに適切な有機溶媒または溶媒混合物もまた含有可能な濃縮等溶液などの、適切なコーティングと組み合わせて、ドラジェー・コアを用いることも可能である。製品を同定するため、または活性化化合物の量、すなわち投薬量を特徴付けるため、染料または色素を錠剤またはドラジェー・コーティングに添加することも可能である。

## 【0191】

経口で使用可能な薬剤調製物にはまた、ゼラチン製の押し込み型カプセル、並びにゼラチン製の軟封入カプセルおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングが含まれる。押し込み型カプセルは、増量剤または結合剤、例えばラクトースまたはデンプン、潤滑剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および場合によって安定化剤と混合された活性成分を含有することも可能である。軟カプセルにおいて、安定化剤を伴い、または伴わず、活性化化合物を適切な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコール中に、溶解するかまたは懸濁することも可能である。

20

## 【0192】

別の薬剤組成物は、錠剤の製造に適した非毒性賦形剤との混合物中に、有効量の結合剤を含むことも可能である。錠剤を無菌水または他の適切なビヒクルに溶解することによって、単位投薬型の溶液を調製することも可能である。適切な賦形剤には、限定されるわけではないが、不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム；あるいは結合剤、例えばデンプン、ゼラチン、またはアラビアゴム；あるいは潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクが含まれる。

30

## 【0193】

さらなる薬剤組成物が当業者には明らかであり、こうした組成物には、徐放または調節送達配合物中に結合剤分子を含む配合物が含まれる。多様な他の徐放または調節送達手段、例えばリボソーム・キャリアー、生体内分解性微小粒子または多孔ビーズおよびデポー注射を配合するための技術もまた、当業者に知られる。例えば、薬剤組成物の送達用の多孔ポリマー性微小粒子の調節された放出を記載する、PCT/US93/00829を参照されたい。徐放調製物のさらなる例には、成形物品の形の半透性ポリマーマトリックス、例えばフィルム、または微小カプセルが含まれる。徐放マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸およびガンマ・エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら, Biopolymers, 22:547-556(1983)）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981)およびLangerら, Chem. Tech., 12:98-105(1982)）、エチレン酢酸ビニル（Langerら、上記）、またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,98

40

50

8) が含まれることも可能である。徐放組成物にはまた、当該技術分野に知られるいくつかの方法のいずれかによって調製可能なリポソームが含まれる。例えば E p p s t e i n r a , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . ( U S A ) , 8 2 : 3 6 8 8 - 3 6 9 2 ( 1 9 8 5 ) ; E P 3 6 , 6 7 6 ; E P 8 8 , 0 4 6 ; E P 1 4 3 , 9 4 9 を参照されたい。

#### 【0194】

i n v i v o 投与に用いようとする薬剤組成物は、典型的には無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜を通じたる過によって達成可能である。組成物を凍結乾燥する場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成前にまたはその後のいずれかに行うことも可能である。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥型で、または溶液中で保存することも可能である。さらに、非経口組成物は、一般的に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアル中に入れられる。

10

#### 【0195】

薬剤組成物を配合したら、溶液、懸濁物、ゲル、エマルジョン、固体、あるいは脱水または凍結乾燥粉末として、無菌バイアル中で保存することも可能である。こうした配合物は、すぐに使える型で、または投与前に再構成を要する型（例えば凍結乾燥型）のいずれかで保存することも可能である。

#### 【0196】

特定の態様において、本発明は、単回用量投与単位を生じるキットに関する。該キットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性配合物を有する第二の容器の両方を含有することも可能である。本発明の範囲内にやはり含まれるのは、単一チャンバーおよび多チャンバーのあらかじめ充填されたシリンジ（例えば液体シリンジおよびリオシリンジ ( l y o s y r i n g e s ) ）を含有するキットである。

20

#### 併用療法

別の側面において、本発明は、薬学的に許容しうるキャリアーと一緒に配合された、本発明のヒト抗体またはその抗原結合性領域（単数または複数）の1つまたは組み合わせを含有する、組成物、例えば薬剤組成物を提供する。別の態様において、組成物には、本発明の多数の（例えば2以上の）単離ヒト抗体またはその抗原結合性領域の組み合わせが含まれる。より具体的な態様において、組成物の抗体またはその抗原結合性領域は各々、別個の、あらかじめ選択されたCD148エピトープに結合する。

30

#### 【0197】

1つの態様において、相補的活性を有するヒト抗CD148モノクローナル抗体を、例えば2以上のヒト抗CD148モノクローナル抗体を含む薬剤組成物として、併用する。例えば、血管形成またはCD148を発現する細胞の増殖を阻害するヒト・モノクローナル抗体を、エフェクター細胞の存在下で、ターゲット細胞の非常に有効な死滅を仲介する、別のヒト抗体と併用することも可能である。

#### 【0198】

別の態様において、組成物は、本発明の二重特異性分子または多重特異性分子の1つまたは組み合わせ（例えばFc受容体に対する少なくとも1つの結合特異性およびCD148に対する少なくとも1つの結合特異性を含有するもの）を含む。

40

#### 【0199】

したがって、本発明は、1以上のさらなる適切な剤（単数または複数）と併用して、同じ患者に投与する、本発明の抗体またはその抗原結合性領域の投与を含み、これらは各々、その薬剤に適した措置にしたがって投与される。これは、本発明の特異的結合剤および1以上の適切な剤の同時投与を含む。本明細書において、用語「同時に投与される」および「同時投与」は、本発明記載の1以上の抗体、および1以上のさらなる適切な剤（単数または複数）の実質的に同時の投与を含む。

#### 【0200】

本明細書において、用語「非同時」投与は、本発明記載の1以上の抗体またはその抗原

50

結合性領域、および1以上のさらなる適切な剤(単数または複数)を、重なってもまた重ならなくても、いずれかの順で、異なる時点で投与することを含む。これは、限定されるわけではないが、併用構成要素での連続治療(前治療、後治療または重複治療など)、並びに薬剤を交互に投与する措置、または1つの構成要素を長期に投与し、そして他のもの(単数または複数)を断続的に投与する措置を含む。構成要素は、同一または別個の組成物中で、そして同一または異なる投与経路によって投与可能である。

【0201】

増殖因子を伴う併用療法は、M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンなどの、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子、または他の造血因子を含むことも可能である。他の組成物は、既知のアンジオポイエチン、例えばAng-1、-2、-4、-Yおよび/またはヒトAng様ポリペプチド、および/または血管内皮増殖因子(VEGF)を含むことも可能である。増殖因子には、アンジオゲニン、骨形態形成タンパク質-1、骨形態形成タンパク質-2、骨形態形成タンパク質-3、骨形態形成タンパク質-4、骨形態形成タンパク質-5、骨形態形成タンパク質-6、骨形態形成タンパク質-7、骨形態形成タンパク質-8、骨形態形成タンパク質-9、骨形態形成タンパク質-10、骨形態形成タンパク質-11、骨形態形成タンパク質-12、骨形態形成タンパク質-13、骨形態形成タンパク質-14、骨形態形成タンパク質-15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、脳由来神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor)、繊毛様神経栄養因子受容体、サイトカイン誘導性好中球走化性因子1、サイトカイン誘導性好中球、走化性因子2、サイトカイン誘導性好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、上皮由来好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体-1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体-2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質-1、増殖関連タンパク質-2、増殖関連タンパク質-3、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合性タンパク質、角化細胞増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体-1、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子BB、血小板由来増殖因子受容体-1、血小板由来増殖因子受容体-2、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-2、トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-1.2、トランスフォーミング増殖因子-2、トランスフォーミング増殖因子-3、トランスフォーミング増殖因子-5、潜在性トランスフォーミング増殖因子-1、トランスフォーミング増殖因子-1結合性タンパク質I、トランスフォーミング増殖因子-I結合性タンパク質II、トランスフォーミング増殖因子-I結合性タンパク質III、腫瘍壊死因子受容体I型(TNF-R1)、腫瘍壊死因子受容体II型(TNF-R2)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体、血管内皮増殖因子、ならびにそのキメラタンパク質、および生物学的または免疫学的に活性であるその断片が含まれる。

【0202】

本発明の抗体またはその抗原結合性領域を、1以上の抗炎症剤とともに投与可能である

ことが認識されるであろう。本明細書において、用語「抗炎症剤」は、一般的に、患者において炎症または腫脹を減少させる剤いずれかを指す。いくつかの典型的な抗炎症剤を本明細書に列挙するが、本明細書に特に列挙されていなくても本発明に含まれる、さらなる適切な抗炎症剤がありうるということが認識されるであろう。

#### 【0203】

抗炎症剤は、例えば、炎症性サイトカインとその受容体の相互作用を阻害する化合物であることも可能である。本発明の特異的結合剤と併用して有用なサイトカイン阻害剤の例には、例えばTGF-ベータのアンタゴニスト（抗体など）、並びに炎症に關与するインターロイキンに対して向けられるアンタゴニスト（抗体など）が含まれる。こうしたインターロイキンは、本明細書に記載され、そして好ましくは、限定されるわけではないが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、およびIL-18を含む。Feghaliら、Frontiers in Biosci., 2:12-26(1997)を参照されたい。典型的な抗体アンタゴニストにはまた、21~28kD細胞表面糖タンパク質CD52に対して向けられる抗体(Campath(登録商標)、Berlex Laboratories)、IL-8に対して向けられる抗体(および抗IL8-RB抗体)、B-FGFに対して向けられる抗体(および抗B-FGF受容体抗体)、抗TWEAK抗体(および抗TWEAK受容体(すなわちTWEAKR)抗体)、抗Adam/ディスインテグリン抗体、抗eph受容体、抗エフリン抗体、および抗PDGF-BB抗体が含まれる。

10

20

#### 【0204】

抗レトロウイルス療法を受けているHIV感染患者において、本発明の特異的抗体またはその抗原結合性領域を、1型プロテインキナーゼAの阻害剤と併用投与して、T細胞増殖を増進することも可能である。

#### 【0205】

神経増殖因子(NGF)もまた、本発明の抗体または抗原結合性領域と併用して、特定の状態を治療することも可能である。こうした状態には、神経変性疾患、脊髄傷害および多発性硬化症が含まれる。この併用で治療可能な他の状態は、緑内障および糖尿病である。

#### 【0206】

好ましい併用療法は、1以上の適切なIL-1阻害剤と併用して患者に投与される、本発明の抗体またはその抗原結合性領域に関する。IL-1の阻害剤には、限定されるわけではないが、IL-1の受容体結合性ペプチド断片、IL-1またはIL-1ベータまたはIL-1受容体I型に対して向けられる抗体、並びにIL-1受容体のすべてまたは一部を含む組換えタンパク質、あるいは遺伝的に修飾された突然変異タンパク質、多量体型および徐放配合物を含む修飾変異体が含まれる。特異的アンタゴニストには、IL-Iraポリペプチド、IL-1ベータ変換酵素(ICE)阻害剤、アンタゴニスト性I型IL-1受容体抗体、I型IL-1受容体およびII型IL-1受容体のIL-1結合型、IL-1アルファおよびIL-1ベータおよび他のIL-1ファミリーメンバーを含むIL-1に対する抗体、並びにIL-1 Trap(Regeneron)として知られる療法剤が含まれる。IL-Iraポリペプチドには、米国特許第5,075,222号に記載される型のIL-Ira、並びに米国特許第5,922,573号、WO 91/17184、WO 92 16221、およびWO 96 09323に記載されるものを含む、修飾型および変異体が含まれる。IL-1ベータ変換酵素(ICE)阻害剤には、PCT特許出願WO 91/15577; WO 93/05071; WO 93/09135; WO 93/14777およびWO 93/16710;並びに欧州特許出願0 547 699に記載されるものを含む、ペプチジルおよび小分子ICE阻害剤が含まれる。非ペプチジル化合物には、PCT特許出願WO 95/26958、米国特許第5,552,400号、米国特許第6,121,266号、およびDolleら、J. Med. Chem., 39, pp. 2438-2440(1996)に記載されるもの

30

40

50



が含まれる。さらなるICE阻害剤が、米国特許第6,162,790号、第6,204,261号、第6,136,787号、第6,103,711号、第6,025,147号、第6,008,217号、第5,973,111号、第5,874,424号、第5,847,135号、第5,843,904号、第5,756,466号、第5,656,627号、第5,716,929号に記載される。I型IL-1受容体およびII型IL-1受容体のIL-1結合型が、米国特許第4,968,607号、第4,968,607号、第5,081,228、Re 35,450号、第5,319,071号、および第5,350,683号に記載される。他の適切なIL-1アンタゴニストには、限定されるわけではないが、IL-1シグナル伝達受容体、I型IL-1Rに競合的に結合可能な、IL-1由来のペプチドが含まれる。特定のIL-1(および他のサイトカイン)アンタゴニストに関するさらなる指針は、米国特許第6,472,179号に見出すことも可能である。

10

#### 【0207】

さらに、TNF阻害剤が適切であり、そしてこうした阻害剤には、限定されるわけではないが、TNF-アルファの受容体結合性ペプチド断片、TNFアルファ産生を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイム、TNF-アルファに対して向けられる抗体、並びにTNF-アルファ受容体のすべてまたは一部を含む組換えタンパク質、あるいは遺伝的に修飾された突然変異タンパク質、多量体型および徐放配合物を含む修飾変異体が含まれる。やはり適切なものは、TACE(腫瘍壊死因子-アルファ変換酵素)阻害剤、例えばTAPI(Immunex Corp.)およびGW-3333X(Glaxo Wellcome Inc.)である。やはり適切なものは、EP 0 614 464 Bに開示されるペプチドなどの、IgA-アルファ-1AT複合体の形成を阻害する分子、またはこの複合体に対する抗体である。さらなる適切な分子には、限定されるわけではないが、TNF-アルファ阻害性二糖、グルコサミンの硫酸化誘導体、または米国特許第6,020,323号に記載される、他の類似の炭水化物が含まれる。さらなる適切な分子には、米国特許第5,641,751号および第5,519,000号に開示されるペプチドTNF-アルファ阻害剤、並びに米国特許第5,753,628号に記載されるD-アミノ酸含有ペプチドが含まれる。さらに、TNF-アルファ変換酵素の阻害剤もまた適切である。WO 01/03719は、本発明記載の併用で使用可能なさらなる剤を記載する。

20

30

#### 【0208】

さらに適切な化合物には、限定されるわけではないが、サリドマイドまたはサリドマイド類似体、ペントキシフィリン、またはマトリックス・メタロプロテイナーゼ(MMP)阻害剤あるいは他の小分子が含まれる。この目的に適したMMP阻害剤には、例えば米国特許第5,883,131号、第5,863,949号および第5,861,510号に記載されるもの、並びに米国特許第5,872,146号に記載されるようなメルカプトアルキルペプチジル化合物が含まれる。TNF-アルファ産生を減少させることが可能な他の小分子には、例えば、米国特許第5,508,300号、第5,596,013号および第5,563,143号に記載される分子が含まれる。さらなる適切な小分子には、限定されるわけではないが、米国特許第5,747,514号、および第5,691,382号に記載されるようなMMP阻害剤、並びに米国特許第5,821,262号に記載されるものなどのヒドロキサム酸誘導体が含まれる。さらなる適切な分子には、例えば、ホスホジエステラーゼIVおよびTNF-アルファ産生を阻害する小分子、例えば置換オキシム誘導体(WO 96/00215)、キノリン・スルホンアミド(米国特許第5,834,485号)、アリアル・フラン誘導体(WO 99/18095)、およびヘテロ二環誘導体(WO 96/01825; GB 2 291 422 A)が含まれる。やはり有用なのは、TNF-アルファおよびIFN-ガンマを抑制するチアゾール誘導体(WO 99/15524)、並びにTNF-アルファおよび他の炎症誘発性サイトカインを抑制するキサンチン誘導体(例えば米国特許第5,118,500号、第5,096,906号および第5,196,430号を参照されたい)である。本明細書に記載する

40

50

状態を治療するのに有用なさらなる小分子には、米国特許第 5,547,979 号に開示されるものが含まれる。

【0209】

併用療法によって投与可能な薬剤および薬剤種のさらなる例には、限定されるわけではないが、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤（例えばアセトアミノフェン、コデイン、ナブシル酸プロポキシフェン、オキシコドン塩酸、二酒石酸ヒドロコドン、トラマドール）、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、疾患修飾抗リウマチ剤（DMARD）、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）、および緩慢作用抗リウマチ剤（SARD）が含まれる。

【0210】

典型的な疾患修飾抗リウマチ剤（DMARD）には、限定されるわけではないが：リウマトレックス<sup>TM</sup>（メトトレキサート）；エンブレル（登録商標）（エタネルセプト）；レミケード（登録商標）（インフリキシマブ）；フミラ<sup>TM</sup>（アダリムマブ）；セガード（登録商標）（アフェリモマブ）；アラバ<sup>TM</sup>（レフルノミド）；キネレット<sup>TM</sup>（アナキンラ）；アラバ<sup>TM</sup>（レフルノミド）；D-ペニシラミン；ミオクリシン；プラクエニル；リダウラ<sup>TM</sup>（オーラノフィン）；ソルガナル；レネルセプト（Hoffman-Laroche）；CDP870（Celltech）；CDP571（Celltech）、並びにEP0516785B1、米国特許第5,656,272号、EP0492448A1に記載される抗体；オネルセプト（Serono；CAS登録番号199685-57-9）；MRA（中外）；Imuran<sup>TM</sup>（アザチオプリン）；NFκB阻害剤；サイトキサン<sup>TM</sup>（シクロホスファミド）；シクロスポリン；硫酸ヒドロキシクロロキン；ミノサイクリン；スルファサラジン；並びに経口金、金チオリンゴ酸ナトリウム、および金チオグルコースなどの金化合物が含まれる。

【0211】

さらなる適切な分子には、例えば、p55およびp75 TNFR以外のTNF-アルファ受容体分子の細胞外領域由来の可溶性TNFR、例えばWO99/04001に記載されるようなTNFRが含まれ、このTNFRに由来するTNFR-Igが含まれる。さらなる適切なTNF-アルファ阻害剤が、本明細書に記載するような使用に適している。これらには、本明細書に記載するようなTNF-アルファまたはTNFRに対する抗体の使用だけでなく、TNF-アルファの競合的阻害剤として作用可能なTNF-アルファ由来ペプチド（米国特許第5,795,859号または米国特許第6,107,273号に記載されるものなど）、p55 TNF-アルファ受容体の細胞外部分を含むものなどのTNFR-IgG融合タンパク質、IgG融合タンパク質以外の可溶性TNFR、または内因性TNF-アルファ・レベルを減少させる他の分子、例えばTNF-アルファ変換酵素の阻害剤（例えば米国特許第5,594,106号を参照されたい）、またはTNF-アルファ阻害剤の小分子が含まれ、このうちいくつかを本明細書に記載する。

【0212】

TNFに対する抗体に関して、用量は、最適には、念頭にある患者の特定の必要性に応じて、経験豊かな医療従事者によって決定されるが、TNF-アルファに対する抗体の1つの典型的な好ましい用量範囲は、0.1~20mg/kg、そしてより好ましくは1~10mg/kgである。抗TNF-アルファ抗体の別の好ましい用量範囲は、0.75~7.5mg/体重kgである。

【0213】

本発明はまた、特定の結合剤および1以上の非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）のいずれかを利用することも可能である。NSAIDは、その抗炎症作用を、少なくとも部分的に、プロスタグランジン合成の阻害に負う。GoodmanおよびGilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan 第7版（1985）。NSAIDは9つの群に特徴付け可能である：（1）サリチル酸誘導体；（2）プロピオン酸誘導体；（3）酢酸誘導体；（4）フェナム酸誘導体；（5）カルボン酸誘導体；（6）酪酸誘導体；（7）オキシカム；

10

20

30

40

50

(8) ピラゾールおよび(9) ピラズロン。NSAIDの例には、限定されるわけではないが、アナブロクス<sup>T M</sup>、アナブロクスDS<sup>T M</sup>(ナブロキセンナトリウム)；アンセイド<sup>T M</sup>(フルルピプロフェン)；アースロテック<sup>T M</sup>(ジクロフェナクナトリウム+ミソプロステイル)；カタフランT.M./ボルタレン<sup>T M</sup>(ジクロフェナクカリウム)；クリノリル<sup>T M</sup>(スリンダク)；ディプロ<sup>T M</sup>(オキサプロジン)；ジサルシド<sup>T M</sup>(サルサレート)；ドロピッド<sup>T M</sup>(ジフルニサル)；ECナプロシン<sup>T M</sup>(ナブロキセンナトリウム)；フェルデン<sup>T M</sup>(ピロキシカム)；インドシン<sup>T M</sup>、インドシンSR<sup>T M</sup>(インドメタシン)；ロディン<sup>T M</sup>、ロディンXL<sup>T M</sup>(エトドラク)；モトリン<sup>T M</sup>(イブプロフェン)；ナブレラン<sup>T M</sup>(ナブロキセン)；ナプロシン<sup>T M</sup>(ナブロキセン)；オルディス<sup>T M</sup>(ケトプロフェン)；オルベール<sup>T M</sup>(ケトプロフェン)；レラフェン<sup>T M</sup>(ナブメトン)；トレクチン<sup>T M</sup>(トルメチンナトリウム)；トリリセート<sup>T M</sup>(三サリチル酸コリンマグネシウム)；Cox-1阻害剤；Cox-2阻害剤、例えばピオックス<sup>T M</sup>(ロフェコキシブ)；アルコキシア<sup>T M</sup>(エトリコキシブ)、セレブレックス<sup>T M</sup>(セレコキシブ)；モビック<sup>T M</sup>(メロキシカム)；ベクストラ.TM.(バルデコキシブ)、ダイナスタット<sup>T M</sup>パラコキシブナトリウム；プレキサイジ<sup>T M</sup>(ルミラコキシブ)、およびナブメトンが含まれる。さらなる適切なNSAIDには、限定されるわけではないが、以下が含まれる：イブシロン-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリジネート、ベンジダミン、ベプロジン、プロペラモール、ブコローム、ブフェゾラック、シプロクアゾン、クロキシメート、ダジダミン、デボキサメット、デトミジン、ジフェンピラミド、ジフェンピラミド、ジフィサラミン、ジタゾール、エモルファゾン、メシル酸ファネチゾール、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロクアゾン、ホピルトリン、フォスフォサル、グアイメサル、グアイアゾレン、イソニキシリン、レフェタミンHC1、レフルノミド、ロフェミゾール、ロティファゾール、リジクロニキシネート、メセクラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロルム、オキサパドール、パラニリン、ペリソキサル、クエン酸ペリソキサル、ピフォキシム、ピプロキセン、ピラゾラック、ピルフェニドン、プロクアゾン、プロキサゾール、チエラビンB、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプタミド、並びに480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、A177B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN 127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNT EI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONO.sub.3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901(4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸)、TVX2706、U60257、UR2301およびWY41770などの企業コード番号によって命名されるもの。NSAIDと類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するNSAIDもまた、この群に含まれる。

10

20

30

40

【0214】

適切なSAARDまたはDMARDには、限定されるわけではないが：アロクブレイドナトリウム、オーラノフィン、金チオグルコース、金チオグリカミド、アザチオプリン、プレキナールナトリウム、ブシラミン、カルシウム3-オーロチオ-2-プロパノール-1-スルホネート、クロラムブシル、クロロキン、クロブザリット、クプロキソリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダブソン、15-デオキシスベルグアリン、ジアセレイン、グルコサミン、金塩(例えばシクロキン金塩、金チオリンゴ酸ナトリウム、金チオ硫酸ナトリウム)、ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシ尿素、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリット、メリチン、6-メルカプトプリン、メトトレキセート、ミゾリピン、ミコフェノール酸モフェチル、ミオラール、ナイトロジェンマスタード、D-ペニシラミン、ピリジノール、イミダゾール、例えばSKNF86002およびSB203580、

50

ラパマイシン、チオール、チモポイエチンおよびピンクリスチンが含まれる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するS A A R DまたはD M A R Dもまた、この群に含まれるよう意図される。

#### 【0215】

シグナル伝達カスケード中のキナーゼの阻害剤もまた、本発明の特異的結合剤と併用するのに適切な剤である。これらには、限定されるわけではないが、P - 38 (別名「R K」または「S A P K - 2」、Leeら, Nature, 372:739(1994))を阻害可能な剤が含まれる。P - 38は、セリン/スレオニンキナーゼと記載されている(Hanら, Biochimica Biophysica Acta, 1265:224-227(1995))を参照されたい)。P - 38の阻害剤は、細胞外刺激、並びに細胞からのIL - 1およびTNF - アルファ分泌の間に介入し、シグナル経路上にあるキナーゼの阻害を通じてシグナル伝達を遮断することを含む。

10

#### 【0216】

さらに適切なのは、MK2阻害剤およびtp1 - 2阻害剤である。さらに、T細胞阻害剤もまた適切であり、これには、例えばctl a - 4、CsA、Fk - 506、OX40、OX40R - Fc、OX40抗体、OX40リガンド、OX40リガンド抗体、Ick、およびZAP70が含まれる。やはり適切なのは、経口レチノイドを含むレチノイド、並びにTGF - ベータのアンタゴニストである。

#### 【0217】

本発明の特異的結合剤と併用するための、さらなる適切な剤には、例えば、1以上のサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩が含まれる。こうしたサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：アセトアミノサロール、アロキシプリン、アスピリン、ベノリレート、プロモサリゲニン、アセチルサリチル酸カルシウム、三サリチル酸コリンマグネシウム、ジフルシナル、エテルサレート、フェンドサール、ゲンチジン酸、サリチル酸グリコール、サリチル酸イミダゾール、アセチルサリチル酸リジン、メサラミン、サリチル酸モルホリン、サリチル酸1 - ナフチル、オルサラジン、パルサルミド、アセチルサリチル酸フェニル、サリチル酸フェニル、サラセタミド、サリチルアミドO - 酢酸、サルサレートおよびスルファサラジンを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するサリチル酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。さらなる適切な剤には、例えば、プロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩が含まれる。プロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に許容しうる塩は：アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキシンドプロフェン、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフェン、イソプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン、ミロプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェンを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するプロピオン酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。やはり使用に適しているのは、酢酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩である。酢酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：アセメタシン、アルクロフェナク、アムフェナク、ブフェキサマク、シンメタシン、クロピラク、デルメタシン、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェルピナク、フェンクロフェナク、フェンクロラク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フロフェナク、グルカメタシン、イブフェナク、インドメタシン、イソフェゾラク、イソキセパク、ロナゾラク、メチアジン酸、オキサメタシン、オキシピナク、ピメタシン、プログルメタシン、スリンダク、タルメタシン、チアラミド、チオピナク、トルメチン、ジドメタシンおよびゾメピラクを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連する酢酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。本明細書記載の使用にさらに適しているのは、フェナム酸

20

30

40

50

誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩である。フェナム酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：エンフェナム酸、エトフェナメート、フルフェナム酸、イソニキシン、メクロフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、メドフェナム酸、メファナム酸、ニフルム酸、タルニフルメート、テロフェナメート、トルフェナム酸およびウフェナメートを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するフェナム酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。

## 【0218】

やはり適しているのは、カルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩であり、使用可能なものは：クリダナク、ジフルニサル、フルフェニサル、イノリジン、ケトロラクおよびチノリジンを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するカルボン酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。さらに適しているのは、酪酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩である。酪酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：ブマジゾン、ブチブフェン、フェンブフェンおよびキセンブシンを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連する酪酸誘導体もまた、この群に含まれるよう意図される。オキシカム、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩もまた適切である。オキシカム、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび4-ヒドロキシル-1,2-ベンゾチアジン1,1-ジオキシド4-(N-フェニル)-カルボキサミドを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するオキシカムもまた、この群に含まれるよう意図される。ピラゾール、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩もまた適切である。使用可能なピラゾール、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：ジフェンアミゾールおよびエピリゾールを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するピラゾールもまた、この群に含まれるよう意図される。さらに、ピラゾロン、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩が適切である。使用可能なピラゾロン、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩は：アパゾン、アザプロパゾン、ベンジペリロン、フェプラゾン、モフェブタゾン、モラゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン、プロピルフェナゾン、ラミフェナゾン、スキシブゾンおよびチアゾリノブタゾンを含む。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するピラゾロンもまた、この群に含まれるよう意図される。

## 【0219】

やはり適しているのは、TNFが仲介する疾患の治療のためのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩である。コルチコステロイド、そのプロドラッグエステル、および薬学的に許容しうる塩には、ヒドロコルチゾンおよびヒドロコルチゾン由来の化合物、例えば21-アセトキシ-プレグネロン、アルクロメラゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベータ-メタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ブデソニド、クロロプレドニゾン、クロベタゾール、プロピオン酸クロベタゾール、クロベタゾン、酪酸クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコン、デソニド、デソキシメラゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドネート、エノキソロン、フルアザコルト、フルクロニド、フルメタゾン、ピバル酸フルメタゾン、フルニソリド、フルシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオロシノロンアセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、ヘキサ酸フルオロコルトロン、吉草酸ジフルコルトロン、フルオロメトロン、酢酸フルペロロン、酢酸フルプレドニデン、フルプレドニゾロン、フルランデノリド、フォルモコルタル、ハルシノニド、ハロメタゾン、酢酸ハロプレドン、ヒドロコルタメート、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン21-ナトリウムスクシネート、テプト酸ヒドロコルチゾン、マジプレドン、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニコロン、フロ酸モメタゾン、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、プレドニゾロン21-ジエドリア

ミノアセテート、リン酸プレドニゾロンナトリウム、コハク酸プレドニゾロンナトリウム、プレドニゾロンナトリウム 21 - m - スルホベンゾエート、プレドニゾロンナトリウム 21 - ステアログリコレート、テプト酸プレドニゾロン、プレドニゾロン 21 - トリメチルアセテート、プレドニゾン、プレドニバル、プレドニリデン、プレドニリデン 21 - ジエチルアミノアセテート、チキソコルトール、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンベネトニドおよびトリアムシノロンヘキサアセトニドが含まれる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するコルチコステロイドもまた、この群に含まれるよう意図される。

#### 【0220】

抗菌剤（およびそのプロドラッグエステルまたは薬学的に許容しうる塩）もまた、本明細書記載の併用に適している。適切な抗菌剤には、例えば、アンピシリン、アモキシシリン、オーレオマイシン、パシトラシン、セフトラジウム、セフトリアキソン、セフォタキシム、セファクロール、セファレキシン、セファラジン、シプロフロキサシン、クラブラン酸、クロキサシリン、ジクロキサシラン、エリスロマイシン、フルクロキサシラン、ゲンタマイシン、グラミシジン、メチシラン、ネオマイシン、オキサシラン、ペニシリンおよびバンコマイシンが含まれる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連する抗菌剤もまた、この群に含まれるよう意図される。

#### 【0221】

さらなる適切な化合物には、限定されるわけではないが：BN 50730；テニダップ；E 5531；チアパファントPCA 4248；ニメスリド；パナビル；ロリプラム；RP 73401；ペプチドT；MDL 201, 449A；(1R, 3S) - シス - 1 - [9 - (2, 6 - ジアミノプリニル)] - 3 - ヒドロキシ - 4 - シクロペンテン塩酸；(1R, 3R) - トランス - 1 - [9 - (2, 6 - ジアミノ)プリニル] - 3 - アセトキシシクロペンタン；(1R, 3R) - トランス - 1 - [9 - アデニル) - 3 - アジド - シクロペンタン塩酸および(1R, 3R) - トランス - 1 - [6 - ヒドロキシ - プリン - 9 - イル) - 3 - アジドシクロペンタンが含まれる。

#### 【0222】

いくつかの場合、例えば、肺におけるIL - 4過剰発現が、上皮細胞肥大、並びにリンパ球、好酸球、および好中球集積を引き起こす、喘息において、IL - 4が炎症効果を誘導可能であることが見出されている。この反応は、他のTh2サイトカインに誘導される炎症誘発反応の主な特徴を代表する。したがって、上述のように、IL - 4の阻害剤もまた、本発明にしたがって有用である。さらに限定されるわけではないが、iNOS阻害剤、および5 - リボキシゲナーゼ阻害剤を含む、特定の免疫抑制薬剤もまた、関節炎治療に使用可能であることが認識されるであろう。

#### 【0223】

ショウガ(ginger)は、特定の抗炎症特性を有することが示されており、そしてしたがって、コンドロイチンのように、本発明にしたがった抗炎症剤として使用するのに適している。

#### 【0224】

CD148活性化に関連する疾患の治療において、併用療法で、すなわち他の剤および療法と併用して、本発明の薬剤組成物を投与することもまた可能である。癌または腫瘍を治療する他の剤および療法と併用して、本発明の抗体および抗原結合性領域を利用することもまた可能である。こうした剤には、限定されるわけではないが、in vitro合成で調製した化学組成物、抗体、抗原結合性領域、放射性核種、並びにその組み合わせおよびコンジュゲートが含まれる。剤は、アゴニスト、アンタゴニスト、アロステリック調節剤、毒素であることも可能であり、またはより一般的には、ターゲットを阻害するかまたは刺激する（例えば受容体または酵素を活性化するかまたは阻害する）ように作用し、そしてそれによって、細胞死を促進するかまたは細胞増殖を抑制することも可能である。他の療法にはまた、例えば放射線治療、化学療法、および抗腫瘍剤を用いたターゲティング療法等もまた含まれる。特定の態様において、ヒト抗CD148抗体、またはその抗原

結合性断片を、1以上の療法剤、例えば抗血管形成剤、抗新生物剤、化学療法剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、または抗乾癬剤と併用して投与することも可能である。他の既知の療法、例えば理学療法、例えば放射線療法、高体温、移植（例えば骨髄移植）、手術、日光、または光療法と併用して、ヒト抗CD148抗体またはその抗原結合性断片を投与することもまた可能である。本明細書に具体的に列挙しないさらなる併用療法もまた、本発明の範囲内である。

【0225】

典型的な抗新生物剤には、例えば、ドキソルピシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、プレオマイシン硫酸、カルムスチン、クロラムブシル、およびシクロホスファミド、ヒドロキシ尿素が含まれ、これらは、単独では、患者に毒性であるかまたは準毒性であるレベルでしか有効でない。シスプラチンは、4週間ごとに1回、100 mg/m<sup>2</sup>用量で静脈内投与され、そしてアドリアマイシンは21日ごとに1回、60~75 mg/m<sup>2</sup>用量で静脈内投与される。他の典型的な抗腫瘍剤には、乳癌および他の型の癌を治療するのに使用可能なハーセプチン<sup>TM</sup>（トラスツズマブ）、並びに非ホジキンリンパ腫および他の型の癌を治療するのに使用可能なリツキサン<sup>TM</sup>（リツキシマブ）、ゼバリン<sup>TM</sup>（イブリツモマブ・チウキセタン）、およびリンホサイド<sup>TM</sup>（エプラツズマブ）、慢性骨髄性白血病および胃腸間質腫瘍を治療するのに使用可能なグリーバック<sup>TM</sup>、並びに非ホジキンリンパ腫の治療に使用可能なベキサール<sup>TM</sup>（ヨウ素131トシツモマブ）が含まれる。

【0226】

化学療法治療と併用可能な、他の抗新生物剤には、例えば：ナイトロジェンマスタード、例えばメクロレタミン、シクロホスファミド、イフォスファミド、メルファランおよびクロラムブシルを含むアルキル化剤；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、およびセムスチン（メチル-CCNU）；エチレンイミン/メチルメラミン、例えばトリエチレンメラミン（TEM）、トリエチレン、チオホスホラミド（チオテバ）、ヘキサメチルメラミン（HMM、アルトレタミン）；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン；トリアジン、例えばダカルバジン（DTIC）；葉酸類似体を含む代謝拮抗剤、例えばメトトレキセートおよびトリメトトレキセート、ピリミジン類似体、例えば5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタピン、シトシンアラビノシド（AraC、シタラビン）、5-アザシチジン、2,2'-ジフルオロデオキシシチジン、プリン類似体、例えば6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリン、2'-デオキシコフォルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシニルアデニン（EHNA）、リン酸フルダラビン、および2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、2-CD A）；パクリタキセル、ビンブラスチン（VLB）、ピンクリスチン、およびビノレルピンを含むピンカアルカロイド、タキソテール、エストラムスチン、並びにリン酸エストラムスチンなどの有糸分裂阻害剤を含む天然産物；ピピポドフィロトキシシン（pipodophyllotoxin）、例えばエトポシドおよびテニポシド；抗生物質、例えばアクチノマイシンD、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキソルピシン、ミトキサントロン、イダルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンC、およびアクチノマイシン；酵素、例えばL-アスパラギナーゼ；生物学的反応修飾剤、例えばインターフェロン-アルファ、IL-2、G-CSFおよびGM-CSF；白金配位錯体を含む雑多な剤、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン、アントラセンジオン、例えばミトキサントロン、置換尿素、例えばヒドロキシ尿素、N-メチルヒドラジン（M1H）およびプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、例えばミトタン（o,p'-DDD）およびアミノグルテチミド；ホルモンおよび副腎皮質ステロイドアンタゴニストを含むアンタゴニスト、例えばプレドニゾンおよび同等物、デキサメタゾン、並びにアミノグルテチミド；プロゲステロン、例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロンおよび酢酸メゲストロール；エストロゲン、例えばジエチルstilbestrolおよびエチニルエストラジオール同等物；抗エストロゲン、例えばタモキシフェン；プロピオン酸テストステロン

およびフルオキシメステロン / 同等物を含むアンドロゲン ; 抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体、およびロイプロリド ; 並びに非ステロイド性抗アンドロゲン、例えばフルタミドが含まれる。

【0227】

典型的な抗血管形成剤には、エルピタックス<sup>TM</sup> (IMC - C225)、KDR (キナーゼドメイン受容体) 阻害剤 (例えば該キナーゼドメイン受容体に特異的に結合する抗体および抗原結合性領域)、抗VEGF剤 (例えばVEGFに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域、あるいは可溶性VEGF受容体またはそのリガンド結合性領域)、例えばアバスチン<sup>TM</sup> またはVEGF - TRAP<sup>TM</sup>、および抗VEGF受容体剤 (例えばそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域)、EGFR阻害剤 (例えばそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域)、例えばABX - EGF (パニツムマブ)、イレッサ<sup>TM</sup> (ゲフィチニブ)、タルセバ<sup>TM</sup> (エルロチニブ)、抗Ang1および抗Ang2剤 (例えばそれまたはその受容体、例えばTie2 / Tekに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域)、および抗Tie - 2キナーゼ阻害剤 (例えばそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域) が含まれる。本発明の薬剤組成物はまた、増殖因子に特異的に結合し、そしてその活性を阻害する1以上の剤 (例えば抗体、抗原結合性領域、または可溶性受容体)、例えば肝細胞増殖因子 (HGF、スキャッター因子としても知られる) のアンタゴニスト、および該因子の受容体「c - met」に特異的に結合する抗体または抗原結合性領域も含むことも可能である。

10

【0228】

他の抗血管形成剤には、キャンパス、IL - 8、B - FGF、Tekアンタゴニスト (Cerettiら、米国公報第2003 / 0162712号 ; 米国特許第6,413,932号)、抗TWEAK剤 (例えば特異的に結合する抗体または抗原結合性領域、あるいはTWEAK受容体アンタゴニスト ; Wiley、米国特許第6,727,225号を参照されたい)、インテグリンのそのリガンドへの結合に拮抗するADAMディスインテグリン (disintegrin) ・ドメイン (Fanslowら、米国公報第2002 / 0042368号)、特異的結合性抗eph受容体および / または抗エフリン抗体または抗原結合性領域 (米国特許第5,981,245号 ; 第5,728,813号 ; 第5,969,110号 ; 第6,596,852号 ; 第6,232,447号 ; 第6,057,124号、並びにその特許ファミリーメンバー)、並びに抗PDGF - BBアンタゴニスト (例えば特異的に結合する抗体または抗原結合性領域)、並びにPDGF - BBリガンドに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域、およびPDGFRキナーゼ阻害剤 (例えばそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性領域)。他の典型的な抗血管形成剤には、Ang - 1およびCD148 (およびその受容体) のアンタゴニスト、VEGFのアンタゴニスト (アバスチン、VEGF - TRAPなど)、VEGF受容体のアンタゴニスト、およびIL - 8のアンタゴニスト、B - FGFのアンタゴニスト、並びにKDRおよび他の血管形成の他の仲介因子の小分子阻害剤が含まれる。

20

30

【0229】

さらなる抗血管形成 / 抗腫瘍剤には : SD - 7784 (Pfizer、米国) ; シレンジチド (Merck KGaA、ドイツ、EPO 770622) ; ペガプタニブ八ナトリウム (Gilead Sciences、米国) ; アルファスタチン (BioActa、英国) ; M - PGA (Celgene、米国、US 5712291) ; イロマスタット (Arriva、米国、US 5892112) ; エマキサニブ (Pfizer、米国、US 5792783) ; パタラニブ (Novartis、スイス) ; 2 - メトキシエストラジオール (EntreMed、米国) ; TLC ELL - 12 (Elan、アイルランド) ; 酢酸アネコルタブ (Alcon、米国) ; アルファ - D148 Mab (Amgen、米国) ; CEP - 7055 (Cephalon、米国) ; 抗Vn Mab (Crucell、オランダ) ; DAC : 抗血管形成 (ConjuChem、カナダ) ; アンジオシジン (InKine Pharmaceutical、米国) ; KM - 2550 (協和発酵、日本) ; SU - 0879 (Pfizer、米国) ; CGP - 79787 (Nova

40

50



rtis、スイス、EP 970070); ARGENT技術(Ariad、米国); YIGSR-ステルス(Johnson & Johnson、米国); フィブリノーゲン-E断片(BioActa、英国); 血管形成阻害剤(Trigen、英国); TBC-1635(Encysive Pharmaceuticals、米国); SC-236(Pfizer、米国); ABT-567(Abbott、米国); メタスタチン(EntreMed、米国); 血管形成阻害剤(Tripep、スウェーデン); マスピン(そーせい、日本); 2-メトキシエストラジオール(Oncology Sciences Corporation、米国); ER-68203-00(IVAX、米国); ベネフィン(Lane Labs、米国); Tz-93(ツムラ、日本); TAN-1120(武田、日本); FR-111142(藤沢、日本、JP 02233610); 血小板因子4(RepliGen、米国、EP 407122); 血管内皮増殖因子アンタゴニスト(Borean、デンマーク); 癌療法(南カリフォルニア大学、米国); ビバシズマブ(pINN)(Genentech、米国); 血管形成阻害剤(SUGEN、米国); XL 784(Exelixis、米国); XL 647(Exelixis、米国); MAb、アルファ5ベータ3インテグリン、第二世代(Applied Molecular Evolution、米国およびMedImmune、米国); 遺伝子治療、網膜症(Oxford BioMedica、英国); エンザスタウリン塩酸(USAN)(Lilly、米国); CEP 7055(Cephalon、米国およびSanofi-Synthelabo、フランス); BC 1(Genoa Institute of Cancer Research、イタリア); 血管形成阻害剤(Alchemia、オーストラリア); VEGFアンタゴニスト(Regeneron、米国); rBPI 21およびBPI由来抗血管形成性(XOMA、米国); PI 88(Progen、オーストラリア); シレンジチド(pINN)(Merck KGaA、ドイツ; ミュンヘン技術大学、ドイツ、Scripps Clinic and Research Foundation、米国); セツキシマブ(INN)(Aventis、フランス); AVE 8062(味の素、日本); AS 1404(Cancer Research Laboratory、ニュージーランド); SG 292(Telios、米国); エンドスタチン(Boston Childrens Hospital、米国); ATN 161(Attenuon、米国); アンジオスタチン(Boston Childrens Hospital、米国); 2-メトキシエストラジオール(Boston Childrens Hospital、米国); ZD 6474(AstraZeneca英国); ZD 6126(Angiogene Pharmaceuticals、英国); PPI 2458(Praecis、米国); AZD 9935(AstraZeneca、英国); AZD 2171(AstraZeneca、英国); バタラニブ(pINN)(Novartis、スイスおよびSchering AG、ドイツ); 組織因子経路阻害剤(EntreMed、米国); ペガブタニブ(Pinn)(Gilead Sciences、米国); キサントーリゾール(延世大学、韓国); 遺伝子に基づくVEGF-2ワクチン(Scripps Clinic and Research Foundation、米国); SPV5.2(Supratek、カナダ); SDX 103(カリフォルニア大学サンディエゴ校、米国); PX 478(ProIX、米国); メタスタチン(EntreMed、米国); トロポニンI(ハーバード大学、米国); SU 6668(SUGEN、米国); OXI 4503(OXIGENE、米国); o-グアニジン(Dimensional Pharmaceuticals、米国); モツボラミンC(ブリティッシュコロンビア大学、カナダ); CDP 791(Celltech Group、英国); アチプリモド(pINN)(GlaxoSmithKline、英国); E 7820(エーザイ、日本); CYC 381(ハーバード大学、米国); AE 941(Aeterna、カナダ); ワクチン、血管形成(EntreMed、米国); ウロキナーゼ・プラスミノゲン活性化因子阻害剤(Dendreon、米国); オグルファニド(pINN)(Melmotte、米国); HIF-1アルファ阻害剤(Xenova、英国); CEP 5214(Cephalon、米国); BAY 50

RES 2622 (Bayer、ドイツ); アンジオシジン (InKine、米国); A6 (Angstrom、米国); KR 31372 (韓国化学技術研究所、韓国); GW 2286 (GlaxoSmithKline、英国); EHT 0101 (Exon Hit、フランス); CP 868596 (Pfizer、米国); CP 564959 (OSI、米国); CP 547632 (Pfizer、米国); 786034 (GlaxoSmithKline、英国); KRN 633 (キリンビール、日本); 薬剤送達系、眼内、2-メトキシエストラジオール (EntreMed、米国); アンジネックス (マーストリヒト大学、オランダおよびミネソタ大学、米国); ABT 510 (Abbott、米国); AAL 993 (Novartis、スイス); VEGI (ProteomTech、米国); 腫瘍壊死因子-アルファ阻害剤 (米国加齢研究所、米国); SU 11248 (Pfizer、米国およびSUGEN、米国); ABT 518 (Abbott、米国); YH16 (Yantai Rongchang、中国); S-3APG (Boston Childrens Hospital、米国およびEntreMed、米国); MAb KDR (ImClone Systems、米国); MAbアルファ5ベータ1 (Protein Design、米国); KDRキナーゼ阻害剤 (Celltech Group、英国およびJohnson & Johnson、米国); GF B 116 (南フロリダ大学、米国およびエール大学、米国); CS 706 (三共、日本); コンプレタスタチンA4プロドラッグ (アリゾナ州立大学、米国); コンドロイチナーゼAC (IBEX、カナダ); BAY RES 2690 (Bayer、ドイツ); AGM 1470 (ハーバード大学、米国、武田、日本、およびTAP、米国); AG 13925 (Agouron、米国); テトラチオモリブデート (ミシガン大学、米国); GCS 100 (ウェイン州立大学、米国)、CV 247 (Ivy Medical、英国); CKD 732 (Chong Kun Dang、韓国); MAb血管内皮増殖因子 (Xenova、英国); イルソグラジン (INN) (日本新薬、日本); RG 13577 (Aventis、フランス); WX 360 (Willex、ドイツ); スクアラミン (pINN) (Genaera、米国); RPI 4610 (Sirna、米国); 癌療法 (Marinova、オーストラリア); ヘパラナーゼ阻害剤 (Insight、イスラエル); KL 3106 (Kolon、韓国); ホノキオール (エモリー大学、米国); ZK CDK (Schering AG、ドイツ); ZKアンジオ (Schering AG、ドイツ); ZK 229561 (Novartis、スイスおよびSchering AG、ドイツ); XMP 300 (XOMA、米国); VGA 1102 (大正、日本); VEGF受容体調節因子 (Pharmacopeia、米国); VE-カドヘリン-2アンタゴニスト (ImClone Systems、米国); パソスタチン (米国衛生研究所、米国); ワクチン、Flk-1 (ImClone Systems、米国); TZ 93 (ツムラ、日本); ツムスタチン (Beth Israel Hospital、米国); 一部切除可溶性FLT 1 (血管内皮増殖因子受容体1) (Merck & Co、米国); Tie-2リガンド (Regeneron、米国); トロンボスポンジン1阻害剤 (Allegheny Health, Education and Research Foundation、米国) が含まれる。

#### 【0230】

本発明の薬剤組成物はまた、肝細胞増殖因子 (スキャッター因子としても知られるHGF、およびその受容体「c-met」) のアンタゴニストなどの増殖因子剤の1以上の阻害剤も含むことも可能である。

#### 【0231】

ターゲット特異的エフェクター細胞、例えば本発明の組成物 (例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子) に連結されたエフェクター細胞を療法剤として用いることもまた可能である。ターゲティング用のエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球などのヒト白血球であることも可能である。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞および他のIgGまたはIgA受容体所持細胞が含まれる。所望の場合、治療しようとする被験者からエフェクター細胞を得ることも可能である。ターゲット特異的

エフェクター細胞を、生理学的に許容しうる溶液中の細胞懸濁物として投与することも可能である。投与する細胞の数は、 $10^8 \sim 10^9$  の桁であることも可能であるが、療法目的に応じて、多様であろう。一般的に、量は、ターゲット細胞、例えばCD148を発現する腫瘍細胞に局在し、そして例えば食作用によるなどの細胞死滅を達成するのに十分な量であろう。投与経路もまた、多様であることも可能である。

#### 【0232】

ターゲットとする細胞を除去するための他の技術と組み合わせて、ターゲット特異的エフェクター細胞を用いた療法を行うことも可能である。例えば、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）および/またはこれらの組成物で武装したエフェクター細胞を用いた抗腫瘍療法を、化学療法と組み合わせて用いることも可能である。さらに、併用免疫療法を用いて、2つの別個の細胞傷害性エフェクター集団を腫瘍細胞拒絶に向けることも可能である。例えば、抗FcR1または抗CD3に連結した抗CD148抗体を、IgGまたはIgA受容体特異的結合剤と組み合わせて用いることも可能である。

10

#### 【0233】

本発明の二重特異性分子および多重特異性分子を用いて、例えば細胞表面上の受容体をキャップ化するかまたは排除することによって、エフェクター細胞上のFcRまたはFcRレベルを調節することもまた可能である。抗Fc受容体の混合物もまた、この目的に使用可能である。

#### 【0234】

補体に結合するIgG1、IgG2、IgG3またはIgM由来の部分などの補体結合性部位を有する、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）もまた、補体の存在下で使用可能である。1つの態様において、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞を用いた、ターゲット細胞を含む細胞集団の*ex vivo*治療を、補体または補体を含む血清の添加によって補完することも可能である。補体タンパク質の結合によって、本発明の結合剤でコーティングしたターゲット細胞の食作用を改善することも可能である。別の態様において、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）でコーティングしたターゲット細胞が、補体によって溶解されることもまた可能である。さらに別の態様において、本発明の組成物は、補体を活性化しない。

20

30

#### 【0235】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）を補体と一緒に投与することもまた可能である。したがって、本発明の範囲内には、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子および血清または補体を含む組成物がある。これらの組成物は、補体が、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子に非常に近接して位置する点で好適である。あるいは、ヒト抗体、本発明の多重特異性分子または二重特異性分子および補体または血清を別個に投与することも可能である。

#### 【0236】

本発明の範囲内にやはりあるのは、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）およびその使用説明書を含むキットである。キットはさらに、補体などの少なくとも1つのさらなる試薬、または本発明の1以上のさらなるヒト抗体（例えば第一のヒト抗体とは異なるCD148抗原エピトープに結合する、相補的活性を有するヒト抗体）を含有することも可能である。

40

#### 【0237】

他の態様において、例えば被験者をサイトカインで治療することによって、FcまたはFc受容体の発現または活性を調節する、例えば増進するかまたは阻害する剤で、被験者をさらに治療することも可能である。多重特異性分子での治療中に投与するのが好ましいサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン（IFN）、および腫瘍壊死因子（TNF）が含まれる。

50

## 【0238】

別の態様において、リンホカイン調製物で被験者をさらに治療することも可能である。リンホカイン調製物を用いて、CD148を高発現しない癌細胞がCD148を高発現するよう誘導することも可能である。リンホカイン調製物は、腫瘍細胞の中で、CD148のより均質な発現を引き起こすことも可能であり、これが、より有効な療法を導くことも可能である。投与に適したリンホカイン調製物には、インターフェロン-ガンマ、腫瘍壊死因子、およびその組み合わせが含まれる。これらを静脈内投与することも可能である。リンホカインの適切な投薬量は、10,000~1,000,000単位/患者である。

## 【0239】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）を用いて、例えばFcRまたはCD148を発現する細胞を標識するため、こうした細胞をターゲティングすることも可能である。こうした使用のため、結合剤を検出可能な分子に連結することも可能である。したがって、本発明は、FcRなどのFc受容体、またはCD148を発現する細胞を、*ex vivo*または*in vitro*で位置決定する方法を提供する。検出可能な標識は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であることも可能である。

## 【0240】

1つの態様において、本発明は、試料中のCD148抗原の存在を検出するか、またはCD148抗原の量を測定する方法であって、CD148に特異的に結合するヒト・モノクローナル抗体またはその一部およびCD148の間の複合体の形成を可能にする条件下で、該抗体またはその抗原結合性領域と、試料および対照試料を接触させることを含む、前記方法を提供する。次いで、複合体の形成を検出し、ここで、対照試料と比較して試料間の複合体形成に相違があれば、試料中にCD148抗原が存在する指標となる。

## 【0241】

さらに別の態様において、本発明は、*in vivo*または*in vitro*で、Fc発現細胞の存在を検出するかまたはその量を定量化するための方法を提供する。該方法は（i）被験者に、検出可能マーカーとコンジュゲート化した本発明の組成物（例えば多重特異性分子または二重特異性分子）またはその断片を投与し；（ii）被験者を、前記検出可能マーカーを検出する手段に曝露して、Fc発現細胞を含有する領域を同定することを含む。

本発明の使用および方法

本発明は、ヒト疾患および病的状態の治療に有用なCD148エピトープに結合する、抗体またはその抗原結合性領域を提供する。CD148活性、または他の細胞活性を活性化する剤を、他の療法剤と併用して、その療法効果を増進するか、または潜在的副作用を減少させることも可能である。

## 【0242】

1つの側面において、本発明は、細胞における望ましくないレベルまたは異常なレベルのCD148活性によって特徴付けられる疾患および状態を治療するのに有用な試薬および方法を提供する。これらの疾患には、癌、および他の過剰増殖状態、例えば過形成、乾癬、接触性皮膚炎、免疫学的障害、および不妊が含まれる。

## 【0243】

*in vitro*で、療法または診断使用と関連する結合活性に関して、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）をまず試験することも可能である。例えば、本明細書に記載するELISAおよびフローサイトメトリーアッセイを用いて、本発明の組成物を試験することも可能である。さらに、CD148を発現する細胞の細胞溶解を含めて、少なくとも1つのエフェクターが仲介するエフェクター細胞活性を誘発する際のこれらの分子の活性をアッセイすることも可能である。エフェクター細胞が仲介する食作用に関してアッセイするためのプロトコルを本明細書に記載する。

## 【0244】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）は、CD1

10

20

30

40

50

48 関連疾患の療法および診断にさらなる有用性を有する。例えば、ヒト・モノクローナル抗体、多重特異性分子または二重特異性分子を用いて、CD148を発現する細胞において、CD148が誘導する(inducted)脱リン酸化を促進するか、CD148を発現する細胞の増殖を阻害するか、またはCD148を発現する細胞の血管形成を阻害することも可能である。本発明の抗CD148抗体は、限定されるわけではないが、目の血管新生、例えば網膜症(糖尿病網膜症を含む)、加齢性黄斑変性症、乾癬、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、炎症性疾患、例えばリウマトイドまたはリウマチ性炎症性疾患、特に関節炎(関節リウマチを含む)、または他の慢性炎症性障害、例えば慢性喘息、動脈性または移植後アテローム硬化症、子宮内膜症、および新生物疾患、例えばいわゆる固形腫瘍および液性(または造血)腫瘍(例えば白血病およびリンパ腫)を含む、いかなる血管形成依存性疾患を治療するのにも有用でありうる。望ましくない血管形成に関連する他の疾患が、当業者に明らかであろう。

10

**【0245】**

特定の態様において、ヒト抗体およびその誘導体をin vivoで用いて、多様なCD148関連新生物疾患を治療するか、防止するか、または診断する。CD148関連疾患の例には、多様な癌、例えば膀胱癌、乳癌、子宮癌/子宮頸癌、結腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、胃癌、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌、扁平細胞癌、肺(非小細胞)癌、食道癌、並びに頭部および首部の癌が含まれる。

**【0246】**

本発明はまた、ヒトを含む動物において癌を治療する方法であって、該動物に、CD148活性を活性化する抗体またはその抗原結合性領域の有効量を投与することを含む、前記方法も提供する。本発明は、生物学的系において、細胞増殖、侵襲性、および転移のプロセスを含む、癌細胞増殖を阻害する方法にさらに関する。方法は、癌細胞増殖の阻害剤としての、本発明の化合物の使用を含む。好ましくは、該方法を使用して、哺乳動物などの生存動物において、癌細胞増殖、侵襲性、転移、または腫瘍発生を阻害するかまたは減少させる。本発明の方法はまた、例えば癌細胞増殖およびその特性をアッセイするアッセイ系、並びに癌細胞増殖に影響を及ぼす化合物を同定するアッセイ系における使用に、容易に適応可能である。

20

**【0247】**

本発明の方法によって治療可能な癌は、好ましくは、哺乳動物において発生する。哺乳動物には、例えば、ヒトおよび他の霊長類、並びに、イヌおよびネコなどのコンパニオン動物、ラット、マウスおよびウサギなどの実験動物、並びにウマ、ブタ、ヒツジ、およびウシなどの農場動物が含まれる。

30

**【0248】**

腫瘍または新生物には、細胞の増殖が、調節されず、そして進行性である、組織細胞の増殖が含まれる。いくつかのこうした増殖は、良性であるが、他のものは悪性であると称され、そして生物の死を導くこともありうる。悪性新生物または癌は、積極的な細胞増殖を示すのに加えて、周囲組織に侵入して、そして転移することも可能である点で、良性増殖とは区別される。さらに、悪性新生物は、分化のより大きな損失(より大きい脱分化)、並びに互いに比較して、そしてその周囲組織に比較して、編成のより大きな損失を示すことで特徴付けられる。この特性はまた「退形成」とも呼ばれる。

40

**【0249】**

本発明で治療可能な新生物には、また、固形腫瘍、すなわち癌腫および肉腫が含まれる。癌腫には、周囲組織に浸潤(侵入)し、そして転移を生じさせる上皮細胞由来の悪性新生物が含まれる。腺癌は、腺組織に由来するか、または認識可能な腺構造を形成する、癌腫である。別の広いカテゴリーまたは癌には、肉腫が含まれ、これは細胞が、胚性結合組織のような、繊維状物質または均質な物質に包埋された、腫瘍である。本発明はまた、白血病、リンパ腫、および典型的には腫瘍として存在せず、血管またはリンパ網内系に分布する他の癌を含む、骨髄またはリンパ系の癌の治療も可能にする。

**【0250】**

50

本発明記載の治療に受け入れられる癌または腫瘍細胞の種類には、例えば、ACTH産生腫瘍、急性リンパ球性白血病、急性非リンパ球性白血病、副腎皮質の癌、膀胱癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング肉腫、胆嚢癌、毛様細胞癌、頭部および首部の癌、ホジキンリンパ腫、カポジ肉腫、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（小細胞および非小細胞）、悪性腹水、悪性胸水、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、神経芽腫、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣（生殖細胞）癌、脾臓癌、陰茎癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、皮膚癌、軟組織肉腫、扁平細胞癌腫、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、絨毛性新生物、子宮癌、膣癌、外陰の癌、およびウィルムス腫瘍が含まれる。

#### 【0251】

本明細書において、本発明は、特定の種類の実験的に定義された癌の治療に関して、特に例示される。これらの治療例において、標準的な最先端の*in vitro*および*in vivo*モデルが用いられてきている。これらの方法を用いて、*in vivo*治療措置で有効であると期待される剤を同定することも可能である。しかし、本発明の方法は、これらの腫瘍種治療に限定されず、臓器系いずれに由来する固形腫瘍いずれにも拡張可能であることが理解されるであろう。侵襲性または転移がCD148活性に関連する癌は、特に感受性であり、本発明の手段によって阻害され、または退行するように誘導されることさえある。

#### 【0252】

慣用的な化学療法剤いずれかなどの、別の抗癌化学療法剤と併用して、ペプチボディなどの本発明の化合物を含むことによって、本発明を実施することもまた可能である。こうした他の剤と特異的結合剤の併用によって、化学療法プロトコルを増強することも可能である。本発明の方法に取り込むことが可能なものとして、当業者には、多くの化学療法プロトコルが思い浮かぶであろう。アルキル化剤、代謝拮抗剤、ホルモンおよびアントゴニスト、放射性同位体、並びに天然産物を含む、いかなる化学療法剤を用いることも可能である。例えば、本発明の化合物を、ドキソルピシンおよび他のアントラサイクリン類似体などの抗生物質、シクロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード、5-フルオロウラシルなどのピリミジン類似体、シスプラチン、ヒドロキシ尿素、タキソール、並びにその天然および合成誘導体等と一緒に投与することも可能である。別の例として、腫瘍がゴナドトロピン依存性細胞およびゴナドトロピン非依存性細胞を含む乳房の腺癌などの、混合腫瘍の場合、化合物を、ロイプロリドまたはゴセレリン（LH-RHの合成ペプチド類似体）と組み合わせることも可能である。他の抗新生物プロトコルには、本明細書において、「補助的抗新生物様式」とも称される、別の治療様式、例えば手術、放射線照射等を伴うテトラサイクリン化合物の使用が含まれる。したがって、本発明の方法を、こうした慣用的措置と一緒に使用することも可能であり、これには、副作用を減少させ、そして有効性を増進する利点が伴う。

#### 【0253】

したがって本発明は、固形腫瘍および白血病を含む、非常に多様な種類の癌の治療に有用な組成物および方法を提供する。治療可能な癌の種類には、限定されるわけではないが：乳房、前立腺、および結腸の腺癌；肺の気管支癌のすべての型；骨髄腫；黒色腫；肝癌；神経芽腫；乳頭腫；アブドーマ；分離腫；鰓腫；悪性カルチノイド症候群；カルチノイド心疾患；癌腫（例えばウオーカー癌、基底細胞癌、基底扁平細胞癌、ブラウン-ピアース癌、管癌、エーリッヒ腫瘍、クレブス2癌、メルケル細胞癌、粘液性癌、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、硬癌、細気管支癌、気管支癌、扁平上皮癌、および移行上皮癌）；組織球性傷害；白血病；悪性組織球増加症；ホジキン病；免疫増殖性小肺細胞癌腫；非ホジキンリンパ腫；プラズマ細胞腫；細網内皮増殖症；黒色腫；軟骨芽腫；軟骨腫；軟骨肉腫；線維腫；線維肉腫；巨細胞腫瘍；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；軟骨腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル芽細胞腫；セメント腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；絨毛性腫瘍が含まれる。さらに、以下の種類の癌もまた、治療可能である：線腫；胆管腫；コレステリ

10

20

30

40

50

ン腫；円柱腫；嚢胞腺癌；嚢腺腫；顆粒膜細胞癌；男女性胚腫；肝癌；汗腺腫；島細胞腫；ライディッヒ細胞腫；乳頭腫；セルトリ細胞腫；卵胞膜腫；平滑筋腫；平滑筋肉腫；筋原細胞腫；筋腫；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；上衣細胞腫；節神経腫；神経膠腫；髓芽腫；髓膜腫；神経鞘腫；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経線維腫；神経腫；副神経節腫；非クロム親和性副神経節腫；角化血管腫；好酸球増加症を伴う血管リンパ過形成；硬化性血管腫；血管腫症；グロムス血管症；血管内皮腫；血管腫；血管周囲細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状嚢肉腫；線維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経線維腫症、および頸部形成異常が含まれる。

10

## 【0254】

本発明の別の側面は、本発明の材料および方法を用いて、乾癬および接触性皮膚炎または他の過剰増殖疾患を含む、皮膚の過剰増殖状態いずれかを防止し、そして/または治療することである。好ましくは、CD148に特異的な特異的結合剤を、他の薬学的剤と併用して、これらの臨床症状を発現するヒトを治療する。多様なキャリアーいずれかを用いて、本明細書記載の投与経路および当業者に周知の他のものを通じて、特異的結合剤を送達することも可能である。

## 【0255】

本発明の他の側面には、血管形成が関与している多様な網膜症（糖尿病網膜症および加齢性黄斑変性症を含む）、並びに子宮内膜症、子宮類線維腫、および女性生殖周期中の機能不全性血管増殖（子宮内膜微小血管増殖を含む）に関連する他の状態などの、女性生殖管の障害/疾患を治療することが含まれる。

20

## 【0256】

本発明のさらに別の側面は、脳動静脈（arteriovenous）形成異常（AVM）、胃腸粘膜傷害および修復、消化性潰瘍の病歴がある患者における胃十二指腸粘膜の潰瘍、脳卒中から生じる虚血、肝臓疾患における広い範囲の肺血管障害、および非肝臓門脈圧亢進症患者における門脈圧亢進症を含む、異常な血管増殖を治療することに関する。

## 【0257】

本発明の別の側面は、本発明が提供する組成物および方法を利用した、癌の予防である。こうした試薬は、CD148に対する抗体またはその抗原結合性領域などの特異的結合剤を含むであろう。

30

CD148エピトープ結合性分子の同定

本発明のCD148エピトープおよび抗体を用いて、CD148活性を活性化させる剤を同定することも可能であり、こうした剤は、限定されるわけではないが、血管形成を阻害することを含めて、特定の生理学的障害を治療するのに有用でありうる。本発明の1つの側面において、配列番号33のアミノ酸447~725、533~725、715~973、324~335、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する化合物を同定する方法であって：配列番号33のアミノ酸447~725、533~725、715~973、324~335、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープと試験化合物を、複合体が形成されるのに十分な時間、接触させ、そして複合体中のCD148エピトープまたは化合物を検出することによって、複合体の形成を検出し、複合体が検出されたならば、CD148エピトープに結合する化合物が同定されるようにすることを含む、前記方法を提供する。例えば、目的のタンパク質をコードするDNAでトランスフェクションした細胞を、多様な薬剤で処理することも可能であり、そして共免疫沈降を行うことも可能である。CD148は、血管形成などの生理学的障害の阻害と関連する生理学的シグナルを伝達するのに関与するため、CD148活性を活性化することが可能な剤の同定は、生理学的障害を治療するのに使用可能であるか、または療法剤の開発用のリード化合物として使用可能である剤を提供する

40

50

であろう。剤は、CD148脱リン酸化を開始する方式で、本明細書に定義するCD148エピトープに結合することによって、CD148を活性化することも可能である。CD148を活性化するのに使用可能な剤には、ペプチド、抗体、核酸、アンチセンス化合物またはリボザイムが含まれる。核酸は、抗体またはアンチセンス化合物をコードすることも可能である。ペプチドは、結合性タンパク質配列の少なくとも4アミノ酸であることも可能である。あるいは、ペプチドは、結合性タンパク質のアミノ酸の連続スパンに少なくとも75%同一である、4~30アミノ酸(または8~20アミノ酸)であることも可能である。本明細書に各々援用される、米国特許第5,622,852号および第5,773,218号、並びにPCT公開出願第WO 97/27296号および第WO 99/65939号に開示されるものなど、一般の当業者に周知の技術によって、本明細書記載のものなどの、トランスフェクションした宿主細胞、細胞株、細胞モデルまたは動物を用いて、剤を試験することも可能である。剤の調節効果を、*in vivo*または*in vitro*で試験することも可能である。ファージディスプレイライブラリーまたはコンビナトリアルライブラリーにおいて、試験のため、剤を提供することも可能である。剤をスクリーニングする方法の例は、タンパク質複合体の形成に対して、剤が有する影響を測定することである。

10

#### 【0258】

本発明のCD148エピトープを用いて、*in vivo*で、例えばより活性であるかまたは安定である型のポリペプチドであるか、あるいは例えばポリペプチドの機能を増進するかまたはこれに干渉する薬剤を作り出すため、目的の生物学的活性ポリペプチドの構造的類似体、またはこれらが相互作用する小分子(例えばアゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤)の構造的類似体を産生することもまた可能である。本発明の1つの側面は、配列番号33のアミノ酸447~725、533~725、715~973、324~335、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるヒトCD148エピトープに特異的に結合する化合物を同定するための方法であって：配列番号33のアミノ酸447~725、533~725、715~973、324~335、200~536、533~725および200~725からなる群より選択される1以上のポリペプチド配列によって定義されるCD148エピトープの三次元構造を定義する原子座標を提供し、そして前記原子座標に基づいて、CD148エピトープに結合可能な化合物を設計するかまたは選択することを含む、前記方法を提供する。合理的薬剤設計に使用するためのいくつかのアプローチには、三次元構造の分析、アラニンスキャン、分子モデリングおよび抗*id*抗体の使用が含まれる。これらの技術は、当業者に周知である。こうした技術は、前記の第一のポリペプチドおよび前記の第二のポリペプチドによって形成されるタンパク質複合体の三次元構造を定義する原子座標を提供し、そして前記原子座標に基づいて、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチド間の相互作用に干渉可能な化合物を設計するかまたは選択することを含むことも可能である。

20

30

#### 【0259】

ポリペプチド活性を調節するかまたはこれに影響を及ぼす物質を同定した後、物質をさらに調べることも可能である。さらに、これを調製物、すなわち製造物または配合物、あるいは薬物、薬剤組成物または薬剤などの組成物中で、製造し、そして/または用いることも可能である。これらを個体に投与することも可能である。

40

#### 【0260】

ポリペプチド機能の調節剤として同定される物質は、ペプチド性または非ペプチド性であることも可能である。非ペプチド「小分子」は、しばしば、多くの*in vivo*薬学的使用に好ましい。したがって、物質の模倣体を(特にペプチドの場合)、薬学的使用のために設計することも可能である。

#### 【0261】

既知の薬学的活性化合物に対する模倣体の設計は、「リード」化合物に基づく薬剤の開発への既知のアプローチである。活性化合物の合成が困難であるかまたは高価である場合

50



、あるいは特定の投与方法には不適切である場合、例えば純粋なペプチドは、消化管でプロテアーゼによって迅速に分解される傾向があるため、経口組成物には不適切な活性剤であるが、このような場合、このアプローチが望ましい可能性もある。模倣体の設計、合成および試験を一般的に用いて、ターゲット特性に関する膨大な数の分子を無作為にスクリーニングするのを回避する。

#### 【0262】

ファーマコフォアを見出したら、一定の範囲の供給源、例えば分光技術、x線回折データおよびNMRからのデータを用いて、物理的特性、例えば立体化学、結合、サイズおよび/または荷電にしたがって、その構造をモデリングする。コンピュータ分析、類似性マッピング（原子間の結合よりも、ファーマコフォアの荷電および/または体積をモデリングする）、および他の技術を、このモデリング・プロセスで用いることも可能である。

10

#### 【0263】

次いで、化学基を移植可能な、ファーマコフォアを模倣するテンプレート分子を選択する。模倣体が、容易に合成され、薬理的に許容しうる可能性が高く、そしてリード化合物の生物学的活性を保持しながら、*in vivo*で分解されないように、テンプレート分子およびそこに移植する化学基を好適に選択することも可能である。あるいは、模倣体がペプチドに基づく場合、ペプチドを環状化し、その剛性を増加させることによって、さらなる安定性を得ることも可能である。次いで、このアプローチによって発見される単数または複数の模倣体をスクリーニングして、これらがターゲット特性を有するかどうか、またはどの程度までこの特性を提示しているかを調べることも可能である。次いで、さら

20

#### 結合アッセイ

免疫学的結合アッセイは、典型的には、分析物ターゲット抗原に特異的に結合し、そしてしばしば該抗原を固定する、捕捉剤を利用する。捕捉剤は、分析物に特異的に結合する部分である。本発明の1つの態様において、捕捉剤は、本発明のCD148エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性領域である。これらの免疫学的結合アッセイは当該技術分野に周知である [Asai 監修, *Methods in Cell Biology*, Vol. 37, *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., ニューヨーク (1993)]。

30

#### 【0264】

免疫学的結合アッセイは、しばしば、捕捉剤および抗原によって形成される結合複合体の存在を示す、標識剤を利用する。標識剤は、結合した複合体を含む分子の1つであることも可能であり、すなわち該剤は、標識された特異的結合剤または標識された抗特異的結合剤抗体であることも可能である。あるいは、標識剤は、結合した複合体に結合する第三の分子、一般的には別の抗体であることも可能である。標識剤は、例えば、標識を所持する抗特異的結合剤抗体であることも可能である。結合した複合体に特異的なこの第二の抗体は、標識を欠くことも可能であるが、第二の抗体がメンバーである抗体種に特異的な第四の分子に結合されることも可能である。例えば、ビオチンなどの検出可能部分で第二の抗体を修飾することも可能であり、次いで、この検出可能部分が、酵素標識ストレプトア

40

#### 【0265】

アッセイの間中、試薬の各組み合わせの後に、インキュベーション工程および/または洗浄工程が必要である可能性もある。インキュベーション工程は、約5秒間～数時間、好

50

ましくは約5分間～約24時間の範囲で多様であることも可能である。しかし、インキュベーション時間は、アッセイ形式、分析物、溶液の体積、濃度等に依存するであろう。通常、アッセイを周囲温度で行うが、ある範囲の温度に渡って行うことも可能である。

#### A. 非競合的結合アッセイ:

免疫学的結合アッセイは、非競合型であることも可能である。これらのアッセイは、直接測定される捕捉された分析物の量を有する。例えば、1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいて、捕捉剤(抗体)を固体支持体に直接結合させて固定することも可能である。次いで、これらの固定された捕捉剤は、試験試料中に存在する抗原を捕捉する(該抗原に結合する)。次いで、こうして固定されたタンパク質を、標識を有する第二の抗体などの標識剤に結合させる。別の好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいて、第二の抗体は、標識を欠くが、第二の抗体が由来する種の抗体に特異的な標識抗体に結合されることも可能である。第二の抗体をビオチンなどの検出可能部分で修飾して、これにストربتアビジンなどの第三の標識分子が特異的に結合することも可能である。本明細書に援用される、HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 第14章, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州(1988)を参照されたい。

10

#### B. 競合的結合アッセイ:

免疫学的結合アッセイは、競合型であることも可能である。試料中存在する分析物の量は、添加された分析物が、試料中に存在する分析物によって、捕捉剤(抗体)から置換されたか、または競合して追い出された(*competed away*)量を測定することによって、間接的に測定される。1つの好ましい競合的結合アッセイにおいて、通常、標識されている、既知の量の分析物を試料に添加し、そして次いで、試料を捕捉剤と接触させる。抗体に結合した標識分析物の量は、試料中存在する分析物濃度に反比例する(HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 第14章, pp. 579-583、上記を参照されたい)。

20

#### 【0266】

別の好ましい競合的結合アッセイにおいて、捕捉剤は、固体支持体上に固定される。タンパク質/抗体複合体中存在するタンパク質の量を測定することによって、あるいは残りの複合体化していないタンパク質の量を測定することによって、捕捉剤に結合したタンパク質の量を決定することも可能である。標識タンパク質を提供することによって、タンパク質の量を検出することも可能である。HarlowおよびLane(上記)。

30

#### 【0267】

さらに別の好ましい競合的結合アッセイ、ハプテン阻害を利用する。ここでは、既知の分析物を固体支持体上に固定する。既知の量の抗体を試料に添加し、そして固定された分析物と試料を接触させる。固定された分析物に結合した抗体の量は、試料中存在する分析物の量と反比例する。抗体の固定された割合または溶液に残る割合のいずれかを検出することによって、固定された抗体の量を検出することも可能である。抗体が標識されている場合、検出を直接行うことも可能であるし、または上述のように、抗体に特異的に結合する標識部分を続いて添加することによって、間接的に行うことも可能である。

40

#### C. 競合的結合アッセイの利用

競合的結合アッセイを交差反応性決定に用いて、本発明のペプチボディに認識されるタンパク質または酵素複合体が所望のタンパク質であり、そして交差反応性分子でないかどうかを決定するか、あるいはペプチボディが抗原に特異的であり、そして関連しない抗原には結合しないかどうかを、当業者が決定するのを可能にすることも可能である。この種のアッセイにおいて、抗原を固体支持体に固定することも可能であり、そして未知のタンパク質混合物をアッセイに添加すると、該混合物が、固定されたタンパク質へのペプチボディの結合と競合するであろう。競合分子はまた、該抗原に関連しない1以上の抗原にも結合する。タンパク質が、固定された抗原へのペプチボディの結合と競合する能力を、固体支持体に固定された同じタンパク質による結合と比較して、タンパク質混合物の交差反応性を決定する。

50

#### D. 他の結合アッセイ

本発明はまた、試料中のCD148エピトープまたはその断片の存在を検出するかまたは定量化するウェスタンブロット法も提供する。該技術は、一般的に、分子量に基づいて、ゲル電気泳動によって、試料タンパク質を分離し、そして該タンパク質を適切な固体支持体、例えばニトロセルロース膜、ナイロン膜、または誘導体化ナイロン膜にトランスファーすることを含む。CD148エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性領域と試料をインキュベーションし、そして生じた複合体を検出する。これらのペプチポディを直接標識することも可能であるし、あるいはペプチポディに特異的に結合する標識抗体を用いて、続いて検出することも可能である。

#### E. 診断アッセイ

本発明のペプチドおよびペプチポディまたはその断片などの誘導体結合剤は、CD148またはサブユニットの発現によって特徴付けられる状態または疾患の診断に、あるいはCD148の活性化剤、その断片、CD148活性のアゴニストまたは阻害剤で治療中の患者を監視するアッセイにおいて、有用である。CD148の診断アッセイには、ヒト体液、あるいは細胞または組織の抽出物において、CD148を検出する抗体および標識を利用する方法が含まれる。本発明の抗体を修飾して、または修飾せずに用いることも可能である。好ましい診断アッセイにおいて、例えば標識またはレポーター分子を付着させることによって、抗体を標識する。多様な標識およびレポーター分子が知られており、そのうちいくつかを既に本明細書に記載した。特に、本発明は、ヒト疾患の診断に有用である。

#### 【0268】

それぞれのタンパク質に特異的な抗体を用いて、CD148タンパク質を測定する多様なプロトコルが当該技術分野に知られる。例には、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光活性化細胞分取(FACS)が含まれる。CD148上の2つの干渉しないエピトープに対して反応性であるモノクローナル抗体を利用した、2部位のモノクローナル抗体に基づくイムノアッセイが好ましいが、競合的結合アッセイが使用可能である。これらのアッセイは、例えば、Maddoxら, J. Exp. Med., 158:1211(1983)に記載される。

#### 【0269】

診断の基礎を提供するため、通常、ヒトCD148発現の正常値または標準値を確立する。正常被験者、好ましくはヒト由来の体液または細胞抽出物と、CD148に対する抗体を、当該技術分野に周知の複合体形成に適した条件下で合わせることによって、この決定を達成することも可能である。対照および疾患試料両方と、既知の量のCD148タンパク質への抗体の結合を比較することによって、標準的複合体形成の量を定量化することも可能である。次いで、正常試料から得た標準値を、疾患によって潜在的に影響を受けた被験者由来の試料から得た値と比較することも可能である。標準値および被験者の値の間の逸脱は、疾患状態でCD148が役割を果たしていることを示唆する。

#### 【0270】

診断適用のため、特定の態様において、典型的には、本発明の抗体またはその抗原結合性領域を、検出可能部分で標識する。検出可能部分は、直接または間接的のいずれかで検出可能シグナルを産生可能ないかなるものであることも可能である。例えば、検出可能部分は、放射性同位体、例えば<sup>3</sup>H、<sup>4</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、または<sup>125</sup>I、蛍光または化学発光化合物、例えばフルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン；あるいは酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、または西洋ワサビ(horseradish)ペルオキシダーゼであることも可能である。Bayerら, Meth. Enz., 184:138-163, (1990)。

#### 【0271】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、この実施例をさらなる限定と解釈してはならない。本出願全体に引用したすべての図およびすべての参考文献、特許およ

10

20

30

40

50

び公開特許出願の内容は、本明細書に明確に援用される。

【実施例】

【0272】

(実施例1)

CD148エピトープに対する抗体の生成

以下のスクリーニング法を用いて、本発明の抗体の重鎖および軽鎖領域の親型を同定した。huCD148タンパク質ターゲットに対して、Cambridge Antibody Technologies (CAT)の組換えscFv(一本鎖可変断片)ファージディスプレイライブラリーを*in vitro*で調べた(*interrogated*)。10,000を超えるクローンをスクリーニングして、ファージディスプレイによって回収し(第2周期および第3周期のアウトプット)、そしてhuCD148に特異的に結合する、250を超えるユニークなscFv抗体を同定した。予測される療法的潜在能力に基づいて、さらなる研究のために、これらの試薬のうち83を統合した(*consolidated*)。例えば、競合的ELISAまたはTRF(時間分解蛍光)レポートによって測定されるように、N24と同じエピトープへの結合に関して競合する、いくつかの抗体を単離した。ELISAまたはTRF(例えばストレプトアビジン結合に比較した、ターゲット結合)によって示される、シグナル対ノイズ比が相対的に高いことに基づいて、またはネズミCD148オルソログに交差反応するため、他の抗体を統合した。muCD148と交差反応する能力(*in vivo*マウス研究のため)および細胞で発現されたhuCD148に結合する能力に関して、すべての抗CD148抗体を試験した。IgG4、マキシボディ(二価scFv-Fc)のいずれかまたはその両方として、N24と競合する度合いが相対的に最も高かった8つのscFvヒトN24類似体抗体、並びに7つの他のクローンを発現させ、そして結合活性および特異性を確かめた。元来のマウスN24抗体をクローニングし、そしてV<sub>H</sub>遺伝子およびV<sub>L</sub>遺伝子を、多様な抗体「プラットフォーム」にサブクローニングして、比較結合(すなわちELISAまたはFACS)および機能性*in vitro*および*in vivo*アッセイにおける陽性対照として使用した。最初の「トップ14」リード候補抗体の一次機能スクリーニングを完了した。これらのクローンのうち8つが、*in vitro*平面遊走アッセイにおいて、huCD148をアゴナイズする。さらに、muCD148に交差反応するこれらのリード・クローンのうち4つが、*in vivo*マウス角膜ポケットアッセイにおいて、FGF-2誘導性血管形成を阻害する。図1~8に記載する8つの抗体は、ヒト内皮細胞遊走アッセイおよび角膜ポケットアッセイの両方において、血管形成を阻害することが可能であり、20μg/mlの濃度で、*in vitro*で、対照に比較した際、少なくとも20%の能力があった。

【0273】

上述の方法にしたがって生成した抗体を図1~8に記載する。図1Aおよび1Bは、本発明の抗体、抗体第1番(Ab-1)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。クエリーおよびフレーム1の指定は、それぞれ、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【0274】

図2Aおよび2Bは、抗体第2番(Ab-2)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【0275】

図3Aおよび3Bは、抗体第3番(Ab-3)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【0276】

図4Aおよび4Bは、抗体第4番(Ab-4)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(V

L) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR 1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【0277】

図5Aおよび5Bは、抗体第5番(Ab-5)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR 1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【0278】

図6Aおよび6Bは、抗体第6番(Ab-6)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR 1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

10

【0279】

図7Aおよび7Bは、抗体第7番(Ab-7)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR 1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【0280】

図8Aおよび8Bは、抗体第8番(Ab-8)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR 1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【0281】

(実施例2)

20

#### CD148結合エピトープのマッピング

ヒトCD148一次タンパク質配列の外部ドメインに対応する合成ペプチド15量体を合成し、そしてPVD膜上のセクターに共有的にN連結した。多様なペプチド配列の組成物は、3アミノ酸重複した。

【0282】

ペプチド含有膜をMeOHと10分間ブレインキュベーションし、PBSTで3回洗浄し、そしてPBST中、4%ミルクと一晚インキュベーションした。PBSTで3回洗浄した後、4%ミルク中で希釈した1μM抗CD148抗体と膜を3時間インキュベーションした。膜を再び3回洗浄し、そして次いで、抗ヒトFc-HRPまたは抗マウスFc-HRP(Jackson)のいずれかと1時間インキュベーションした。PBSTで3回

30

洗浄した後、PierceのSuper Signalキットを用いて、結合を検出した。

【0283】

ペプチド含有膜を直ちに水で2回(1回の使用後)洗浄し、そして次いでDMFと一晚インキュベーションすることによって、新たな実験のために、該膜を再生した。水で2回洗浄した後、再生緩衝液A(1%SDS、0.1%β-メルカプトエタノール、8M尿素)で数時間洗浄し、次いで、再生緩衝液B(50%EtOH、10%酢酸)で2回洗浄した。二次抗体のみを用いて、膜を染色し、そして発色させることによって、再生工程の効率を検証した。再生プロセスが完了した後、膜をMeOHでリンスし、乾燥させ、そして-20℃中で保存した。

40

【0284】

上述の方法にしたがって、ペプチド含有膜に対する、Ab-1、Ab-2、Ab-3、およびAb-5、ネズミ抗CD-148抗体、並びに抗CD148抗体143-41(Biosource)の結合を試験し、以下の結果を得た：

ネズミ抗体は、共通のエピトープQSRDTE(残基324~329)を有する、膜#1中のペプチド114~117および膜#2中の90~93に結合した(114および90:GPVDPSSGQQSRDTE(残基315~329)、115および91:DPSSGQQSRDTEVLL(残基318~332)、116および92:SGQQSRDTEVLLVGL(残基321~335)、117および93:QSRDTEVLLVGL(残基324~338))。該ネズミ抗体はまた、オクタペプチドQSRDTE

50

E V L L (残基 3 2 4 ~ 3 3 2) にも結合した。

【0285】

A b - 1 は、共通のエピトープ Q S R D T E V L L V G L (残基 3 2 4 ~ 3 3 5) を有する、膜 # 1 中のペプチド 1 1 6 および 1 1 7、並びに膜 # 2 中のペプチド 9 2 および 9 3 に結合した (1 1 6 および 9 2 : S G Q Q S R D T E V L L V G L (残基 3 2 1 ~ 3 3 5)、1 1 7 および 9 3 : Q S R D T E V L L V G L E P G (残基 3 2 4 ~ 3 3 8)) が、オクタペプチド Q S R D T E V L (残基 3 2 4 ~ 3 3 1) には結合しなかった。試験した他の抗 C D 1 4 8 抗体はいずれも、これらのペプチド含有膜への結合の証拠を示さなかった。したがって、A b - 1 抗体は、ヒト C D 1 4 8 のアミノ酸残基 3 2 4 ~ 3 3 8 および 3 2 1 ~ 3 3 5 の配列を有するペプチドに結合するが、アミノ酸残基 3 2 4 ~ 3 3 1 の配列を有するオクタペプチドには結合しない。

10

【0286】

ペプチドマッピング結果に基づいて、ネズミ抗 C D 1 4 8 抗体の最低限必要なエピトープを、6 アミノ酸 Q S R D T E (残基 3 2 4 ~ 3 2 9) まで狭めた。A b - 1 の最小限必要なエピトープもまた、1 2 アミノ酸 Q S R D T E V L L V G L (残基 3 2 4 ~ 3 3 5) であることも決定された。試験した他の抗 C D 1 4 8 抗体はいずれも、ペプチド含有膜に対する結合を示さなかったため、これらの抗体のエピトープは構造依存性であると決定された。

【0287】

(実施例 3)

F L A G、ポリ - ヒスチジンおよび F c 融合タンパク質の構築およびアッセイ

I g K リーダー配列および F l a g ポリヒスチジン・タグ融合体の両方が N 末端に隣接している p 4 1 2 哺乳動物発現ベクターに、以下の構築物をサブクローニングした：h u C D 1 4 8 - E C T O (残基 3 6 ~ 9 7 3) ; h u C D 1 4 8 - N F n I I I (残基 3 6 ~ 2 1 0) ; h u C D 1 4 8 - F n I I I 2 \_ 3 (残基 1 7 5 ~ 5 3 6) ; h u C D 1 4 8 - F n I I I 4 \_ 5 (残基 5 3 3 ~ 7 2 5) ; h u C D 1 4 8 - C t e r m : (残基 7 1 5 ~ 9 7 3)。これらのクローンを C O S P K B (E 5) 細胞に一過性トランスフェクションし、そして I M A C カラムを用いて精製した。

20

【0288】

2 つの異なる E L I S A 法を用いて、異なる抗 C D 1 4 8 抗体の結合を試験した。第一の方法は、N i - N T A プレート上の直接 E L I S A である。N i - N T A プレート (I n v i t r o g e n) を、P B S 中の 3 % B S A 中、4 つの希釈 (1 : 1 0 ~ 1 : 1 0 , 0 0 0) の 5 つのタンパク質でコーティングし、そして 4 で一晩インキュベーションした。プレートを P B S T で洗浄し、そして 1 μ g / m l の A b - 2 - h u I g G 4、A b - 5 - h u I g G 4、ネズミ抗 C D 1 4 8 抗体、および 1 4 3 - 4 1 (B i o s o u r c e) と、室温で 2 時間インキュベーションした。さらに洗浄した後、プレートを抗 h u - I g G 4 - H R P (Z y m e d) または抗マウス F c - H R P (J a c k s o n) と室温で 1 時間インキュベーションした。次いで、再び洗浄し、そして 1 0 m g の A B T S (A m e r s h a m) 1 0 0 μ l とともに、4 5 m l の 0 . 0 5 M クエン酸 p H 4 . 0 および 7 7 μ l の 3 0 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> を添加することによって、発色させた。

30

40

【0289】

第二の方法は、間接的 E L I S A である。M a x i s o r p プレートを、5 μ g / m l の抗 h u F c または抗 m u F c (J a c k s o n) で、4 で一晩コーティングした。プレートを P B S T で洗浄し、そして P B S 中の 3 % B S A で 1 . 5 時間ブロッキングした。さらに洗浄した後、プレートを 5 μ g / m l の A b - 2 - h u I g G 4、A b - 5 - h u I g G 4、ネズミ抗 C D 1 4 8 抗体、および 1 4 3 - 4 1 (B i o s o u r c e) と室温で 2 時間インキュベーションした。プレートを再び洗浄し、そして 2 希釈 (1 : 1 0、1 : 1 0 0) の 5 つのタンパク質と室温で 2 時間インキュベーションし、再び洗浄し、そして抗 F L A G M 2 - H R P (S i g m a) と室温で 1 時間インキュベーションした。

【0290】

50

予期されるように、ペプチドマッピングに基づいて、ネズミ抗CD148抗体は、huCD148-FnIII2\_3タンパク質(残基175~536)に結合した。商業的143-41抗体(Biosource)は、huCD148-NFnIIIタンパク質(残基36~210)に結合する。さらに、Ab-5は、huCD148-FnIII4\_5タンパク質(残基533~725)およびhuCD148-Ctermタンパク質(残基715~973)の両方に結合する。

#### 【0291】

この精製法を用いたタンパク質の収率は、非常に低かったため、FLAGポリHisタグをFcタグのものに変えた。該構築物をCHO PBK E5細胞に再びトランスフェクションし、プロテインAカラムを用いて精製し、そして別のELISA法によって、抗CD148抗体の結合を試験した。Maxisorpプレートを5µg/mlの抗huFc(Jackson)で、4で一晩コーティングし、洗浄し、そしてPBS中の3%ミルクで1.5時間ブロッキングした。プレートを再び洗浄し、そして5µg/mlの異なるCD148-Fc構築物と室温で2時間インキュベーションした。さらなる洗浄の後、プレートを、1µg/mlのAb-2-huIgG4、Ab-5-huIgG4、Ab-1-huIgG4、ネズミ抗CD148抗体、および143-41(Biosource)と、室温で2時間インキュベーションした。プレートを再び洗浄し、そして抗huIgG4-HRP(Zymed)または抗マウスFc-HRP(Jackson)と室温で1時間インキュベーションした。

#### 【0292】

Flag、ポリHisタグまたはFcタグのいずれかを含む5つのCD148構築物を293E5細胞中で一過性に発現し、そしてそれぞれ、IMACカラムまたはプロテインAカラムを用いて、これらの構築物を精製した。方法に記載するように、ELISAによって、異なる構築物への抗CD148クローンの結合を試験した。ヒト抗CD148クローン、Ab-5は、Flag、ポリ-Hisタグ構築物を用いた場合は、FnIII4\_5(残基533~725)片およびC末端片(残基715~973)の両方に結合し、そしてFcタグ構築物を用いた場合は、FnIII4\_5(残基533~725)に結合した。Ab-5はまた、どちらのタグを用いた場合も、全長ECTODメインタンパク質(残基36~973)にも結合する。ヒト抗CD-148クローン、Ab-2は、どちらのタグを用いた場合も、全長ECTODメインタンパク質(残基36~973)への結合を示し、そしてFcタグを用いた場合、FnIII4\_5(残基533~725)への低レベルの結合を示したが、他の3つの構築物のいずれにも、まったく結合を示さなかった。ヒト抗CD148クローン、Ab-1は、Fc構築物を伴うELISAでのみ用いた。該クローンは、FnIII2\_3片(残基175~536)にのみ結合した。商業的ネズミ抗CD148 143-41(Biosource)は、すべてのアッセイにおいて、全長ECTODメインタンパク質(残基36~973)およびNFnIII片(残基36~210)に結合したが、他の3つの構築物のいずれにも結合しなかった。ネズミ抗CD148抗体は残基324~332のオクタペプチドを認識することが知られるため、すべてのアッセイにおいて、該抗体を陽性対照として用いた。ネズミ抗CD148抗体は、すべてのアッセイにおいて、Fcタグを用いた場合、FnIII2\_3片(残基175~536)および全長ECTODメインタンパク質(残基36~973)を認識した。

#### 【0293】

3つのELISAを組み合わせた結果に基づいて、商業的ネズミ抗CD148 143-41(Biosource)抗体は、残基36~210に位置する構造依存性のエピトープを認識すると結論付けられた。Ab-5は、FnIII4\_5(残基533~725)片およびC末端片(残基715~973)の両方を認識した。これらの種は、その間に11AAの重複を有する。したがって、これらの11AAは、Ab-5結合に必要である可能性もある。

#### 【0294】

(実施例4)

10

20

30

40

50

### アビジン融合タンパク質の構築およびアッセイ

以下の構築物を pCep4 - アビジン - Nベクターにサブクローニングした: huCD148 - NFnIII (残基36 ~ 210); huCD148 - FnIII2\_3 (残基36 ~ 536); huCD148 - FnIII4\_5 (2) (残基36 ~ 715); huCD148 - FnIII4\_5 (残基36 ~ 725); huCD148 - ECTO (残基36 ~ 973); huCD148FnIII2\_3\_4\_5 (残基200 ~ 725); huCD148FnIII3\_4\_5 (残基447 ~ 725); huCD148 - FnIII4\_5 (only) (残基533 ~ 725); huCD148 - FnIII\_5 (残基616 ~ 725); huCD148 - FnIII\_5.5 (残基672 ~ 725)。

#### 【0295】

製造供給者のプロトコルにしたがって、リポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いて、293T細胞に、すべてのアビジン発現構築物をトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後、馴化培地を収集し、そしてビオチンビーズ (Spherotech Inc) を用いてアビジン融合性タンパク質のレベルを測定した。各構築物あたり5 µlのビーズを用いた。3% BSAと室温で30分間インキュベーションすることによって、ビーズをあらかじめブロッキングし、PBS中の0.2% BSAを用いて1回洗浄し、そして次いで200 µlの各馴化培地に添加し、さらに1時間インキュベーションした。2回の洗浄後、1 µg/mlの抗アビジン - FITC (Vector) を添加して30分間インキュベーションし、次いでビーズを再び洗浄し、500 µlの洗浄緩衝液に再懸濁し、そしてFACSを用いて読み取った。発現レベル結果に基づいて、結合アッセイで使用する、馴化培地の量を決定した。結合アッセイのためのプロトコルは、抗アビジン - FITCの代わりに1 µg/mlのFITC標識抗CD148 Ab - 2およびAb - 5を添加したことを除いて、上述の通りである。このアッセイの変型には、非標識抗体が、評価しようとするFITC標識抗体の結合に有効に競合する/その結合を防止することが可能であるかどうかを決定するため、目的のFITC標識抗体、並びに50倍過剰の非標識抗体の両方と、アビジン融合体タンパク質の同時インキュベーションが含まれる。この競合アッセイを用いて、抗体いずれかが、別のものと同じエピトープ空間への結合に関して、競合可能であるかどうかを決定したし、そして決定可能である。

#### 【0296】

Ab - 2およびAb - 5はどちらも、全長huCD148 - ECTO (残基36 ~ 973) およびhuCD148 - FnIII4\_5 (残基36 ~ 725) 構築物を認識した。しかし、これらの抗体のいずれも、huCD148 - NFnIII (残基36 ~ 210)、huCD148 - FnIII2\_3 (残基36 ~ 536) およびhuCD148 - FnIII4\_5 (2) (残基36 ~ 715) 構築物に結合しない。Ab - 5はまた、huCD148FnIII2\_3\_4\_5 (残基200 ~ 725); huCD148FnIII3\_4\_5 (残基447 ~ 725) およびhuCD148 - FnIII4\_5 (only) (残基533 ~ 725) 構築物にも結合するが、huCD148 - FnIII\_5 (残基616 ~ 725) およびhuCD148 - FnIII\_5.5 (残基672 ~ 725) 構築物には結合しなかった。Ab - 2は、huCD148FnIII2\_3\_4\_5 (残基200 ~ 725); huCD148FnIII3\_4\_5 (残基447 ~ 725) 構築物に結合したが、huCD148 - FnIII4\_5 (only) (残基533 ~ 725)、huCD148 - FnIII\_5 (残基616 ~ 725) およびhuCD148 - FnIII\_5.5 (残基672 ~ 725) 構築物には結合しなかった。

#### 【0297】

競合アッセイにおいて、Ab - 2は、huCD148 - ECTO構築物およびFnIII4\_5構築物の両方への、Ab - 5の結合を完全に阻害することが可能であった。Ab - 5は、huCD148 - ECTOへのAb - 2の結合に完全に競合することが可能であったが、huCD148 - FnIII4\_5構築物へのAb - 2の結合を部分的にしか阻害しない。

#### 【0298】

10

20

30

40

50



Ab - 2およびAb - 5はどちらも、全長huCD148-ECTO(残基36~973)およびhuCD148-FnIII4\_5(残基36~725)構築物に結合するが、huCD148-FnIII4\_5(残基36~725)構築物と、C末端の11AAのみが異なるhuCD148-FnIII4\_5(2)(残基36~715)構築物には結合せず、そしてこれらの抗体のいずれも、我々のペプチド結合膜中のいかなるペプチドも認識しないため、これらの抗体の結合には、残基715~725中の11AAが必要であるが、この11AAは結合に十分ではないと結論付けられた。構築物huCD148FnIII2\_3\_4\_5(残基200~725)、huCD148FnIII3\_4\_5(残基447~725)、huCD148-FnIII4\_5(only)(残基533~725)、huCD148-FnIII\_5(残基616~725)およびhuCD148-FnIII\_5.5(残基672~725)へのこれらの抗体の結合結果に基づいて、Ab - 5の最小結合性領域は、残基533~725であり、そしてAb - 2の最小結合性領域は、残基447~725であることが決定された。

【0299】

(実施例5)

#### 平面遊走アッセイにおける抗CD148抗体の抗血管形成活性

本明細書に完全に援用される、米国特許第6,248,327号に実質的に記載されるように、平面内皮細胞遊走(創傷閉鎖)アッセイを用いて、図1~8に開示するすべての抗体による、*in vitro*血管形成の阻害を定量化した。このアッセイでは、内皮細胞遊走を、培養細胞単層における環状創傷の閉鎖速度として測定する。創傷閉鎖速度は線形であり、そして*in vivo*で血管形成を刺激する剤および阻害する剤によって、動的に制御される。

【0300】

Martinら, *In Vitro Cell Dev Biol* 33:261, 1997に記載されるように、初代ヒト腎臓微小血管内皮細胞、HRMECを単離し、培養し、そして融解後、第三継代で用いる。集密HRMEC単層に、シリコンチップドリルプレスを用いて、複製環状損傷、「創傷」(直径600~800ミクロン)を生成する。創傷を加えた時点で、培地(DMEM+1%BSA)に、20ng/ml PMA(ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート)を、単独で、あるいは5~50μg/mlの対照またはAb - 1~Ab - 8の存在下で補う。顕微鏡および画像分析ソフトウェア(Bioquant、テネシー州ナッシュビル)を用いて、時間(0~12時間)の関数として、残った創傷面積を測定する。時間に渡ってプロットした、残りの創傷面積の直線回帰によって、各剤および剤の組み合わせに関して、相対遊走速度を計算する。

【0301】

Ab - 1、Ab - 2、Ab - 3、Ab - 4、Ab - 5、Ab - 6、Ab - 7およびAb - 8は各々、用量反応性方式で、PMAが誘導する内皮細胞の遊走を阻害し、15~50μg/mlの範囲で、遊走速度を非刺激レベルまで有意に減少させた。

【0302】

(実施例6)

#### 角膜ポケットアッセイにおける抗CD148抗体の抗血管形成活性

実質的に米国特許第6,248,327号に記載されるように、マウス角膜ポケットアッセイにおいて、本発明の抗体が、*in vivo*で血管形成を阻害する能力を測定した。このアッセイでは、血管形成または抗血管形成活性に関して試験しようとする剤を、ハイドロソール・ペレット中の緩慢放出型で固定し、これを麻酔したマウスの角膜上皮中に生成したマイクロポケットに移植する。血管新生角膜縁から、通常は無血管の角膜への、血管内部成長の出現、密度、および度合いとして、血管新生を測定する。

【0303】

ポリビニルアルコールスポンジペレットは、FGF-2(50ng/ペレット)、bFGFおよびIgG(12μg/ペレット、対照)、またはbFGFおよびAb - 1~8(12μg/ペレット)を含有する。6~8週齢のオスC57BL/6マウスの外側(1a

teral) 角膜縁に対し内側 (medial) に 1mm 微小切開することによって生成した角膜支質 (stromal) マイクロポケット中に、ペレットを移植した。6 ~ 8 週齢のオス C57BL/6 マウスの外側角膜縁に対し内側に 1mm 微小切開することによって生成した角膜支質マイクロポケット中に、ペレットを移植する。5 日後、FGF-2 に対する新血管新生反応のピーク時に、MZ9.5 実体顕微鏡 (Leica) を用い、ペレットを含有する経線の極軸から 35 ~ 50° の初期角度で、角膜の写真を撮影する。画像をデジタル化し、そして減色フィルター (subtractive color filters) (Adobe Photoshop 4.0) によりプロセッシングして、確立された微小血管の輪郭を、ヘモグロビン含量によって描く。画像分析ソフトウェア (Bioquant、テネシー州ナッシュビル) を用い、血管新生された角膜画像の割合、血管新生された領域内の血管密度、および角膜全体の血管密度を計算する。

10

## 【0304】

Ab-2、Ab-4、Ab-5、および Ab-7 は、bFGF が誘導する角膜血管形成を阻害し、血管密度を、FGF 単独で誘導されるものより低く、有意に減少させた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0305】

【図1-1】図1Aおよび1Bは、本発明の抗体、抗体第1番 (Ab-1) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。クエリーおよびフレーム1の指定は、それぞれ、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

20

【図1-2】図1Aおよび1Bは、本発明の抗体、抗体第1番 (Ab-1) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。クエリーおよびフレーム1の指定は、それぞれ、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【図2-1】図2Aおよび2Bは、抗体第2番 (Ab-2) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

30

【図2-2】図2Aおよび2Bは、抗体第2番 (Ab-2) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【図3-1】図3Aおよび3Bは、抗体第3番 (Ab-3) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【図3-2】図3Aおよび3Bは、抗体第3番 (Ab-3) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

40

【図4-1】図4Aおよび4Bは、抗体第4番 (Ab-4) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

【図4-2】図4Aおよび4Bは、抗体第4番 (Ab-4) の可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3 (それぞれアミノ末端からカルボキシ末端) を強調する。

50

【図5-1】図5Aおよび5Bは、抗体第5番(Ab-5)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【図5-2】図5Aおよび5Bは、抗体第5番(Ab-5)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【図6-1】図6Aおよび6Bは、抗体第6番(Ab-6)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

10

【図6-2】図6Aおよび6Bは、抗体第6番(Ab-6)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【図7-1】図7Aおよび7Bは、抗体第7番(Ab-7)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

20

【図7-2】図7Aおよび7Bは、抗体第7番(Ab-7)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【図8-1】図8Aおよび8Bは、抗体第8番(Ab-8)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

【図8-2】図8Aおよび8Bは、抗体第8番(Ab-8)の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)のヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸の配列重複を示す。図上の陰をつけた領域は、CDR1、2、および3(それぞれアミノ末端からカルボキシ末端)を強調する。

30

【 図 1 - 1 】

図 1 A  
Ab-1 VH ドメイン

```

-----|-----|-----|-----|-----|
10      20      30      40      50      60
クエリー : GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
フレーム1 : E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L

-----|-----|-----|-----|-----|
70      80      90      100     110     120
クエリー : TCCTGTGCAGCCTCTGSAITCACCTTTAGCTGGGTCGGCCAGGCT
フレーム1 : S C A A S G F T F S W V R Q A

-----|-----|-----|-----|-----|
20      130     140     150     160     170     180
クエリー : CCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA
フレーム1 : P G K G L E W V S

-----|-----|-----|-----|-----|
80      190     200     210     220     230     240
クエリー : CGGTTCCACATCTCCAGAGACATCCAAGAACACGCTGTAT
フレーム1 : R F T I S R D N S K N T L Y

-----|-----|-----|-----|-----|
40      250     260     270     280     290     300
クエリー : CTGCAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGA
フレーム1 : L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R

-----|-----|-----|-----|-----|
310     320     330     340     350     360
クエリー : TGGGGCAAGGGCAATGGTACCCTCTCGAGT
フレーム1 : W G Q G T M V T V S S

-----|-----|-----|-----|-----|
60
クエリー : TCGAGT
フレーム1 : S S

```

【 図 1 - 2 】

図 1 B  
Ab-1 VL ドメイン

```

-----|-----|-----|-----|-----|
10      20      30      40      50      60
クエリー : CAGGCTGTGCTACTCAGCCGCTCAGTGTCTGGGGCCCAAGGGCAGGSGGTACCAATC
フレーム1 : Q A V L T Q P S S V S G A P G Q R V T I

-----|-----|-----|-----|-----|
70      80      90      100     110     120
クエリー : TCCTGC
フレーム1 : S C W Y Q Q

-----|-----|-----|-----|-----|
20      130     140     150     160     170     180
クエリー : CTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTAT
フレーム1 : L P G T A P K L L I Y G V

-----|-----|-----|-----|-----|
80      190     200     210     220     230     240
クエリー : CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCGCTACTGGGCTC
フレーム1 : P D R F S G S K S G T S A S L A V T G L

-----|-----|-----|-----|-----|
40      250     260     270     280     290     300
クエリー : CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTG
フレーム1 : Q A E D E A D Y Y C

-----|-----|-----|-----|-----|
310     320     330
クエリー : TCGGGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTA
フレーム1 : F G G G T K L T V L

```

【 図 2 - 1 】

図 2 A  
Ab-2 VH ドメイン

```

-----|-----|-----|-----|-----|
10      20      30      40      50      60
クエリー : GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
フレーム1 : E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L

-----|-----|-----|-----|-----|
70      80      90      100     110     120
クエリー : TCCTGTGCAGCCTCTGSAITCACCTTTAGCTGGGTCGGCCAGGCT
フレーム1 : S C A A S G F T F S W V R Q A

-----|-----|-----|-----|-----|
20      130     140     150     160     170     180
クエリー : CCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA
フレーム1 : P G K G L E W V S

-----|-----|-----|-----|-----|
80      190     200     210     220     230     240
クエリー : CGGTTCCACATCTCCAGAGACATCCAAGAACACGCTGTAT
フレーム1 : R F T I S R D N S K N T L Y

-----|-----|-----|-----|-----|
40      250     260     270     280     290     300
クエリー : CTGCAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGA
フレーム1 : L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R

-----|-----|-----|-----|-----|
310     320     330     340     350     360
クエリー : TGGGGCAAGGGCAATGGTACCCTCTCGAGT
フレーム1 : W G Q G T T V T V

-----|-----|-----|-----|-----|
60
クエリー : TCGAGT
フレーム1 : S S

```

【 図 2 - 2 】

図 2 B  
Ab-2 VL ドメイン

```

-----|-----|-----|-----|-----|
10      20      30      40      50      60
クエリー : GAAATGTGATGACGAGTCTCCGCTCCCTGCTGCTGAGGAGACAGAGTCACC
フレーム1 : E I V M T Q S P S S L P A S V G D R V T

-----|-----|-----|-----|-----|
70      80      90      100     110     120
クエリー : ATCACTGT
フレーム1 : I T C W Y Q Q K P

-----|-----|-----|-----|-----|
20      130     140     150     160     170     180
クエリー : GGGGAGCCCTAACCTCCTGATCTAT
フレーム1 : G K A P N L L I Y G V P S

-----|-----|-----|-----|-----|
80      190     200     210     220     230     240
クエリー : AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
フレーム1 : R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

-----|-----|-----|-----|-----|
40      250     260     270     280     290     300
クエリー : GAAGATTTGCTACTTCTGT
フレーム1 : E D F A T Y F C TCGGGCAA F G Q

-----|-----|-----|-----|-----|
310     320
クエリー : GGGACAGACTGGAGATTA
フレーム1 : G T R L E I K

```

【 図 3 - 1 】

図 3 A  
Ab-3 VH ドメイン

```

      10      20      30      40      50      60
クエリー : GGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGARGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGTT
フレーム1 : G V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V

      70      80      90      100     110     120
クエリー : TCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACC[REDACTED]TGGGTGGACAGGCC
フレーム1 : S C K A S G Y T F T [REDACTED] W V R Q A

      130     140     150     160     170     180
クエリー : CCTGGACAAGGCTTGGATGGATGGGA[REDACTED]
フレーム1 : P G Q G L E W M G [REDACTED]

      190     200     210     220     230     240
クエリー : [REDACTED]AGAGTCCACATGACCAGGGACAGTCCACGACACAGTCTAC
フレーム1 : [REDACTED] R V T M T R D T S T S T V Y

      250     260     270     280     290     300
クエリー : ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCTAGA[REDACTED]
フレーム1 : M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R [REDACTED]

      310     320     330     340     350     354
クエリー : [REDACTED]GGGGCCAGGGGACAAATGCTCACCGTCTCGAGT
フレーム1 : [REDACTED] W G Q G T M V T V S S

```

【 図 3 - 2 】

図 3 B  
Ab-3 VL ドメイン

```

      10      20      30      40      50      60
クエリー : GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCACCCCTGTCTGCATCTATTGGAGACAGATCACC
フレーム1 : D I Q M T Q S P S T L S A S I G D R V T

      70      80      90      100     110     120
クエリー : ATCACCTGCGG[REDACTED]TGGTATCAGCAGAAGCCA
フレーム1 : I T C [REDACTED] W Y Q Q K P

      130     140     150     160     170     180
クエリー : GGGAAAGCCCTAAACTCCATGATCTAT[REDACTED]GGGCCCCATCA
フレーム1 : G K A P K L L I Y [REDACTED] G A P S

      190     200     210     220     230     240
クエリー : AGGTTACGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACCTCCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
フレーム1 : R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

      250     260     270     280     290     300
クエリー : GATGATTTGCAACTTATTACTGCG[REDACTED]TTGGCGGA
フレーム1 : D D F A T Y Y C [REDACTED] F G G

      310     320     321
クエリー : GGGACCAAGCTGGAGATCAAA
フレーム1 : G T K L E I K

```

【 図 4 - 1 】

図 4 A  
Ab-4 VH ドメイン

```

      10      20      30      40      50      60
クエリー : CAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGTT
フレーム1 : Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V

      70      80      90      100     110     120
クエリー : TCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACC[REDACTED]TGGGTGGACAGGCC
フレーム1 : S C K A S G Y T F T [REDACTED] W V R Q A

      130     140     150     160     170     180
クエリー : CCTGGACAAGGCTTGGATGGATGGGA[REDACTED]
フレーム1 : P G Q G L E W M G [REDACTED]

      190     200     210     220     230     240
クエリー : [REDACTED]AGAGTCCACATGACCAGGGACAGTCCACGACACAGTCTAC
フレーム1 : [REDACTED] R V T M T R D T S T S T V Y

      250     260     270     280     290     300
クエリー : ATGGAGTGGACAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATTTCTGTGGGAGA[REDACTED]
フレーム1 : M E L S S L R S E D T A V Y F C A R [REDACTED]

      310     320     330     340     350     360
クエリー : [REDACTED]GGGGCAAGGGACAAATGGTCACC
フレーム1 : [REDACTED] W G K G T M V T

      369
クエリー : GTCTCTCA
フレーム1 : V S S

```

【 図 4 - 2 】

図 4 B  
Ab-4 VL ドメイン

```

      10      20      30      40      50      60
クエリー : TCGTCTGAGTGACTCAGGACCCCTGCTGTGCTGTGGCCTGGGACAGACAGTCAAGATC
フレーム1 : S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I

      70      80      90      100     110     120
クエリー : ACTTGC[REDACTED]TGGTCCAGCAGAAGCAGGA
フレーム1 : T C [REDACTED] W F Q Q K P G

      130     140     150     160     170     180
クエリー : CAGGCCCTCTACTTGTGCTAT[REDACTED]GGGATCCCGACCGA
フレーム1 : Q A P L L V V Y [REDACTED] G I P D R

      190     200     210     220     230     240
クエリー : TTCTGGCTCCAGCTCGGAAACACAGTTCCTTCACCATCACTGGGCTCAGGCGAA
フレーム1 : F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E

      250     260     270     280     290     300
クエリー : GATAGGCTGACTATTACTGT[REDACTED]TTGGC
フレーム1 : D E A D Y Y C [REDACTED] F G

      310     320     324
クエリー : GGAGGACCAAGCTGACCCCTCA
フレーム1 : G G T K L T V L

```





【配列表】

2007534694000001.xml



## 【 国際調査報告 】

60700560039



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/14084

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(8): C07K 16/00( 2006.01)		
USPC: 530/350,387.1,435/6,21;514/548		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 387.1, 435/6, 21; 514/548		
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 practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PGPUB 20050172054 (CARGILL et al) 26 November 2003 (26/11/2003), Abstract and brief description of his invention.	1-37
Y	PGPUB 20040161821 (Palka-Hambinn et al 26 November 2003 (26/11/2003), Abstract and brief description in particular	1-37
Y	PGPUB 20030215899 (MENG et al) 12 February 2003 (12.02.2003), Abstract and brief description in particular.	1-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 December 2006 (18.12.2006)		Date of mailing of the international search report 26 FEB 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Am: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Paritosh K. Tunganna Telephone No. (571) 272-0600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

20. 8. 2007

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 17/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P	27/02	
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P	17/06	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10	1 0 1
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P	29/00	
<b>A 6 1 P 11/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P	29/00	1 0 1
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	19/02	
<b>A 6 1 P 15/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	11/06	
<b>A 6 1 P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P	9/00	
<b>A 0 1 K 67/027 (2006.01)</b>	A 6 1 P	15/00	
<b>C 0 7 K 14/705 (2006.01)</b>	A 6 1 P	35/04	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	A 0 1 K	67/027	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C 0 7 K	14/705	
	C 1 2 N	5/00	B
	G 0 1 N	33/53	D

(31)優先権主張番号 60/585,686

(32)優先日 平成16年7月6日(2004.7.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100128750

弁理士 福所 しのぶ

(72)発明者 ファンスロー, ウィリアム・シー, ザ・サード

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 6 6, ノーマンディ・パーク, サウスウエスト・ワンハンドレッドナインティセブンス・ストリート 4 0 4

(72)発明者 カリブ, レヴァイタル

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 0 0 8, ベルヴー, ノースイースト・1 8・ストリート 1 6 6 1 3

(72)発明者 スモサーズ, ジェームズ・エフ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 5 5, レーク・フォレスト・パーク, フォーティース・ブレース・ノースイースト 1 9 7 0 1

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA93Y AB01 AB04 AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44  
CA46  
4C085 AA14 BB36 BB41 BB43 BB44 CC02 CC23 DD21 DD62 EE01  
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA23 EA28 EA50  
FA72 FA74

专利名称(译)	CD148的血管生成抑制结构域的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007534694A</a>	公开(公告)日	2007-11-29
申请号	JP2007509713	申请日	2005-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ファンスローウィリアムシーザサード カリブレヴァイタル スモサーズジェームズエフ		
发明人	ファンスロー,ウィリアム・シー,ザ・サード カリブ,レヴァイタル スモサーズ,ジェームズ・エフ		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P27/02 A61P17/06 A61P9/10 A61P29/00 A61P19/02 A61P11/06 A61P9/00 A61P15/00 A61P35/04 A01K67/027 C07K14/705 C12N5/10 G01N33/53 C07K16/30		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 C07K16/2896 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2319/30 C12Q1/42 G01N33/56966		
FI分类号	C07K16/28.ZNA A61K39/395.N A61K39/395.T A61P35/00 A61P35/02 A61P27/02 A61P17/06 A61P9/10.101 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P11/06 A61P9/00 A61P15/00 A61P35/04 A01K67/027 C07K14/705 C12N5/00.B G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/564885 2004-04-23 US 60/565158 2004-04-23 US 60/571566 2004-05-14 US 60/585686 2004-07-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

CD148抗体及其抗原结合区，以及包含此类抗体和抗原结合区的药物组合物。还描述了使用此类抗体和抗原结合区结合CD148表位并激活CD148功能，例如血管生成抑制的方法。还描述了鉴定可用于激活CD148功能和抗血管生成活性的表位的方法以及能够结合这些表位的试剂。

Ab-1 YH Domain

```
-----|-----|-----|-----|-----|
           10      20      30      40      50      60
Query : GAGGTGCAGCCTTTGGAGTCTGGCGGAGCTTGGCTACAGCCTGGGCGGTCCTGASACTG
Frame1 : E Y Q L L E S G G G L Y Q P G G S L R L

-----|-----|-----|-----|-----|
           70      80      90      100     110     120
Query : TCTCTGCAGCCCTCTGGATTACCTTACGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGGCTCCGCGAGCT
Frame1 : S C A A S G Y T T S L L P T L L L W V R Q A

-----|-----|-----|-----|-----|
           130     140     150     160     170     180
Query : CCAGGGAGGDEGGCTGGAGTGGCTCTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGGCTCCGCGAGCT
Frame1 : P Q K C L E W V S L L P T L L L W V R Q A

-----|-----|-----|-----|-----|
           190     200     210     220     230     240
Query : GAGGCTGAGGCTGGAGTGGCTCTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGGCTCCGCGAGCT
Frame1 : S C A A S G Y T T S L L P T L L L W V R Q A

-----|-----|-----|-----|-----|
           250     260     270     280     290     300
Query : CTGCAANTGAACACCTCGAGCCGAGGACACGGCCCTGATTACTGTGGGAGGCTGGCTCCGCGAGCT
Frame1 : L Q M N S L R A E D T A Y Y Y V A R R L S

-----|-----|-----|-----|-----|
           310     320     330     340     350     360
Query : GAGGCTGAGGCTGGAGTGGCTCTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGGCTCCGCGAGCT
Frame1 : S C A A S G Y T T S L L P T L L L W V R Q A
```