(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-511993
(P2013-511993A)
(43)公表日　平成25年4月11日(2013.4.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-541221 (P2012-541221)
(86)(22)出願日　平成22年11月29日 (2010.11.29)
(85)翻訳文提出日　平成24年7月25日 (2012.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/058197
(87)国際公開番号　WO2011/066503
(87)国際公開日　平成23年6月3日 (2011.6.3)
(31)優先権主張番号　61/265,262
(32)優先日　平成21年11月30日 (2009.11.30)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/384,467
(32)優先日　平成22年9月20日 (2010.9.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　デニス，　マーク
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍の診断と治療のための組成物と方法

(57)【要約】
本発明は、哺乳動物における腫瘍の診断及び治療に有用な組成物及びこれらの同一の組成物を使用する方法を対象とする。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号２１－３４の何れか一のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３５－３８の何れか一のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号３９－４１の何れか一のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４２－４５の何れか一のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４６－６０の何れか一のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６１－６５の何れか一のＣＤＲ－Ｈ３配列
からなる群より選択された少なくとも一のＣＤＲ配列を含んでなる単離された抗体。
【請求項２】
配列番号６６－７５の何れか一のＶＨアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項３】
配列番号７６－７９の何れか一のＶＬアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項４】
配列番号６６－７５の何れか一のＶＨアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列、及び配列番号７６－７９の何れか一のＶＬアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項５】
抗体断片である、請求項１に記載の抗体。
【請求項６】
キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項７】
増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１に記載の抗体。
【請求項８】
細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１に記載の抗体。
【請求項９】
細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項８に記載の抗体。
【請求項１０】
細胞障害性剤が毒素である、請求項８に記載の抗体。
【請求項１１】
毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群より選択されるものである、請求項１０に記載の抗体。
【請求項１２】
毒素がメイタンシノイドである、請求項１０に記載の抗体。
【請求項１３】
細菌中で生成される、請求項１に記載の抗体。
【請求項１４】
ＣＨＯ細胞中で生成される、請求項１に記載の抗体。
【請求項１５】
結合する細胞の死を誘発する、請求項１に記載の抗体。
【請求項１６】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１７】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１８】
検出可能に標識される、請求項１に記載の抗体。
【請求項１９】

配列番号６－１１に示された何れかのＶＬ配列を含む単離された抗体。
【請求項２０】
配列番号１５－２０に示された何れかのＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２１】
配列番号６のＶＬ配列及び配列番号１５のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２２】
配列番号７のＶＬ配列及び配列番号１６のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２３】
配列番号８のＶＬ配列及び配列番号１７のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２４】
配列番号９のＶＬ配列及び配列番号１８のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２５】
配列番号１０のＶＬ配列及び配列番号１９のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２６】
配列番号１１のＶＬ配列及び配列番号２０のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項２７】
配列番号８０の重鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項２８】
配列番号８１の軽鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項２９】
配列番号８０の重鎖配列及び配列番号８１の軽鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項３０】
請求項１に記載の抗体を産生する細胞
【請求項３１】
請求項１に記載の抗体をコードする単離された核酸。
【請求項３２】
請求項１に記載の抗体である第二の抗体が結合したＴＡＴ２１１抗原性エピトープに結合する第一の抗体を同定する方法であって、該方法が、該第二の抗体のＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合を遮断する該第一の抗体の能力を決定することを含み、該第二の抗体の該ＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合を遮断する該第一の抗体の能力が、等しい抗体濃度で少なくとも４０％であった場合に、該第二の抗体が結合したエピトープへ結合することができる該第一の抗体を示す方法。
【請求項３３】
ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞に、請求項１に記載の抗体を接触させることを含み、該抗体の該ＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合が、該細胞の増殖の阻害を引き起こす方法。
【請求項３４】
前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項３３に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項３３に記載の方法。
【請求項３７】
ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、該方法が、該哺乳動物に対して、請求項１に記載の抗体の治療的有効量を投与することにより、該哺乳動物を効果的に処置することを含む方法。
【請求項３８】
前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
ＴＡＴ２１１タンパク質を含むと疑われる試料中における該タンパク質の存在を決定する方法であって、該方法が、請求項１に記載の抗体に該試料を曝露し、該試料中において該タンパク質に対する該抗体の結合を決定することを含み、該タンパク質への抗体の結合が、該試料中における該タンパク質の存在を示す方法。
【請求項４２】
前記試料が、前記タンパク質を発現すると疑われる細胞を含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
前記抗体が検出可能に標識される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
哺乳動物において腫瘍の存在を診断する方法であって、該方法が、該哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び同じ組織起源の既知の正常細胞のコントロール試料における、ＴＡＴ２１１ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定することを含み、コントロール試料と比較して試験試料における該ＴＡＴ２１１ポリペプチドの発現レベルが高い場合に、試験試料を採取した哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。
【請求項４７】
前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定する工程が、インシツハイブリダイゼーション又はＲＴ－ＰＣＲ分析においてオリゴヌクレオチドを使用することを含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを決定する工程が、免疫組織化学分析又はウエスタンブロット分析において抗体を使用することを含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】
前記腫瘍が卵巣又は肺腫瘍である、請求項４６に記載の方法。
【請求項５０】
前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項５１】
哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、該方法が、該哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料を請求項１に記載の抗体と接触させて、試験試料中での該抗体とＴＡＴ２１１タンパク質との複合体の形成を検出することを含み、複合体の形成が、該哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。
【請求項５２】
前記組織細胞からなる試験試料が、癌性腫瘍を有すると疑われる個体から得られたものである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記癌性腫瘍が卵巣又は肺腫瘍である、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項５１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
関連出願
この出願は、内容を出典明示によりここに援用する２００９年１１月３０日出願の仮出願第６１／２６５２６２号及び２０１０年9月２０日出願の仮出願第６１／３８４４６７号に対して米国特許法第１１９条第（ｅ）項の下の優先権を主張して、米国特許法施行規則１．５３（ｂ）（１）条の下に出願した非仮出願である。
【０００２】
発明の分野
本発明は、哺乳動物における腫瘍の診断と治療に有用な物質の組成物と、同用途のために該物質の組成物を使用する方法に関する。
【０００３】
発明の背景
悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第２の主要な死亡原因である（Boring等，CA Cancel J. Clin. 43:7(1993)）。癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍塊を形成する異常な又は腫瘍形成性の細胞の数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節や遠くの部位に転移と呼ばれる過程を介して広がる悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。
【０００４】
癌の診断及び治療に効果的な細胞標的を発見する試みでは、研究者達は、一又は複数の正常な非癌性細胞と比較し、一又は複数の特定の型の癌細胞の表面に特に発現する膜貫通又はさもなければ膜結合型のポリペプチドの同定を探求してきた。しばしば、このような膜結合ポリペプチドは非癌性細胞の表面と比べて癌細胞の表面により豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの同定は、抗体ベースの治療を介する癌細胞を標的として特異的に破壊する能力を生み出す。この点、抗体ベースの治療が、ある種の癌の治療において非常に効果的であることが証明されていることが留意される。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）（双方共にジェネンテック社，サウス サンフランシスコ，カリフォルニア）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫を治療するのに成功裏に用いられている抗体である。より具体的には、ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮成長因子レセプター２（ＨＥＲ２）プロト-オンコジーンの細胞外ドメインに選択的に結合する組換えＤＮＡ誘導ヒト化モノクローナル抗体である。ＨＥＲ２タンパク質の過剰発現は、２５－３０％の原発性乳癌に観察される。リツキサン（登録商標）は、正常及び悪性Ｂリンパ球の表面に見出されるＣＤ２０抗原に対する遺伝子操作キメラマウス／ヒトモノクローナル抗体である。これら抗体の双方共、ＣＨＯ細胞中で組換え操作によって産生される。
【０００５】
哺乳動物の癌治療は上記のような進歩を見ているが、それぞれ哺乳動物における腫瘍の存在を検出することができ、腫瘍性の細胞増殖を有効に抑制するためのさらなる診断薬及び治療薬に対する需要は依然大きい。従って、本発明の目的は、正常細胞又は他の癌細胞と比較して、１以上の種類の癌細胞に大量に発現する細胞膜随伴ポリペプチドを同定すること、及び、それらポリペプチドとそれらがコードする核酸を使用して哺乳動物の癌の治療的処置及び診断的検出に有用な組成物を生成することである。
【発明の概要】
【０００６】
本明細書において、本出願人は、正常な非癌細胞の一又は複数の型の表面より、癌細胞の一又は複数の型の表面で多く発現される細胞性ポリペプチド（及びそれらのコード核酸又はその断片）の同定を最初に記載する。このようなポリペプチドは、本明細書で腫瘍関

連抗原性標的（Tumor-associated Antigenic Target）ポリペプチド（「ＴＡＴ」ポリペプチド）と呼ばれ、哺乳動物における癌治療及び診断の効果的な標的となることが予想される。

【０００７】

従って、本発明の一実施態様では、本発明は、腫瘍関連抗原性標的ポリペプチド又はその断片（「ＴＡＴ」ポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。

【０００８】

ある態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここで開示されるアミノ酸配列を有する完全長ＴＡＴポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通ＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを含む又は含まないもの、又はここに開示される完全長ＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【０００９】

更なる態様では、本発明は、（ａ）ここで開示されるＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの何れかの完全長コード化領域によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【００１０】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかである、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列と相補的であるＴＡＴポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここで開示されている。従って、ここに記載のＴＡＴポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【００１１】

他の態様では、本発明は、（ａ）ここで開示される完全長アミノ酸配列を有するＴＡＴポリペプチド、ここで開示されるシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示される膜貫通ＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメインで、シグナルペプチドを伴う又は伴わないもの、又はここで開示される完全長ＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列の任意の他の具体的に定まった断片をコードするヌクレオチド配列、又は（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする単離された核酸分子に関する。この点に関して、本発明の実施態様は、例えば、診断用プローブ、ＰＣＲプライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとして有用なハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得る、ここに開示される、完全長ＴＡＴポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖、又は抗ＴＡＴポリペプチド抗体の結合部位を含むポリペプチドを任意にコードし得る完全長ＴＡＴポリペプチドのコード化断片に関する。このような核酸断片は、通常は少なくとも約５のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１－７３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５

０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、又は１０００ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という用語は、表示ヌクレオチド配列長にその表示長の１０％を加えるか又は減じたものを意味する。更に、このような核酸断片は、通常、ＴＡＴポリペプチド又はその相補鎖の完全長コード化配列から得られる連続するヌクレオチドからなる。ＴＡＴポリペプチド又はその相補鎖のコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、よく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用してＴＡＴポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのＴＡＴポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片、又はその相補鎖が新規であるかを決定することによって、常套的に決定しうることが知られている。そのようなＴＡＴポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片の全て、又はその相補鎖がここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるＴＡＴポリペプチド断片、好ましくは抗ＴＡＴ抗体に対する結合部位を含んでなるＴＡＴポリペプチド断片である。

【００１２】

他の実施態様では、本発明は上記において特定した単離された核酸配列の何れかによりコードされる単離されたＴＡＴポリペプチドを提供する。

【００１３】

ある態様では、本発明は、ここに開示される完全長アミノ酸配列を有するＴＡＴポリペプチド、ここに開示されるシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列、ここに開示されるシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通ＴＡＴポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示される核酸配列の任意のもの、又はここに開示される完全長ＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列でその他の具体的に定まった断片によってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＴＡＴポリペプチドに関する。

【００１４】

更なる態様において、本発明は単離されたＴＡＴポリペプチドに関し、本単離されたＴＡＴポリペプチドは、（ａ）本明細書に開示される完全長アミノ酸配列を有するＴＡＴポリペプチド、（ｂ）本明細書に開示されるシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列、（ｃ）シグナルペプチドを有するか又は欠く、本明細書に開示される膜貫通ＴＡＴポリペプチドタンパク質の細胞外ドメイン、（ｄ）本明細書に開示される核酸配列のいずれかによってコードされるアミノ酸配列、又は（ｅ）本明細書に開示される完全長ＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列の、特に規定された他のいずれかの断片、をコードするＤＮＡ分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。

【００１５】

特定の態様では、本発明は、Ｎ末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離されたＴＡＴポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、ＴＡＴポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含有するベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からＴＡＴポリペプチドを回収することを含む。

【００１６】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失したか又は膜貫通ドメインが不活性化している単離されたＴＡＴポリペプチドを提供する。これを製造する方法もまたここに開示され、これらの方法には、ＴＡＴポリペプチドの発現に適した条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からＴＡＴポリペプチドを回収することを含む。

【００１７】

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここで記載されているポリペプチドの何れかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。

【００１８】

ここに開示されているポリペプチドの何れかの製造方法がさらに提供され、所望するポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望するポリペプチドを回収することを含んでなる。

【００１９】

他の実施態様では、本発明は、異種（非-ＴＡＴ）ポリペプチドに融合した、ここに開示のＴＡＴポリペプチドの何れかを含む単離したキメラポリペプチドを提供する。そのようなキメラ分子の例は、例えば、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのＦｃ領域等の異種ポリペプチドと融合したここに開示のＴＡＴポリペプチドの何れかを含む。

【００２０】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの何れかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、その抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体又は抗ＴＡＴポリペプチド抗体がその各抗原性エピトープと結合するのを競合的に阻害する抗体である。本発明の抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞で産生され、好ましくは、それが結合する細胞の成長又は増殖を阻害するか、又は死を誘導する。診断の目的に対しては、本発明の抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりする。

【００２１】

本発明の他の実施態様では、本発明はここで開示されている抗体の何れかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、この宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母菌であり得る。ここに記載されている抗体の製造方法が更に提供され、所望する抗体の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物からその所望する抗体を回収することを含んでなる。

【００２２】

更なる実施態様において、本発明は、担体と組合わされて、本明細書に記載されるＴＡＴポリペプチド、本明細書に記載されるキメラＴＡＴペプチド、又は本明細書に記載される抗ＴＡＴ抗体を含む物質の組成物に関する。場合によっては、担体は、薬学的に許容される担体である。

【００２３】

更なる別の実施態様において、本発明は、容器及び容器内に収容された組成物を含む製造品に関し、その組成物には、本明細書に記載のＴＡＴポリペプチド、本明細書に記載のキメラＴＡＴポリペプチド、又は本明細書に記載の抗ＴＡＴ抗体が含まれ得る。製造品は、更に場合によっては、腫瘍の治療的処置又は診断的検出のためのこの組成物の使用に言及する、容器に添付したラベル、又は容器内に含まれるパッケージ挿入物を含みうる。

【００２４】

本発明の他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチド、キメラＴＡＴポリペプチド、又は抗ＴＡＴポリペプチド抗体に反応する症状の治療に有用な医薬の調製のための、本明細書に記載のＴＡＴポリペプチド、本明細書に記載のキメラＴＡＴポリペプチド、又は本明細書に記載の抗ＴＡＴポリペプチド抗体の使用に関する。

【００２５】
本発明の他の実施態様は、本明細書に開示するＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、又はＣＤＲ－Ｈ３配列の内の１以上を含む単離された任意の抗体、或いはそのような抗体と同じエピトープに結合する任意の抗体を目的とする。
【００２６】
本発明の他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチドを発現する細胞の成長を阻害する方法に関し、該方法は、細胞を、ＴＡＴポリペプチドと結合する抗体と接触させることを含み、ここでＴＡＴポリペプチドへの抗体の結合がＴＡＴポリペプチドを発現する細胞の成長の阻害を引き起こす。好適な実施態様では、細胞は癌細胞であり、ＴＡＴポリペプチドへの抗体の結合がＴＡＴポリペプチドを発現する細胞の死を引き起こす。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートし得る。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。
【００２７】
本発明の更に他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチドを発現する細胞を含む癌性細胞を持つ哺乳動物を治療的に処置する方法に関し、該方法は、ＴＡＴポリペプチドと結合する抗体の治療的に有効な量を哺乳動物に投与することを含み、それによって腫瘍の効果的な治療的処置が達成される。場合によっては、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法に用いられる抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされ得る。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。
【００２８】
本発明の更に他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチドを含むと思われる試料中のＴＡＴポリペプチドの存在を決定する方法に関し、該方法は、試料をＴＡＴポリペプチドと結合する抗体に曝して、試料中のＴＡＴポリペプチドへの抗体の結合を定量することを含み、そのような結合の存在が、試料中のＴＡＴポリペプチドの存在を示す。場合によっては、試料は、ＴＡＴポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含み得る。この方法で用いる抗体は、場合によっては検出可能なように標識されたり、固体支持体に付着させられたりする。
【００２９】
本発明の更なる実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（ａ）前記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同じ組織源又は型の既知の正常な非癌性細胞のコントロール試料中における、ＴＡＴポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して、試験試料中のＴＡＴポリペプチドのより高いレベルの発現が、試験試料が得られた哺乳動物での腫瘍の存在を示す。
【００３０】
本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法に関し、該方法は、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料を、ＴＡＴポリペプチドと結合する抗体と接触させ、（ｂ）試験試料中での、抗体とＴＡＴポリペプチドの間で形成される複合体を検出することを含んでなり、複合体の形成が、哺乳動物での腫瘍の存在を示す。場合によっては、用いられる抗体は、検出可能に標識されたり、固体支持体に付着されたりするか、及び／又は組織細胞の試験試料が癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。
【００３１】

本発明の更に他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチドの改変、好ましくは増加された発現又は活性に関連した細胞増殖性疾患を治療又は防止する方法に関し、該方法はそのような治療を必要とする患者に、有効量のＴＡＴポリペプチドのアンタゴニストを投与することを含んでなる。好ましくは、細胞増殖性疾患は癌であり、ＴＡＴポリペプチドのアンタゴニストは抗ＴＡＴポリペプチド抗体、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。細胞増殖性疾患の効果的な治療又は防止はＴＡＴポリペプチドを発現する細胞の直接の死滅化又は増殖阻害の結果又はＴＡＴポリペプチドの細胞増殖増強活性のアンタゴナイズによるものでありうる。

【００３２】

本発明の更に他の実施態様はＴＡＴポリペプチドを発現する細胞へ抗体を結合させる方法に関し、該方法は、ＴＡＴポリペプチドを発現する細胞を、上記抗体、オリゴペプチド又は小有機分子に、抗体が上記ＴＡＴポリペプチドに結合するのに適した条件下で接触させ、それらの結合を可能にすることを含んでなる。好ましい実施態様では、抗体の細胞に対する結合の位置及び／又は量の、定性的及び／又は定量的な決定に有用な化合物又は分子を用いて抗体を標識する。

【００３３】

本発明の他の実施態様は、ＴＡＴポリペプチド、ＴＡＴポリペプチドをコードする核酸又はその核酸を含むベクター又は宿主細胞、抗ＴＡＴポリペプチド抗体の、（ｉ）癌又は腫瘍の治療的処置又は診断的検出、又は（ｉｉ）細胞増殖性疾患の治療的処置又は防止に有用な医薬の製造における使用に関する。

【００３４】

本発明の他の実施態様は、癌細胞の増殖を阻害する方法に関し、ここで、上記癌細胞の増殖はＴＡＴポリペプチドの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存し（ここで、ＴＡＴポリペプチドは癌細胞自体又は癌細胞に増殖増強効果を有するポリペプチドを産生する細胞の何れかによって発現されうる）、該方法は、ＴＡＴポリペプチドに結合する抗体にＴＡＴポリペプチドを接触させることを含んでなり、それによってＴＡＴポリペプチドの増殖増強活性をアンタゴナイズし、次には癌細胞の増殖を阻害する。好ましくは癌細胞の増殖は完全に阻害される。更により好ましくは、ＴＡＴポリペプチドへの抗体の結合は癌細胞の死を誘導する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【００３５】

本発明の更に他の実施態様は、哺乳動物において腫瘍を治療的に処置する方法に関し、ここで、上記腫瘍の増殖はＴＡＴポリペプチドの増殖増強効果に少なくとも部分的に依存し、該方法は、ＴＡＴポリペプチドに結合する抗体を哺乳動物に投与することを含んでなり、それによって上記ＴＡＴポリペプチドの増殖増強活性をアンタゴナイズし、腫瘍の効果的な治療的処置をもたらす。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。本発明の方法において使用される抗体は、例えば、メイタンシノイド又はカリケアマイシンを含む毒素のような増殖阻害剤又は細胞障害性剤、抗生物質、放射性同位体、核溶解性酵素等と場合によってはコンジュゲートされうる。本発明の方法に用いられる抗体は、場合によってはＣＨＯ細胞又は細菌細胞中で産生され得る。

【００３６】

更なる実施態様において、本発明は、今回または将来のアプリケーションのために可能性のある以下の特許請求の範囲の一式に関する。

１．（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列をコードするＤＮＡ分子、

（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠く

ものをコードするＤＮＡ分子、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つものをコードするＤＮＡ分子、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするＤＮＡ分子、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列、
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域、又は
（ｇ）（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）又は（ｆ）の相補鎖、
に対して少なくとも８０％の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する単離された核酸。
２．（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つものをコードするヌクレオチド配列、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列、
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域、又は
（ｇ）（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）又は（ｆ）の相補鎖、
を有する単離された核酸。
３．（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列をコードする核酸、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードする核酸、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つものをコードする核酸、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くものをコードする核酸、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列、
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域、又は
（ｇ）（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）又は（ｆ）の相補鎖、
にハイブリダイズする単離された核酸。
４．ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションが起こる、請求項３に記載の核酸。
５．少なくとも約５ヌクレオチド長である、請求項３に記載の核酸。
６．請求項１、２、又は３に記載の核酸を有する発現ベクター。
７．前記核酸が、前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に作用可能に結合する、請求項６に記載の発現ベクター。
８．請求項７に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。
９．ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞、又は酵母細胞である、請求項８に記載の宿主細胞。
１０．前記ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項８に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの生産方法。
１１．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は

（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。
１２．（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する単離されたポリペプチド。
１３．異種ポリペプチドに融合した請求項１１又は１２に記載のポリペプチドを有するキメラポリペプチド。
１４．前記異種ポリペプチドが免疫グロブリンのエピトープタグ配列又はＦｃ領域である、請求項１３に記載のキメラポリペプチド。
１５．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに結合する単離された抗体。
１６．（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有するポリペプチドに結合する単離された抗体。
１７．モノクローナル抗体である、請求項１５又は１６に記載の抗体。
１８．抗体断片である、請求項１５又は１６に記載の抗体。
１９．キメラ又はヒト化抗体である、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２０．増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２１．細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２２．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位体及び核溶解性酵素からなる群から選択される、請求項２１に記載の抗体。
２３．細胞障害性剤が毒素である、請求項２１に記載の抗体。
２４．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求

項２３に記載の抗体。
２５．毒素がメイタンシノイドである、請求項２３に記載の抗体。
２６．細菌中で産生される、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２７．ＣＨＯ細胞中で産生される、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２８．結合する細胞に死を誘発する、請求項１５又は１６に記載の抗体。
２９．検出可能に標識される、請求項１５又は１６に記載の抗体。
３０．請求項１５又は１６に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸。
３１．前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に作用可能に結合する、請求項３０に記載の核酸を有する発現ベクター。
３２．請求項３１に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。
３３．ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞、又は酵母細胞である、請求項３２に記載の宿主細胞。
３４．前記抗体の発現に適した条件下で請求項３２に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記抗体を回収することを含む抗体の生産方法。
３５．担体と組み合わされて、（ａ）請求項１１に記載のポリペプチド、（ｂ）請求項１２に記載のポリペプチド、（ｃ）請求項１３に記載のキメラポリペプチド、（ｄ）請求項１５に記載の抗体、又は（ｅ）請求項１６に記載の抗体を含有する組成物。
３６．前記担体が薬学的に許容される担体である、請求項３５に記載の組成物。
３７．（ａ）容器；及び
（ｂ）前記容器に収容された請求項３５に記載の組成物
を含んでなる製造品。
３８．癌の治療的処置又は診断的検出のための前記組成物の使用に言及した、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器に含められたパッケージ挿入物を更に含む、請求項３７に記載の製造品。
３９．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記タンパク質に結合する抗体に前記細胞を接触させ、前記タンパク質に前記抗体が結合することにより前記細胞の増殖が阻害される方法。
４０．前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項３９に記載の方法。
４１．前記抗体が抗体断片である、請求項３９に記載の方法。
４２．前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項３９に記載の方法。
４３．前記抗体が増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項３９に記載の方法。
４４．前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項３９に記載の方法。
４５．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項４４に記載の方法。
４６．細胞障害性剤が毒素である、請求項４４に記載の方法。
４７．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項４６に記載の方法。
４８．毒素がメイタンシノイドである、請求項４６に記載の方法。
４９．前記抗体が細菌中で産生される、請求項３９に記載の方法。
５０．前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項３９に記載の方法。

５１．前記細胞が癌細胞である、請求項３９に記載の方法。
５２．前記癌細胞に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項５１に記載の方法。
５３．前記癌細胞が、乳癌細胞、直腸結腸癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頚部癌細胞、黒色腫細胞、及び白血病細胞からなる群から選択される、請求項７１に記載の方法。
５４．前記癌細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項５１に記載の方法。
５５．前記細胞の死を誘発する、請求項３９に記載の方法。
５６．前記タンパク質が、（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する、請求項３９に記載の方法。
５７．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対し、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物の治療方法であって、前記タンパク質に結合する抗体の治療的有効量を前記哺乳動物に投与することにより前記哺乳動物を有効に治療する方法。
５８．前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項５７に記載の方法。
５９．前記抗体が抗体断片である、請求項５７に記載の方法。
６０．前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項５７に記載の方法。
６１．前記抗体が増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項５７に記載の方法。
６２．前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項５７に記載の方法。
６３．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項６２に記載の方法。
６４．細胞障害性剤が毒素である、請求項６２に記載の方法。
６５．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項６４に記載の方法。
６６．毒素がメイタンシノイドである、請求項６４に記載の方法。
６７．前記抗体が細菌中で産生される、請求項５７に記載の方法。
６８．前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項５７に記載の方法。
６９．前記腫瘍に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項５７に記載の方法。
７０．前記腫瘍が、胸部腫瘍、直腸結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、中枢神経系腫瘍、肝臓腫瘍、膀胱腫瘍、膵臓腫瘍、又は子宮頚部腫瘍からなる群から選択される、請求項５７に記載の方法。

７１．前記腫瘍の癌性細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項５７に記載の方法。
７２．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する、請求項５７に記載の方法。
７３．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を含むことが疑われる試料中における前記タンパク質の存在を決定する方法であって、前記タンパク質に結合する前記抗体に前記試料を曝し、前記試料中における前記タンパク質への前記抗体の結合を決定し、前記タンパク質に対する抗体の結合により前記試料中における前記タンパク質の存在が示される方法。
７４．前記試料が前記タンパク質の発現が疑われる細胞を含む、請求項７３に記載の方法。
７５．前記細胞が癌細胞である、請求項７４に記載の方法。
７６．前記抗体が検出可能に標識される、請求項７３に記載の方法。
７７．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する、請求項７３に記載の方法。
７８．哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、
（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナ

ルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを、前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料中と、同一組織由来の既知の正常細胞のコントロール試料中で測定することを含み、コントロール試料と比較して試験試料中に前記タンパク質が高いレベルで発現していることが、試験試料を採取した哺乳動物中に腫瘍が存在することを示す方法。
７９．前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程が、インサイツハイブリダイゼーション又はＲＴ-ＰＣＲ分析でオリゴヌクレオチドを使用することを含む、請求項７８に記載の方法。
８０．前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程が、免疫組織化学分析又はウェスタンブロッティング分析で抗体を使用することを含む、請求項７８に記載の方法。
８１．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する、請求項７８に記載の方法。
８２．哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、
前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質に結合する抗体に対し、前記哺乳動物由来の組織細胞の試験試料を接触させ、試験試料中における、前記抗体と前記タンパク質の複合体の形成を検出することを含み、複合体の形成が哺乳動物中における腫瘍の存在を示す方法。
８３．前記抗体が検出可能に標識される、請求項８２に記載の方法。
８４．前記組織細胞の試験試料が、癌性腫瘍を有することが疑われる個体から得たものである、請求項８２に記載の方法。
８５．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
を有する、請求項８２に記載の方法。
８６．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の発現又は活性の増大に関連する細胞増殖障害を治療又は予防する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対し、前記タンパク質のアンタゴニストの治療的有効量を投与することによって、前記細胞増殖障害を有効に治療又は予防する方法。
８７．前記細胞増殖障害が癌である、請求項８６に記載の方法。
８８．前記アンタゴニストが抗ＴＡＴポリペプチド抗体、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項８６に記載の方法。
８９．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を発現する細胞に対し、抗体を結合させる方法であって、前記タンパク質に結合する抗体に前記細胞を接触させ、前記細胞に抗体を結合させることにより、前記細胞に抗体を結合させることを含む方法。
９０．前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項８９に記載の方法。
９１．前記抗体が抗体断片である、請求項８９に記載の方法。
９２．前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項８９に記載の方法。
９３．前記抗体が増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項８９に記載の方法。
９４．前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項８９に記載の方法。
９５．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項９４に記載の方法。
９６．細胞障害性剤が毒素である、請求項９４に記載の方法。
９７．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求

項９６に記載の方法。
９８．毒素がメイタンシノイドである、請求項９６に記載の方法。
９９．前記抗体が細菌中で産生される、請求項８９に記載の方法。
１００．前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項８９に記載の方法。
１０１．前記細胞が癌細胞である、請求項８９に記載の方法。
１０２．前記癌細胞に更に放射線治療又は化学療法薬が施される、請求項１０１に記載の方法。
１０３．前記癌細胞が、乳癌細胞、直腸結腸癌細胞、肺癌細胞、卵巣癌細胞、中枢神経系癌細胞、肝臓癌細胞、膀胱癌細胞、膵臓癌細胞、子宮頚部癌細胞、黒色腫細胞又は白血病細胞からなる群から選択される、請求項１０１に記載の方法。
１０４．前記癌性細胞が、同じ組織由来の正常細胞と比較して前記タンパク質を大量に発現する、請求項１０３に記載の方法。
１０５．前記細胞の死を誘発する、請求項８９に記載の方法。
１０６．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項１から５のいずれか１項又は請求項３０に記載の核酸の使用。
１０７．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項１から５のいずれか１項又は請求項３０に記載の核酸の使用。
１０８．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項１から５のいずれか１項又は請求項３０に記載の核酸の使用。
１０９．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項６、７又は３１に記載の発現ベクターの使用。
１１０．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項６、７又は３１に記載の発現ベクターの使用。
１１１．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項６、７又は３１に記載の発現ベクターの使用。
１１２．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項８、９、３２、又は３３に記載の宿主細胞の使用。
１１３．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項８、９、３２、又は３３に記載の宿主細胞の使用。
１１４．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項８、９、３２、又は３３に記載の宿主細胞の使用。
１１５．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項１１から１４のいずれか１項に記載のポリペプチドの使用。
１１６．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項１１から１４のいずれか１項に記載のポリペプチドの使用。
１１７．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項１１から１４のいずれか１項に記載のポリペプチドの使用。
１１８．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項１５から２９のいずれか１項に記載の抗体の使用。
１１９．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項１５から２９のいずれか１項に記載の抗体の使用。
１２０．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項１５から２９のいずれか１項に記載の抗体の使用。
１２１．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項３５又は３６のいずれか１項に記載の組成物の使用。
１２２．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項３５又は３６のいずれか１項に記載の組成物の使用。
１２３．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項３５又は３６のいずれか１項に記載の組成物の使用。
１２４．癌の治療的処置又は診断的検出のための薬剤の調製における、請求項３７又は３

８のいずれか１項に記載の製造品の使用。
１２５．腫瘍の治療のための薬剤の調製における、請求項３７又は３８のいずれか１項に記載の製造品の使用。
１２６．細胞増殖障害の治療又は予防のための薬剤の調製における、請求項３７又は３８のいずれか１項に記載の製造品の使用。
１２７．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の増殖増強効果に細胞の増殖が少なくとも部分的に依存する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記タンパク質に結合する抗体に対して前記タンパク質を接触させることにより、前記細胞の増殖を阻害する方法。
１２８．前記細胞が癌細胞である、請求項１２７に記載の方法。
１２９．前記細胞が前記タンパク質を発現する、請求項１２７に記載の方法。
１３０．前記タンパク質に対する前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合が、前記タンパク質の細胞増殖増強活性をアンタゴナイズする、請求項１２７に記載の方法。
１３１．前記タンパク質に対する前記抗体の結合が前記細胞の死を誘発する、請求項１２７に記載の方法。
１３２．前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項１２７に記載の方法。
１３３．前記抗体が抗体断片である、請求項１２７に記載の方法。
１３４．前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項１２７に記載の方法。
１３５．前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１２７に記載の方法。
１３６．前記抗体が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１２７に記載の方法。
１３７．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項１３６に記載の方法。
１３８．細胞障害性剤が毒素である、請求項１３６に記載の方法。
１３９．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項１３８に記載の方法。
１４０．毒素がメイタンシノイドである、請求項１３８に記載の方法。
１４１．前記抗体が細菌中で産生される、請求項１２７に記載の方法。
１４２．前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項１２７に記載の方法。
１４３．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされ

るアミノ酸配列、
を有する、請求項１２７に記載の方法。
１４４．（ａ）配列番号２に示されたポリペプチド、
（ｂ）配列番号２に示されたポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるポリペプチド、
に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質の増殖増強効果に腫瘍の増殖が少なくとも部分的に依存する、哺乳動物の腫瘍の治療的処置法であって、前記タンパク質に結合する抗体に対して前記タンパク質を接触させることにより、前記腫瘍を有効に処置する方法。
１４５．前記腫瘍の細胞が前記タンパク質を発現する、請求項１４４に記載の方法。
１４６．前記タンパク質に対する前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子の結合が、前記タンパク質の細胞増殖増強活性をアンタゴナイズする、請求項１４４に記載の方法。
１４７．前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項１４４に記載の方法。
１４８．前記抗体が抗体断片である、請求項１４４に記載の方法。
１４９．前記抗体がキメラ又はヒト化抗体である、請求項１４４に記載の方法。
１５０．前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１４４に記載の方法。
１５１．前記抗体、オリゴペプチド又は有機分子が細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１４４に記載の方法。
１５２．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群から選択される、請求項１５１に記載の方法。
１５３．細胞障害性剤が毒素である、請求項１５１に記載の方法。
１５４．毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群から選択される、請求項１５３に記載の方法。
１５５．毒素がメイタンシノイドである、請求項１５３に記載の方法。
１５６．前記抗体が細菌中で産生される、請求項１４４に記載の方法。
１５７．前記抗体がＣＨＯ細胞中で産生される、請求項１４４に記載の方法。
１５８．前記タンパク質が、
（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列、
（ｂ）配列番号２に示されたアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｃ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を持つもの、
（ｄ）配列番号２に示されたポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列であって、その関連シグナルペプチド配列を欠くもの、
（ｅ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、又は
（ｆ）配列番号１に示されたヌクレオチド配列の完全長コード化領域によりコードされるアミノ酸配列、
である、請求項１４４に記載の方法。
１５９．請求項１５から２９の何れか一項に記載の抗体が結合した同じエピトープに結合する単離された抗体。
１６０．モノクローナル抗体である請求項１５９に記載の抗体。
１６１．抗体断片である、請求項１５９に記載の抗体。

１６２．キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項１５９に記載の抗体。
１６３．増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１５９に記載の抗体。
１６４．細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１５９に記載の抗体。
１６５．細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項１６４に記載の抗体。
１６６．細胞障害性剤が毒素である、請求項１６４に記載の抗体。
１６７．毒素がメイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項１６６に記載の抗体。
１６８．毒素がメイタンシノイドである、請求項１６６に記載の抗体。
１６９．細菌中で産生される請求項１５９に記載の抗体。
１７０．ＣＨＯ細胞中で産生される請求項１５９に記載の抗体。
１７１．結合する細胞の死を誘発する、請求項１５９に記載の抗体。
１７２．検出可能に標識される、請求項１５９に記載の抗体。
１７３．　請求項１５から２９に記載の何れかの抗体の相補性決定領域の少なくとも一つを含む、請求項１５９に記載の抗体。
１７４．ＴＡＴポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞。
１７５．請求項１５から２９の何れかの抗体が結合したエピトープに結合する抗体を同定する方法であって、前記方法は、試験抗体の、請求項１５から２９に記載の何れかの抗体の結合を遮断する能力を決定することを含み、ここで、前記請求項１５から２９の何れかの抗体の結合を少なくとも４０％でかつ等しい抗体濃度で遮断する前記試験抗体の能力は、前記請求項１５から２９の何れかの抗体により結合されたエピトープへ結合可能であることを示す、方法。

【００３７】

本発明のさらなる実施態様は、本明細書を読むことで当業者に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】図１は、ＴＡＴ２１１のｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１）を示し、配列番号１は本明細書で「ＤＮＡ２１９８９４」として命名されるクローンである。
【図２】図２は、図１に示された配列番号１のコードする配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２）を示す。
【図３Ａ－Ｃ】図３Ａ－Ｃは、以下の可変軽鎖のアミノ酸配列のアラインメントを示す：軽鎖ヒトサブグループＩコンセンサス配列（ｈｕＫＩ；配列番号３）、マウス１０Ｈ１抗ＴＡＴ２１１抗体（ｍｕ１０Ｈ１－Ｌ；配列番号４）、１０Ｈ１抗ＴＡＴ２１１をグラフトされた「ヒト化」抗体（１０Ｈ１グラフト；配列番号５）、及び様々な他の抗ＴＡＴ２１１「ヒト化」抗体（配列番号６－１１）。
【図４Ａ－Ｃ】図４Ａ－Ｃは、以下の可変重鎖のアミノ酸配列のアラインメントを示す：重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサス配列（ｈｕｍＩＩＩ；配列番号１２）、マウス１０Ｈ１抗ＴＡＴ２１１抗体（ｈｕｍＩＩＩ；配列番号１２）、マウス１０Ｈ１抗ＴＡＴ２１１抗体（ｍｕ１０Ｈ１－Ｈ；配列番号１３）、１０Ｈ１抗ＴＡＴ２１１をグラフトされた「ヒト化」抗体（１０Ｈ１グラフト；配列番号１４）、及び様々な他の抗ＴＡＴ２１１「ヒト化」抗体（配列番号１５－２０）。
【図５】図５は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｌ１配列（配列番号２１－３４）を示す。
【図６】図６は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｌ２配列（配列番号３５－３８）を示す。
【図７】図７は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｌ３配列（配列番号３９－４１）を示す。
【図８】図８は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｈ１配列（配列番号４２－４５）を示す。

【図９】図９は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｈ２配列（配列番号４６－６０）を示す。
【図１０】図１０は、選択された親和性成熟１０Ｈ１由来の抗体の、種々のＣＤＲ－Ｈ３配列（配列番号６１－６５）を示す。
【図１１】図１１は、以下の配列識別子を用いた本発明の実施に使用される例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す：ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号６６）、ヒトＶＨサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナス高頻度可変領域延長部（配列番号６７－６９）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号７０）、ヒトＶＨサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナス高頻度可変領域延長部（配列番号７１－７３）、ヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ「Ｌ－変異体」（配列番号７４）、及びヒトＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ「Ｆ－変異体」（配列番号７５）。
【図１２】図１２は、以下の配列識別子を用いた本発明の実施に使用される例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す：ヒトＶＬカッパサブグループＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号７６）、ヒトＶＬカッパサブグループＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号７７）、ヒトＶＬカッパサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号７８）、及びヒトＶＬカッパサブグループＩＶコンセンサスフレームワークマイナスＫａｂａｔＣＤＲ（配列番号７９）。
【図１３】図１３は、抗体１０Ｈ１．１．４Ｂの重鎖のアミノ酸配列を示す（配列番号８０）。
【図１４】図１４は、抗体１０Ｈ１．１．４Ｂの軽鎖のアミノ酸配列を示す（配列番号８１）。
【図１５】図１５は、以下のＡＤＣ　ｖｃ－ＭＭＡＥコンジュゲート抗体、１０Ｈ１．１１（◆）、１０Ｈ１．１１．１（■）、１０Ｈ１．１１．２Ｂ（▲）、１０Ｈ１．１１．４Ｂ（●）、１０Ｈ１．１１．６Ｂ（Ｘ）、１０Ｈ１グラフト（○）、抗ヒトｇＤ（｜）、抗ブタクサ（□）での処置によるＯＶＣＡＲ－３細胞（細胞表面上でＴＡＴ２１１ポリペプチドを内因性に発現する）のインビトロでの死滅を示す。
【図１６】図１６は、以下のＡＤＣ　ｖｃ－ＭＭＡＥコンジュゲート抗体、１０Ｈ１．１１．４Ｂ（●）、又は抗ヒトｇＤ（｜）による処置による２９３細胞（細胞表面上でＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現しない）のインビトロでの死滅を示す。
【図１７】図１７は、以下のＡＤＣ　ｖｃ－ＭＭＡＥコンジュゲート抗体、１０Ｈ１．１１．４Ｂ（●）、又は抗ヒトｇＤ（｜）による処置による２９３／ＴＡＴ２１１細胞（細胞表面上でＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現するよう操作された）のインビトロでの死滅を示す。
【図１８】図１８は、以下のＡＤＣ　ｖｃ－ＭＭＡＥコンジュゲート抗体、ビークルのみ（□）、１０Ｈ１．１１（◆）、１０Ｈ１．１１．１（■）、１０Ｈ１．１１．２Ｂ（▲）、１０Ｈ１．１１．４Ｂ（●）、１０Ｈ１．１１．６Ｂ（＋）、及び１０Ｈ１グラフト（○）によるマウス乳腺脂肪パッドの実験におけるＯＶＣＡＲ－３腫瘍のインビボでの死滅を示す。
【図１９】図１９は、以下のＡＤＣ　ｖｃ－ＭＭＡＥコンジュゲート抗体、ビークルのみ（Ｘ）、３ｍｇ／ｋｇでの１０Ｈ１．１１．４Ｂ、１ｍｇ／ｋｇでの１０Ｈ１．１１．４Ｂ（●）、又はＴＡＴ２１１に結合しない非特異的抗ｇｐ１２０コントロール抗体（▲）によるマウス乳腺脂肪パッドの実験におけるＯＶＣＡＲ－３腫瘍のインビボでの死滅を示す。
【００３９】
発明の詳細な説明
Ｉ．定義
ここで使用される「ＴＡＴポリペプチド」及び「ＴＡＴ」という用語は、直後に数値表

示がある場合には種々のポリペプチドを指し、完全な表示（つまり、ＴＡＴ／数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」という用語がここでは実際の数的表示として提供されている「ＴＡＴ／数字ポリペプチド」及び「ＴＡＴ／数字」という用語には、天然配列ポリペプチド、ポリペプチド変異体及び天然配列ポリペプチドとポリペプチド変異体の断片（ここでさらに定義される）を包含する。ここに記載されているＴＡＴポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成法によって調製してもよい。「ＴＡＴポリペプチド」という用語は、ここに記載の各個々のＴＡＴ／数字ポリペプチドを指す。「ＴＡＴポリペプチド」を指すこの明細書の全ての開示は、各ポリペプチドを個々に指すと同時に集合的に指す。例えば、調製、精製、誘導、抗体の形成、ＴＡＴ結合オリゴペプチドの形成、ＴＡＴ結合有機分子の形成、投与、含有する組成物、疾患の治療等の記載は、本発明の各ポリペプチドに関している。「ＴＡＴポリペプチド」という用語は、また、ここに記載のＴＡＴ／数字ポリペプチドの変異体を含む。一実施態様において、ＴＡＴ２１１ポリペプチド配列は配列番号２として示される。

【００４０】

「天然配列ＴＡＴポリペプチド」には、天然由来のＴＡＴポリペプチドに対応する同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列ＴＡＴポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生成することもできる。「天然配列ＴＡＴポリペプチド」という用語には、特に、特定のＴＡＴポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明のある実施態様では、ここに開示される天然配列ＴＡＴポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドン（示されているならば）は、図において太字及び下線で示した。添付図に「Ｎ」又は「Ｘ」で示した核酸残基は、任意の核酸残基である。しかし、添付図に開示したＴＡＴポリペプチドは、図面においてアミノ酸位置１としてここに表示されたメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置１の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をＴＡＴポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし、可能でもある。

【００４１】

ＴＡＴポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ＥＣＤ」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないＴＡＴポリペプチドの形態を意味する。通常、ＴＡＴポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＴＡＴポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインの何れかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。場合によっては、従って、ＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界の何れかの側から約５を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【００４２】

ここに開示する種々のＴＡＴポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付図に示されうる。しかし、シグナルペプチドのＣ末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドＣ末端境界の何れかの側で約５アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのＣ末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうることに留意される（例えば、Nielsen等, Prot. Eng.10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認めら

れる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのＣ末端境界の何れかの側の約５アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【００４３】

「ＴＡＴポリペプチド変異体」とはＴＡＴポリペプチド、好ましくは、ここに開示するような完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、ここで開示するようなシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチド配列、ここに開示するようなシグナルペプチドを有する又は有しないＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示する完全長ＴＡＴポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、完全長ＴＡＴポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを示す核酸によってコードされるもの）と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有するここで定義するような活性なＴＡＴポリペプチドを意味する。このようなＴＡＴポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のＮ末端又はＣ末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＴＡＴポリペプチドが含まれる。通常、ＴＡＴポリペプチド変異体は、ここに開示する完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くＴＡＴポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＴＡＴポリペプチド配列の任意の具体的に定義した他の断片に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常、ＴＡＴ変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、あるいは少なくとも約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００アミノ酸長、又はそれ以上である。場合によっては、ＴＡＴ変異体ポリペプチドは、天然ＴＡＴポリペプチド配列に比較して一つ以下の保存的アミノ酸置換、あるいは天然ＴＡＴポリペプチド配列に比較して２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以下の同類アミノ酸置換を有するにすぎない。

【００４４】

ここで同定したＴＡＴポリペプチド配列に関する「パーセント(％)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のＴＡＴポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが米国特許第７１６０９８５号に与えられ、参照により本明細書に援用される配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、そのソースコードは米国著作権庁，ワシントンＤ.Ｃ.,２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ，カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プロ

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

【００４５】

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

分率Ｘ／Ｙの１００倍

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

【００４６】

「ＴＡＴ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＴＡＴ変異体核酸配列」とは、ここで定義されるように、ＴＡＴポリペプチド、好ましくは活性ＴＡＴポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＴＡＴポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列（完全長ＴＡＴポリペプチドの完全なコード化配列の一部分のみを表す核酸によってコードされた）と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、ＴＡＴ変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＴＡＴポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＴＡＴポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＴＡＴポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【００４７】

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

【００４８】

ここで同定されるＴＡＴコード化核酸配列に対する「パーセント(％)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のＴＡＴ核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、％核酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが米国特許第７１６０９８５号に与えられ、参照により本明細書に援用される配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、そのソースコードは米国著作権庁,ワシントンＤ.Ｃ.,２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ，カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標）Ｖ４.０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００４９】

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

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチド数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【００５０】

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

【００５１】

ＴＡＴポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）本発明の完全長ＴＡＴポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を意味する。ＡＴＣＣ寄託核酸に関して使用される場合の「完全長コード領域」という用語は、（添付図において開始及び停止コドンの間でしばしば示される）ＡＴＣＣに寄託されたベクター中に挿入されているｃＤＮＡのＴＡＴポリペプチドコード部分を意味する。

【００５２】

ここに開示される種々のＴＡＴポリペプチドを記載するために使用される「単離」とは、自然環境の成分から同定され及び分離及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(１)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(２)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でＳＤＳ-ＰＡＧＥにより均一になるまで精製される。単離され

たポリペプチドには、ＴＡＴポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００５３】

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

【００５４】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なＤＮＡ配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列と、リボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、（１）洗浄に低イオン強度及び高温度を用いる、例えば、５０℃で、０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウム；（２）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、４２℃で、５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミドと０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファー、及び７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウム；又は（３）４２

℃で、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び１０％の硫酸デキストラン溶液中で終夜ハイブリダイゼーション、４２℃で、０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中にて１０分間の洗浄、ついで５５℃で、ＥＤＴＡを含む０．１×ＳＳＣからなる１０分間の高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定される。

【００５８】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度のストリンジェント条件は、２０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハード液、１０％硫酸デキストラン、及び２０ｍｇ／ｍｌの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中にて３７℃での終夜インキュベーション、次いで１×ＳＳＣ中にて約３７－５０℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【００５９】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したＴＡＴポリペプチド又は抗ＴＡＴ抗体を含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも６のアミノ酸残基、通常は約８～５０のアミノ酸残基(好ましくは、約１０～２０の残基)を有する。

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

「治療する」又は「治療」又は「緩和」とは、治療上の処置及び予防的療法又は防護的療法の双方を称し、その目的は、標的である病的症状又は疾患を防ぐか又は衰え（小さく）させることである。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患に既に罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。本発明の方法に従って抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子の治療量を投与された後に

、患者が次の一又は複数のものについて観察可能な及び／又は測定可能な減少又は消失を示したならば、被検体又は哺乳動物は、ＴＡＴポリペプチド発現癌に関して成功裏に「治療された」ことになる：癌細胞の数の減少、又は癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟部組織及び骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の減速及び好ましくは停止）；腫瘍増殖のある程度の阻害；及び／又は特定の癌に関連している一又は複数の症状のある程度の軽減；疾病率及び死亡率の減少、及び生命問題の質の改善。ある程度、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴ結合オリゴペプチドは、生存癌細胞の増殖を防ぐ及び／又は死滅させることができ、それは、細胞増殖抑制及び／又は細胞障害性であり得る。これらの兆候又は症状の低減は、また、患者が感じることができる。

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

【００６６】

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

【００６７】

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

【００６８】

「固相」又は「固体支持体」とは、本発明の抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（例え

ばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第４２７５１４９号に記載されたような別々の粒子の不連続な固相も含む。

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

ここに開示するポリペプチド、抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド、ＴＡＴ結合有機分子、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に述べた目的を実施するために十分な量のことである。「有効量」は、述べられた目的に関連して、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【００７２】

「治療的有効量」という用語は、患者又は哺乳動物の疾患又は疾病を「治療」するのに効果的な抗体、ポリペプチド、ＴＡＴ結合オリゴペプチド、ＴＡＴ結合有機分子又は他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的に有効量の薬は癌細胞の数を減じ；腫瘍の大きさを減じ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害（すなわち、ある程度まで減速、好ましくは停止）し；腫瘍転移を阻害（すなわち、ある程度まで減速及び好ましくは停止）し；腫瘍増殖をある程度まで阻害し；及び／又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度まで緩和する。「治療する」のここでの定義を参照せよ。薬が存在する癌細胞の増殖を妨げ及び／又は死滅させる程度まで、それは、細胞分裂停止及び／又は細胞障害性であり得る。

【００７３】

抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴポリペプチド、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子の「増殖阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞増殖の阻害の目的のための抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴポリペプチド、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子の「増殖阻害量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【００７４】

抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴポリペプチド、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子の「細胞障害性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞増殖の阻害の目的のための抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴポリペプチド、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子の「細胞障害性量」は、経験的及び常套的な形で決定することができる。

【００７５】

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

【００７６】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含ま

れる。好ましい実施態様では、抗体は、(１)ローリー(Ｌｏｗｒｙ)法によって定量して９５重量％以上の、最も好ましくは９９重量％以上の抗体まで、（２）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは(３)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００７７】

基本的な４-鎖抗体ユニットは２つの同一の軽(Ｌ)鎖と２つの同一の重(Ｈ)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(ＩｇＭ抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するＪ鎖と称される付加的なポリペプチドの５つからなり、よって１０の抗原結合部位を有するが、分泌されたＩｇＡ抗体は重合して、基本的４-鎖ユニットとそれ付随するＪ鎖のうち２-５つを含む多価集合を形成可能である)。ＩｇＧの場合、４-鎖ユニットは一般的に約１５００００ダルトンである。それぞれのＬ鎖は１つの共有ジスルフィド結合によってＨ鎖に結合するが、２つのＨ鎖はＨ鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのＨ及びＬ鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのＨ鎖は、α及びγ鎖の各々に対しては３つの定常ドメイン(ＣＨ)が、μ及びεアイソタイプに対しては４つのＣＨドメインが続く可変ドメイン(ＶＨ)をＮ末端に有する。それぞれのＬ鎖は、その他端に定常ドメイン(ＣＬ)が続く可変ドメイン(ＶＬ)をＮ末端に有する。ＶＬはＶＨと整列し、ＣＬは重鎖の第一定常ドメイン(ＣＨ１)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。ＶＬとＶＨは共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, ８版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, ７１頁及び６章を参照のこと。

【００７８】

任意の脊椎動物種からのＬ鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる２つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(ＣＨ)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭという免疫グロブリンの５つの主要なクラスがあり、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる重鎖を有する。さらにγ及びαのクラスは、ＣＨ配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２が発現する。

【００７９】

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

【００８０】
ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えＤＮＡ法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第４８１６５６７号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【００８１】
ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第４８１６５６７号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

【００８２】
「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びにC_L及び少なくとも重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

【００８３】
「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、及びＦｖ断片；ダイアボディ(ｄｉａｂｏｄｉｅｓ)；直鎖状抗体（米国特許第５６４１８７０号、実施例２；Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]）；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【００８４】
抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Ｆｃ」断片を産生する。Ｆａｂ断片は全長Ｌ鎖とＨ鎖の可変領域ドメイン(ＶＨ)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(ＣＨ１)からなる。各Ｆａｂ断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きな$F(ab')_2$断片が生じ、これは２価の抗原結合部位を持つ２つのジスルフィド結合されたＦａｂ断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりＦａｂ断片と相違する。Ｆａｂ'-ＳＨは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つＦａｂ'を表す。$F(ab')_2$抗体断片は、通常はＦａｂ'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【００８５】

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

【００８６】

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

【００８７】

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

【００８８】

「ダイアボディ(ｄｉａｂｏｄｉｅｓ)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でＶドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち２つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、ＶＨとＶＬドメインとの間に、短いリンカー(約５-１０残基)を持つｓＦｖ断片（前の段落を参照）を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは２つの「交差」ｓＦｖ断片のヘテロダイマーであり、そこでは２つの抗体のＶＨ及びＶＬドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第４０４０９７号；国際公開９３／１１１６１号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【００８９】

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

【００９０】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトＩｇＥ抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原（すなわち、約１ｘ１０$^{-7}$Ｍ以下、好ましくは約１ｘ１０$^{-8}$以下、最も好ましくは約１ｘ１０$^{-9}$Ｍ以下の結合親和性（Ｋｄ）値を有する）と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約５０倍、又は少なくとも約５００倍、又は少

なくとも約１０００倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上にて定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

【００９１】

「Ｋａｂａｔに記載の可変ドメイン残基番号付け」又は「Ｋａｂａｔに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語およびその異なる言い回しは、Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲ又はＣＤＲ内の短縮又は挿入に相当する２、３のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入された残基(例えばKabatによる残基８２ａ、８２ｂおよび８２ｃなど)と、Ｈ２の残基５２の後に単一アミノ酸の挿入(Ｋａｂａｔによる残基５２ａ)を含んでもよい。残基のＫａｂａｔ番号は、「標準の」Ｋａｂａｔ番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい決定した。

【００９２】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる句は、当業者が２つの数値(一般的には、本発明の抗体に関連するものと参照／比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばＫｄ値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び／又は統計学的有意差がないと認められるほど、２つの数値が十分に高く類似していることを意味する。前記２つの値間の差異は、参照／比較抗体の値の好ましくは約５０％以下、好ましくは約４０％以下、好ましくは約３０％以下、好ましくは約２０％以下、好ましくは約１０％以下である。

【００９３】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の１：１相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、解離定数(Ｋｄ)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的実施態様を記載する。

【００９４】

一実施態様では、本発明の「Ｋｄ」又は「Ｋｄ値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(^{125}Ｉ)-標識抗原にてＦａｂを均衡化して、抗Ｆａｂ抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような(Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、所望の抗体のＦａｂ型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(ＲＩＡ)で測定される。アッセイの条件を決めるために、ミクロタイタープレート(Ｄｙｎｅｘ)を５μｇ／ｍｌの捕獲抗Ｆａｂ抗体(Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ)を含む５０ｍM炭酸ナトリウム(ｐＨ９．６)にて一晩コートして、その後２％(w/v)のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳにて室温(およそ２３℃)で２～５時間、ブロックする。非吸着プレート(Ｎｕｎｃ＃２６９６２０)に、１００ｐM又は２６ｐMの［^{125}Ｉ］抗原を段階希釈した所望のＦａｂと混合する(例えば、Presta等、(1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ-１２の評価と一致する)。ついで所望のＦａｂを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば６５時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば１時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを０．１％のＴ

ｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳにて８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質(ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ-２０；Ｐａｃｋａｒｄ)を加え、プレートをＴｏｐｃｏｕｎｔγ計測器(Ｐａｃｋａｒｄ)にて１０分間計測する。最大結合の２０％か又はそれ以下濃度のＦａｂを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のＢＩＡｃｏｒｅ™-２０００又はＢＩＡｃｏｒｅ™-３０００(ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってＫｄ又はＫｄ値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(ＣＭ５，ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びN-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(ｓｉｍｐｌｅ ｏｎｅ-ｔｏ-ｏｎｅ Ｌａｎｇｍｕｉｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｍｏｄｅｌ)(ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアバージョン３．２)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をK_{off}／K_{on}比として算出した。例として、Chen，Y.，ら，(1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(ｓｔｏｐ-ｆｌｏｗ ｅｑｕｉｐｐｅｄ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ)(Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ)又は撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計(ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【００９５】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「k_{on}」は、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のＢＩＡｃｏｒｅ™-２０００又はＢＩＡｃｏｒｅ™-３０００(ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(ＣＭ５，ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びN-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(ｓｉｍｐｌｅ ｏｎｅ-ｔｏ-ｏｎｅ Ｌａｎｇｍｕｉｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｍｏｄｅｌ)(ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアバージョン３．２)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をK_{off}／K_{on}比として算出した。例として、Chen，Y.，ら，(1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかし、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(ｓｔｏｐ-ｆｌｏｗ ｅｑｕｉｐｐｅｄ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ)(Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ)又は

撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ-Ａｍｉｎｃｏ分光光度計(ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。一実施態様における本発明の「Ｋｄ」又は「Ｋｄ値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(^{125}Ｉ)-標識抗原にてＦａｂを均衡化して、抗Ｆａｂ抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような(Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、抗体のＦａｂ型(バージョン)とその抗原分子を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(ＲＩＡ)で測定される。アッセイの条件を決めるために、ミクロタイタープレート(Ｄｙｎｅｘ)を５μｇ／ｍｌの捕獲抗Ｆａｂ抗体(Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ)を含む５０ｍＭ炭酸ナトリウム(ｐＨ９．６)にて一晩コートして、その後２％(w/v)のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳにて室温(およそ２３℃)で２～５時間、ブロックする。非吸着プレート(Ｎｕｎｃ＃２６９６２０)に、１００ｐＭ又は２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を段階希釈した所望のＦａｂと混合する(Presta等、(1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ-１２の評価と一致する)。ついで所望のＦａｂを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば６５時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で1時間インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳにて８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質(ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ-２０；Ｐａｃｋａｒｄ)を加え、プレートをＴｏｐｃｏｕｎｔγ計測器(Ｐａｃｋａｒｄ)にて１０分間計測する。最大結合の２０％か又はそれ以下濃度のＦａｂを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}-２０００又はＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}-３０００(ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってＫｄ又はＫｄ値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(ＣＭ５，ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ.)を、提供者の指示書に従ってＮ-エチル-Ｎ'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びＮ-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(ｓｉｍｐｌｅ ｏｎｅ-ｔｏ-ｏｎｅ Ｌａｎｇｍｕｉｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｍｏｄｅｌ)(ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアバージョン３．２)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をK_{off}／K_{on}比として算出した。例として、Chen, Y.,ら, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(ｓｔｏｐ-ｆｌｏｗ ｅｑｕｉｐｐｅｄ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ)(Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ)又は撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ-Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【００９６】

一実施態様では、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「k_{on}」は、～１０反応単位(ＲＵ)の固定した抗原ＣＭ５チップを用いて２５℃のＢＩＡｃ

ｏｒｅ^{TM}-２０００又はＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}-３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(ＣＭ５，ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(３-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(ＥＤＣ)及びN-ヒドロキシスクシニミド(ＮＨＳ)で活性化した。抗原を１０ｍＭ 酢酸ナトリウム(ｐＨ４．８)で５μｇ／ｍｌ(～０．２μＭ)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(ＲＵ)がおよそ１０になるように５μｌ／分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。反応しない群をブロックするために１Ｍのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、２倍の段階希釈したＦａｂ(０．７８ｎＭから５００ｎＭ)を２５℃、およそ２５μｌ／分の流速で０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０(ＰＢＳＴ)を含むＰＢＳに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(ｓｉｍｐｌｅ ｏｎｅ-ｔｏ-ｏｎｅ Ｌａｎｇｍｕｉｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｍｏｄｅｌ)(ＢＩＡｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアバージョン３.２)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(Ｋｄ)をK_{off}／K_{on}比として算出した。例として、Chen, Y.,ら, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照。しかし、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(ｓｔｏｐ-ｆｌｏｗ ｅｑｕｉｐｐｅｄ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ)（Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）又は撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ－Ａｍｉｎｃｏ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、ＰＢＳ(ｐＨ７．２)、２５℃の、２０ｎＭの抗抗原抗体(Ｆａｂ型)の蛍光放出強度(励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過＝１６ｎｍ)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。

【００９７】

ここで用いる「実質的に減弱した」、又は「実質的に異なる」という表現は、当業者が２つの数値(一般的には、本発明の抗体に関連するものと参照／対照抗体に関連する他のもの)の差異に、前記値(例えばＫｄ値、ＨＡＭＡ応答)によって測定される生物学的性質の上で統計学的に有意な差異を認める程度に、２つの数値の差が有意に大きいことを意味する。前記２つの値の差異は、参照／対照抗体の値の好ましくは約１０％以上、好ましくは約２０％以上、好ましくは約３０％以上、好ましくは約４０％以上、好ましくは約５０％以上である。

【００９８】

「抗原」は、抗体が選択的に結合しうる予め決められた抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン又は他の天然に生じる化合物又は合成化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが望ましい。本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるＶＬ又はＶＨフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。既存のアミノ酸変化が存在する場合、好ましくは５つのみ、好ましくは４つ以下、又は３つ以下の既存のアミノ酸変化が存在する。既存のアミノ酸変化がＶＨ中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置７１Ｈ、７３Ｈおよび７８Ｈの内の３つ、２つ又は１つのみである、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔおよび／または７８Ａであってよい。一実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【００９９】

本発明の抗体は、第二の抗体が結合するエピトープと同じエピトープへの結合について

競合できる。標準的なインビトロ抗体競合結合分析において、同じ濃度で、一つのモノクローナル抗体が、他の同抗体の結合を４０％以上ブロックする場合、これらモノクローナル抗体は「同じエピトープ」を共有すると考えられる。

【０１００】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Ｋａｂａｔ等によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、ＶＬについて、Ｋａｂａｔ等によると、前記サブグループはサブグループκＩである。一実施態様では、ＶＨについて、Ｋａｂａｔ等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

【０１０１】

「ＶＨサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク」は、Ｋａｂａｔ等の可変重鎖サブグループＩＩＩのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。

【０１０２】

「ＶＬサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Ｋａｂａｔ等の可変軽鎖κサブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。

【０１０３】

「非修飾ヒトフレームワーク」は、アクセプターヒトフレームワーク、例えばアクセプターヒトフレームワーク中の非ヒトアミノ酸置換(一又は複数)に対して欠如しているヒトフレームワークと同じアミノ酸配列を有するヒトフレームワークである。

【０１０４】

本明細書の目的に関して「変更された高頻度可変領域」という場合、その中に一又は複数(例えば１から約１６)のアミノ酸置換を含有する高頻度可変領域を意味する。

【０１０５】

本願明細書の目的に関して「非修飾高頻度可変領域」という場合、それが得られた非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有する高頻度可変領域、すなわち一又は複数のアミノ酸置換がないものである。

【０１０６】

本願明細書において、用いられる「高頻度可変領域」、「ＨＶＲ」、「ＨＶ」又は「ＣＤＲ」という用語は、配列中の高頻度に可変であるおよび／または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、ＶＨ(Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３)の３つと、ＶＬ(Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３)の３つからなる計６つの高頻度可変領域を含んでいる。多くの高頻度可変領域が描写されており、本願明細書に包含される。Ｋａｂａｔ相補性決定領域(ＣＤＲ)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に用いられるものである(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置を指す(Chothia 及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。「接触」高頻度可変領域は、入手可能な複雑な結晶構造の分析に基づくものである。これら高頻度可変領域各々の残基を以下に示す。特に断らない限り、Ｋａｂａｔのナンバリングを利用する。高頻度可変領域の位置は、通常、アミノ酸２４－３４（ＨＶＲ－Ｌ１）、アミノ酸４９－５６（ＨＶＲ－Ｌ２）、アミノ酸８９－９７（ＨＶＲ－Ｌ３）、アミノ酸２６－３５Ａ（ＨＶＲ－Ｈ１）、アミノ酸４９－６５（ＨＶＲ－Ｈ２）、及びアミノ酸９３－１０２（ＨＶＲ－Ｈ３）である。

【０１０７】

高頻度可変領域は、以下の「伸展した高頻度可変領域」を含有してもよい：ＶＬのアミノ酸２４－３６(Ｌ１)、及びアミノ酸４６－５６(Ｌ２)。可変ドメイン残基には、これらの定義の各々にあるように上掲のＫａｂａｔ等に従って番号を付けた。

【０１０８】

本願明細書に定義される「フレームワーク」又は「ＦＲ」残基は、高頻度可変領域残基

以外の、それらの可変ドメイン残基である。

【０１０９】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するもの、及び／又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用してつくられたものである。ヒト抗体のこのような定義から、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。

【０１１０】

「親和性成熟」抗体は、その１つ以上のＣＤＲに１つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、ＶＨドメインとＶＬドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。ＣＤＲおよび／またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994)；Schier他、Gene, 169:147-155 (1995)；Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995)；Jackson他, J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995)；およびHawkins他, J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【０１１１】

「ブロッキング(ブロック)抗体」又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか、減弱するものである。好適なブロッキング抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にないしは完全に阻害する。

【０１１２】

「ＴＡＴ結合オリゴペプチド」はここで記載される様なＴＡＴポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することができ、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約５のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１－７３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なＴＡＴポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第５５５６７６２号、同第５７５０３７３号、同第４７０８８７１号、同第４８３３０９２号、同第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６８９号、同第５６６３１４３号；ＰＣＴ公開第ＷＯ８４／０３５０６号、及びＷＯ８４／０３５６４号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【０１１３】

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

【０１１４】

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

【０１１５】

「ＴＡＴポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「増殖阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なＴＡＴポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の増殖阻害を引き起こすものである。ＴＡＴポリペプチドは、癌細胞の表面上に発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞によって産生され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい増殖阻害抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、２０％より多く、好ましくは約２０％から約５０％、そしてさらに好ましくは５０％よりも多く（例えば、約５０％から約１００％）でＴＡＴ発現腫瘍細胞の増殖を阻害する。一実施態様では、増殖阻害は、細胞培養で約０．１から３０μｇ／ｍｌ又は約０．５ｎＭから２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、増殖阻害を１－１０日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞

の増殖阻害は、下記の実験実施例に記載しているような種々の方法で確かめることができる。約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ体重の抗ＴＡＴ抗体の投与が、最初の抗体の投与から約５日から３ヶ月内、好ましくは約５から３０日内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで増殖阻害性である。

【０１１６】

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

【０１１７】

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

【０１１８】

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

【０１１９】

「Ｆｃレセプター」又は「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なＦｃＲは天然配列ヒトＦｃＲである。さらに好適なＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマレセプター）と結合するもので、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。ＦｃγＲＩＩレセプターには、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性型レセプター」）及びＦｃγＲＩＩＢ（「阻害型レセプター」）が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターＦｃγＲＩＩＡは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ（ｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｒｏｓｉｎｅ-ｂａｓｅｄ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｍｏｔｉｆ ;ＩＴＡＭ）を含んでいる。阻害型レセプターＦｃγＲＩＩＢは

、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ（ｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｒｏｓｉｎｅ-ｂａｓｅｄ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｍｏｔｉｆ;ＩＴＩＭ）を含んでいる（Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照）。ＦｃＲsに関しては、 Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のＦｃＲsはここでの「ＦｃＲ」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性ＩｇＧsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターＦｃＲｎ（Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol.24:249 (1994))も含まれる。

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ様悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(ｓｑｕａｍｏｕｓ ｃｅｌｌ ｃａｎｃｅｒ)(例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃(gastric)又は腹部(stomach)癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓(kidney)又は腎(renal)癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、多発性骨髄腫及びＢ細胞リンパ腫、脳、並びに頭部及び頸部の癌、及び関連した転移が含まれる。

【０１２３】

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

【０１２４】

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞増殖及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

【０１２５】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、生細胞を生育不能にするものである。細胞は、ＴＡＴポリペプチドを発現するもの、好ましくは、同じ組織型の正常細胞と比較してＴＡＴポリペプチドを過剰発現する細胞である。ＴＡＴポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドであることができ、癌細胞により生成され分泌されるポリペプチドであり得る。好ましくは、その細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞障害（ＡＤＣＣ）又は補体依存性障害（ＣＤＣ）によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の無い状態で確かめてもよい。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清（すな

わち、補体の無い）を用いて、免疫エフェクター細胞が無い状態でおこなってもよい。抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が細胞死を誘導するか否かを確かめるために、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー（Moore等 Cytotechnology 17: 1-11(1995)）又は７ＡＡＤの取り込みによって評価した膜整合性の損失を、未処理細胞と関連して評価することができる。好ましい細胞死を誘導する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、ＢＴ４７４細胞でのＰＩ取り込みアッセイで、ＰＩ取り込みを誘導するものである。

【０１２６】

「ＴＡＴ発現細胞」は、細胞の表面上に又は分泌形態で内因性又は形質移入されたＴＡＴポリペプチドを発現する。「ＴＡＴ発現癌」は、細胞表面上に存在するＴＡＴポリペプチドを有する、又はＴＡＴポリペプチドを生成し分泌する細胞を含む癌である。任意には、「ＴＡＴ発現癌」は、その細胞の表面上に十分なレベルのＴＡＴポリペプチドを生成し、抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子はそれへ結合することができ、癌に関して治療的効果を有する。他の実施態様では、任意には「ＴＡＴ発現癌」は、抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子アンタゴニストが結合することができ、癌に対して治療的有効量を有するように十分なレベルのＴＡＴポリペプチドを産生及び分泌する。後者に関して、アンタゴニストは腫瘍細胞による分泌ＴＡＴポリペプチドの産生及び分泌を減少、抑制又は阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。ＴＡＴポリペプチドを「過剰発現」する癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に顕著により高いレベルのＴＡＴポリペプチドを有する、或いは産生及び分泌するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅又は増大した転写又は翻訳によって生じ得る。ＴＡＴポリペプチド過剰発現は、診断又は予後アッセイにおいて、細胞の表面上に存在する、あるいは細胞により分泌されるＴＡＴタンパク質の増大したレベルを評価することによって定量されうる（例えば、ＴＡＴポリペプチドをコードする単離された核酸から、組み換えＤＮＡ技術を用いて調製することができる単離されたＴＡＴポリペプチドに対して調製した抗ＴＡＴ抗体を用いた免疫組織化学アッセイを介して；ＦＡＣＳ分析など）。あるいは、又は付加的に、例えば、ＴＡＴコード化核酸又はその相補鎖と一致する核酸ベースプローブを使用する蛍光インサイツハイブリダイゼーション；（ＦＩＳＨ；１９９８年１０月公開の国際公開９８／４５４７９を参照せよ）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術、例えばリアルタイム定量ＰＣＲ（ＲＴ-ＰＣＲ）を介して、細胞のＴＡＴポリペプチドコード化核酸又はｍＲＮＡのレベルを測定してもよい。また、例えば、抗体ベースアッセイを用いて、血清のような生物学的体液中に流れている抗原を測定することによって、ＴＡＴポリペプチド過剰発現を研究してもよい（同じく、例えば、１９９０年６月１２日に発行の米国特許第４９３３２９４号；１９９１年４月１８日に公開の国際公開９１／０５２６４；１９９５年３月２８日に発行の米国特許第５４０１６３８号；Sias等, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990)を参照せよ）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイは、熟練技術者に入手可能である。例えば、患者の体の中にある細胞を、例えば、放射活性アイソトープのような検出可能な標識で場合によって標識した抗体に曝してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば、放射活性の外部スキャンニングによって、又は以前に抗体へ曝した患者から取り出した生検を分析することによって評価することができる。

【０１２７】

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

【０１２８】
「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子を作製するために、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。
【０１２９】
ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}及びＬｕの放射性同位体）、化学治療薬、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。
【０１３０】
「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロスホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethiylenethiophosphoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)（特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone)）；δ-９-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；β-ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)(HYCAMTIN(登録商標))、ＣＰＴ-１１(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン(acetylcamptothecin)、スコポレクチン(scopolectin)、及び９-アミノカンプトテシン(9-aminocamptothecin)を含む）；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；ＣＣ-１０６５(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；ポドフィリン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)（合成類似体、KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne) 抗生物質等の抗生物質（例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンガンマ１Ｉ及びカリケアマイシンオメガＩ１、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33：183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンＡ(dynemicinＡ）を含むダイネミシン(dynemicin)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediyne) 抗生物質発光団）、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabicin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、ク

ロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin）、６-ジアゾ-５-オキソ-Ｌ-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン（モルフォリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキソルビシン、２-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin）、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin）、マイトマイシンＣなどのマイトマイシン(mitomycins）、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；メトトレキセート及び５-フルオロウラシル(５-ＦＵ）などの抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、６-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、６-アザウリジン(azauridine)、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン(lonidainine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモール(mopidanmol)；ニトラエリン(nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン(losoxantrone)；２-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；２,２',２''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、Ｔ-２トキシン、ベラキュリンＡ(verracurin A)、ロリデンＡ(roridin A)及びアングイデン(anguidine)）；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド（「Ara-C」）；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール(登録商標)パクリタキセル、（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）、ABRAXANE^{TM} クレモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形状のパクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)及びタキソテア(登録商標）ドキセタキセル、（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；GEMZAR(登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；６-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビンブラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(ＶＰ-１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボリン；NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼインヒビターＲＦＳ２０００；ジフルオロメチロールニチン(ＤＭＦＯ)；レチノイン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)(XELODA(登録商標))；上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並び

に、上記のうちの２以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニソロンの併用治療の略記号であるCHOP、及び５-ＦＵとロイコボリン(leucovovin)と組み合わされるオキサリプラチン(ELOXATINTM)による治療投薬計画の略記号であるFOLFOXが含まれる。

【０１３１】

また、癌の増殖を促進しうるホルモンの影響を調節、低減、阻止(ブロック)又は阻害するように作用し、たびたび全身性、又は全身治療の形態にある抗ホルモン剤もこの定義に含まれる。これらはホルモン類自体でもよい。例として、抗卵胞ホルモン類及び、選択的なエストロゲンレセプターモジュレータ類(ＳＥＲＭ)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェン)、EVISTA(登録商標)ラロキシフェン、ドロロキシフェン(droloxifene)、４-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン及びFARESTON(登録商標)トレミフェン、抗プロゲステロン類、エストロゲンレセプター下方制御因子(ＥＲＤ)、卵巣を抑制するか又は一時停止させるように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン(ＬＨＲＨ)アゴニスト、例えば、LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)酢酸ロイプロリド、ゴセレリンアセテート、ブセレリンアセテート及びトリプトレリン(tripterelin)、他の抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びビカルタミド、及び、副腎のエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬、例として、例えば４(５)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN(登録商標) エキセメスタン、ホルメスタン、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標) ボロゾール、FEMARA(登録商標) レトロゾール及びARIMIDEX(登録商標) アナストロゾールなどがある。加えて、化学療法剤のこのような定義には、ビスホスホネート、例えばクロドロン酸(例えば、BONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロン酸、NE-58095、ZOMETA(登録商標) ゾレドロン酸／ゾレドロネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロネート、AREDIA(登録商標)パミドロン酸、SKELID(登録商標) チルドロン酸又はACTONEL(登録商標)、リセドロン酸、並びにトロキサチタビン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの、例として、例えばＰＫＣ-α、Ｒａｆ、H-Ｒａｓ及び上皮性成長因子レセプター(ＥＧＦ-Ｒ)、ワクチン、例えばTHERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン及びVAXID(登録商標)ワクチン、LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ１インヒビター、ABARELIX(登録商標) ｒｍＲＨ、ラパチニブジトシラート(ＥｒｂＢ-２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター、GW572016とも称される)、及び、上記の何れかの薬学的に受容可能な塩類、酸又は誘導体が含まれる。

【０１３２】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞、特にＴＡＴ発現癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、Ｓ期でＴＡＴ発現細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を（Ｓ期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばＧ１停止又はＭ期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なＭ期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類、及びトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またＧ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ期停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル、及びアラ-Ｃである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に１３頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTE

RE（登録商標）、ローン・プーラン ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、ブリストル-マイヤー スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【０１３３】

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

【０１３４】

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

【０１３５】

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び／又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【０１３６】

ＩＩ．本発明の組成物及び方法

Ａ．抗ＴＡＴ抗体

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

１．ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質へ、関連する抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を結合させるために有用である。例えば、この抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、$SOCl_2$、又はＲ及びR^1が異なるアルキル基である$R^1N=C=NR$を用いて結合させることができる。

【０１３７】
動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート１００μｇ又は５μｇ（それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント３容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。１ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の１／５ないし１／１０のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。７ないし１４日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【０１３８】
２．モノクローナル抗体
モノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えＤＮＡ法(米国特許第４８１６５６７号)によって作成することができる。

【０１３９】
ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【０１４０】
このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞（融合のパートナーとも呼ばれる）の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ－欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(ＨＡＴ培地)。

【０１４１】
好ましい融合のパートナーである骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、ＵＳＡより入手し得るＭＯＰＣ-２１およびＭＰＣ-１１マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、ＵＳＡより入手し得るＳＰ-２又はＸ６３-Ａｇ８-６５３細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている（Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984)；Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

【０１４２】
ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)又は酵素結合免疫吸着検定(ＥＬＩＳＡ)によって測定する。

【０１４３】
例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, Anal. Biochem., 107:220(19

80)のスキャッチャード分析によって測定することができる。

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

【０１４８】

抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン（C_H及びC_L）の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第４８１６５６７号；Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する１つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【０１４９】

３．ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-ＴＡＴ抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウ

ス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(ＣＤＲ)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列である、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む［Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)］。

【０１５０】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者［Jones等, Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)］の方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第４８１６５６７号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【０１５１】

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

【０１５２】

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

、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348：552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(Ｖ)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばＭ１３又はｆｄの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはＢ細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3：564-571(1993)を参照せよ。Ｖ-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352：624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のＶ遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのＶ遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, Ｊ. Mol. Biol. 222：581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO Ｊ. 12：725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第５５６５３２号及び同５５７３９０５号を参照のこと。

【０１５６】

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

【０１５７】

４．抗体断片

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

【０１５８】

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直

接産生することができる。Ｆａｂ、Ｆｖ及びＳｃＦｖ抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の産生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。別法として、Ｆａｂ'-ＳＨ断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてＦ(ａｂ')$_2$断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、Ｆ(ａｂ')$_2$断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むＦａｂ及びＦ（ａｂ'）$_2$が、米国特許第５８６９０４６号に記載されている。抗体断片を生成するのための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Ｆｖ断片(ｓｃＦｖ)である。国際公開９３／１６１８５号；米国特許第５５７１８９４号；及び米国特許第５５８７４５８号を参照のこと。Ｆｖ及びｓＦｖは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。ｓＦｖ融合タンパク質は、ｓＦｖのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第５６４１８７０号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【０１５９】

５．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、ＴＡＴタンパク質の２つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とＴＡＴ結合部位とが結合しうる。あるいは、抗ＴＡＴアームは、ＴＡＴ-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、ＦｃγＲＩ(ＣＤ６４)、ＦｃγＲＩＩ(ＣＤ３２)及びＦｃγＲＩＩＩ(ＣＤ１６)等のＩｇＧ(ＦｃγＲ)に対するＦｃレセプター、又はＴ細胞レセプター分子(例えばＣＤ３)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はＴＡＴを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はＴＡＴ結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(ｓａｐｏｒｉｎ)、抗インターフェロン-α、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばＦ(ａｂ')２二重特異性抗体)として調製することができる。

【０１６０】

国際公開第９６／１６６７３号には、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＦｃγＲＩＩＩ抗体が記載されており、米国特許第５８３７２３４号には、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＦｃγＲＩ抗体が開示されている。二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／Ｆｃα抗体は国際公開第９８／０２４６３号に示されている。米国特許第５８２１３３７号は、二重特異性抗-ＥｒｂＢ２／抗-ＣＤ３抗体を教示するものである。

【０１６１】

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

【０１６２】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含むＩｇ重鎖定常ドメインである。軽鎖の結

合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているＤＮＡを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、２または３個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【０１６３】

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

【０１６４】

米国特許第５７３１１６８号に記載された他の手法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第２の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【０１６５】

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

【０１６６】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して$F(ab')_2$断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたＦａｂ'断片はついでチオニトロベンゾアート(ＴＮＢ)誘導体に変換される。Ｆａｂ'-ＴＮＢ誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ'-チオールに再変換し、他のＦａｂ'-ＴＮＢ誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【０１６７】

最近の進歩により、大腸菌からのＦａｂ'-ＳＨ断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等,J.Exp.Med., 175:

217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ(ａｂ')$_2$分子の製造を記述している。各Ｆａｂ'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトＴ細胞、及びＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【０１６８】

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

【０１６９】

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

【０１７０】

６．ヘテロコンジュゲート抗体

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

【０１７１】

７．多価抗体

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

Ｆｃ領域鎖；又はＶＨ-ＣＨ１-ＶＨ-ＣＨ１-Ｆｃ領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも２つ(好ましくは４つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約２～約８の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはＣＬドメインを更に有する。

【０１７２】

８．エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性（ＡＤＣＣ）及び／又は補体依存細胞障害性（ＣＤＣ）を向上させることは望ましい。これは、抗体のＦｃ領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又はさらに、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体－依存細胞性細胞障害性（ＡＤＣＣ）を有する可能性がある。Caron等，Ｊ．Exp．Med．176：1191-1195（1992)及びShopes，Ｂ．Ｊ．Immunol．148：2918-2922（1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等，Cancer Research 53：2560-2565（1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等，Anti-Cancer Drug Design 3：219-230（1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第５７３９２７７号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、ＩｇＧ分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるＩｇＧ分子(例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$又はＩｇＧ$_4$)のＦｃ領域のエピトープを意味する。

【０１７３】

９．免疫複合体

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

【０１７４】

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ及び^{186}Ｒｅが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオナート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬ等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン２，６-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等）を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等，Science 238：1098（19

87)に記載されているように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ-ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開９４／１１０２６参照。

【０１７５】

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

【０１７６】

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗ＴＡＴ抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

【０１７７】

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

【０１７８】

メイタンシノイド－抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第５２０８０２０号、同５４１６０６４号、欧州特許第０４２５２３５Ｂ１号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93：8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体Ｃ２４２に結合するＤＭ１と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体Ａ７、又はＨＥＲ-２／ｎｅｕオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体ＴＡ.１に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。ＴＡ.１-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞ＳＫ-ＢＲ-３におけるインビトロで試験され、細胞当たり３×１０^{5}ＨＥＲ-２表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。Ａ７-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【０１７９】

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

抗ＴＡＴ抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗ＴＡＴ抗体を化学的に結合させることにより調製される。１分子の毒素／抗体は、裸抗体の使用に

おいて細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均３-４のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第５２０８０２０号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

【０１８０】

例えば、米国特許第５２０８０２０号又は欧州特許第０４２５２３５Ｂ１号、Chari等, Cancer Research, 52：127-131(1992)、及び２００４年１０月８日出願の米国特許出願番号第１０／９６０６０２号（ここで参照することにより開示内容を本明細書に包含する）に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分ＳＭＣＣを含む抗体－メイタンシノイドコンジュゲートは、２００４年１０月８日出願の米国特許出願番号第１０／９６０６０２号に開示されているようにして調整することができる。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。更なる結合基をここに開示及び例示する。

【０１８１】

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

【０１８２】

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

【０１８３】

アウリスタチン及びドロスタチン

一部の実施態様では、免疫複合体は、ドラスタチン又はドラスタチンのペプチド類似体及び誘導体である、アウリスタチン（米国特許第５６３５４８３号、同第５７８０５８８号）にコンジュゲートした本発明の抗体を含む。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管の動態、ＧＴＰ加水分解、核分裂、及び細胞分裂を妨害することが判明しており（Woyke等、(2001) Antimicrob. Agents and Chemother 45(12):3580-3584）、抗癌活性（米国特許第５６６３１４９号）及び抗真菌活性（Pettit等、(1998) Antimicrob. Agents Chemother 42:2961-2965）を有する。ドラスチン又はアウリスタチンの薬剤成分は、ペプチド剤成分のＮ（アミノ）末端又はＣ（カルボキシル）末端で抗体に付着させることができ

る（ＷＯ０２／０８８１７２）。

【０１８４】

例示的なアウリスタチンの実施態様には、Senter等、Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623、（２００４年３月２８日）に開示された、Ｎ末端にリンクしたモノメチルアウリスタチン薬剤成分ＤＥ及びＤＦ（即ちＭＭＡＥ及びＭＭＡＦ）が含まれる。前記文献の開示内容の全体を、参照により本明細書に包含する。

【０１８５】

一般的に、ペプチドに基づく薬剤成分は、２以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することにより調整することができる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知の液相合成法（E. Schroder及びK. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press参照）に従って調整することができる。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第５６３５４８３号、同第５７８０５８８号、Pettit等、(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465、Pettit等、(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277、Pettit, G.R.等、 Synthesis, 1996, 719-725、Pettit等、(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863、及びDoronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784に記載の方法に従って調製することができる。

【０１８６】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗ＴＡＴ抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖ＤＮＡ破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第５７１２３７４号、同５７１４５８６号、同５７３９１１６号、同５７６７２８５号、同５７７０７０１号、同５７７０７１０号、同５７７３００１号、同５８７７２９６号(全て、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄ Ｃｏｍｐａｎｙ)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-アセチル-γ_1^I、ＰＳＡＧ及びθ^I_1(Hinman等, Cancer Research, 53：3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58：2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるＱＦＡである。カリケアマイシン及びＱＦＡは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【０１８７】

他の細胞障害剤

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

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素Ａ鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)プロテイン(ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ及びＰＡＰ-Ｓ)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、１９９３年１０月２８日公開の国際公開第９３／２１２３２号を参照のこと。

【０１８８】

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

【０１８９】

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

【０１９０】

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

【０１９１】

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

【０１９２】

本発明の化合物として、（例えば米国イリノイ州ロックフォードのＰｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ.より）市販のクロスリンカー試薬、即ちＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、及びスルホ－ＳＭＰＢ、及びＳＶＳＢ（サクシニミジル－（４－ビニルスルホン）安息香酸）を用いて調製したＡＤＣを特に考慮するが、これに限定されない。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの４６７－４９８頁を参照のこと。

【０１９３】

別法として、抗ＴＡＴ抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え

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

【０１９４】

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

【０１９５】

１０．免疫リポソーム

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

【０１９６】

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

【０１９７】

Ｂ．ＴＡＴ結合オリゴペプチド

本発明のＴＡＴ結合オリゴペプチドはここで記載される様なＴＡＴポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約５のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１－７３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なＴＡＴポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。ＴＡＴ結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第５５５６７６２号、同第５７５０３７３号、同第４７０８８７１号、同第４８３３０９２号、同第５２２３４０９号、同第５４０３４８４号、同第５５７１６８９号、同第５６６３１４３号；ＰＣＴ公開第ＷＯ８

４／０３５０６号、及びＷＯ８４／０３５６４号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【０１９８】

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

【０１９９】

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

【０２００】

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

単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌（Staphlylococcus aureus）タンパク質Ａの親和性タグとしての使用も報告されている（Li等，(1998) Mol Biotech., 9:187）。ＷＯ９７／４７３１４は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はＷＯ９７／０９４４６に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第５４９８５３８号、同第５４３２０１８号、及びＷＯ９８／１５８３３に記載されている。

【０２０１】

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

【０２０２】

Ｃ．ＴＡＴ結合有機分子

ＴＡＴ結合有機分子とは、ここに記載されるようなＴＡＴポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。ＴＡＴ結合有機分子は既知の方法（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３及びＷＯ００／３９５８５号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。ＴＡＴ結合有機分子は通常、約２０００ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約１５００、７５０、５００、２５０又は２００ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なＴＡＴポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのような有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばＰＣＴ公開第ＷＯ００／００８２３及びＷＯ００／３９５８５号参照）。ＴＡＴ結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、Ｎ置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアン酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【０２０３】

Ｄ．所望する特性を有する抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド及びＴＡＴ結合有機分子のスクリーニング

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

【０２０４】

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

レーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の増殖を阻害することが知られている増殖阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの増殖阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、ＴＡＴポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子は、ある実施態様では約０．５から３０μｇ／ｍｌの抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約２５－１００％、より好ましくは約３０－１００％、そしてさらにより好ましくは約５０－１００％又は７０－１００％のＴＡＴ発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。増殖阻害は、細胞培養で、約０．５から３０μｇ／ｍｌ又は０．５ｎＭから２００ｎＭの抗体濃度で測定することができ、その増殖阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後１-１０日で確かめられる。約１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ体重での抗ＴＡＴ抗体の投与が、抗体の最初の投与から約５日から３ヶ月、好ましくは約５から３０日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで増殖阻害作用がある。

【０２０５】

細胞死を誘発する抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー又は７ＡＡＤの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。ＰＩ取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。ＴＡＴポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗ＴＡＴ抗体（例えば約１０μｇ／ｍｌ）、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を３日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために３５ｍｍのストレーナキャップ付き１２×７５チューブ(チューブ当たり１ｍｌ、処理グループ当り３チューブ)に等分する。次いで、チューブへＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を与える。試料をＦＡＣＳＣＡＮ(登録商標）フローサイトメータとＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ(登録商標）セルクエスト(ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ)ソフトウエア(Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ)を使用して分析してもよい。ＰＩ取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子は、細胞死誘発抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子として選択することができる。

【０２０６】

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

【０２０７】

Ｅ．抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ＡＤＥＰＴ)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開８１／０１１４５を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ＡＤＥＰＴにおいて使用することができる。例えば国際公開８８／０７３７８及び米国特許第４９７５２７８号を参照されたい。

【０２０８】

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

【０２０９】

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

【０２１０】

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

【０２１１】

Ｆ．完全長ＴＡＴポリペプチド

本発明は、本出願でＴＡＴポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のＴＡＴポリペプチドをコードするｃＤＮＡ（部分及び完全長）が同定され単離された。

【０２１２】

下記の実施例に開示するように、種々のｃＤＮＡクローンがＡＴＣＣに寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したＴＡＴポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【０２１３】

Ｇ．抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチド変異体

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

【０２１４】

ここに記載した抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第５３６４９３４号に示す保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果として天然配列抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化を生じる、抗体又はポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異は、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の他の任意のアミノ酸との置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失され得るかを確かめる指針は、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じたアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【０２１５】

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

【０２１６】

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

【０２１７】

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換の項目で表６に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表１に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

表1

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

【０２１８】

抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（ｂ）標的部位の電荷又は分子疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：
（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；
（２）中性の親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；Ａｓｎ；Ｇｌｎ
（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；
（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；及び
（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。
非保存的置換は、これらの分類の１つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、又はより好ましくは、残された（非保存）部位に導入されうる。

【０２１９】

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

【０２２０】

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

【０２２１】

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

【０２２２】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性成熟がふくまれる。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位（例えば、６－７部位）を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合物として一価形態で表示される。ファージ表示変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発

を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトＴＡＴポリペプチドとの接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

【０２２３】

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

【０２２４】

Ｈ．抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの修飾

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

【０２２５】

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

【０２２６】

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

【０２２７】

抗体及び他のポリペプチドのグリコシル化とは、典型的にはＮ-結合又はＯ-結合のいずれかである。Ｎ-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Ｘがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-Ｘ-セリン及びアスパラギン-Ｘ-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。Ｏ-結合グリコシル化と

は、５-ヒドロキシプロリン又は５-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖をヒドロキシアミノ酸へ付与することを指す。

【０２２８】

抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について）。抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドアミノ酸配列は、ＤＮＡレベルでの変化を通して、特に、コドンが所望するアミノ酸へ翻訳される、あらかじめ選択した塩基での抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドをコードするＤＮＡを変異させることによって、場合によっては改変され得る。

【０２２９】

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

【０２３０】

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

【０２３１】

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

【０２３２】

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

【０２３３】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、

エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ－ヒスチジン（ポリ-Ｈｉｓ）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（ｐｏｌｙ-ｈｉｓ-ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ ＨＡタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)］；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体［Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210(1988)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等, Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)］を含む。

【０２３４】

それに換わる実施態様では、キメラ分子は抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも１つの可変領域に換えて抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ分子のヒンジ、CH_2及びCH_3、又はヒンジ、CH_1、CH_2及びCH_3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、１９９５年６月２７日発行の米国特許第５４２８１３０号を参照のこと。

【０２３５】

Ｉ．抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの調製

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

【０２３６】

１．抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドをコードするＤＮＡの単離

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

【０２３７】

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質

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

【０２３８】

ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で良く知られている。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、疑陽性が最小化されるよう十分な長さであり、十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、^{32}Ｐ標識ＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用を含む。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrookら, に示されている。

【０２３９】

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

【０２４０】

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

【０２４１】

２．宿主細胞の選択及び形質転換

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

【０２４２】

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315(1983)及び１９８９年６月２９日公開の国際公開８９／０５８５９に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第４３９９２１６号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, P

roc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【０２４３】

ここに記載のベクターにＤＮＡをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物には、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれる。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ３１４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７３２５）及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ５３６３５）である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌属、例えば大腸菌（E. coli）、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium）、セラチア、例えばセラチア・マルセサンス(Serratia marcescans) 、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブチルス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)（例えば、１９８９年４月１２日発行のＤＤ２６６７１０に記載されたバチルス・リチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ生成物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ ５５,２４４）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ-ｌａｃ)１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｒｂｓ７ ｉｌｖＧ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び１９９０年８月７日発行の米国特許第４９４６７８３号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【０２４４】

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

【０２４５】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカ

ロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)（Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981];１９８５年５月２日公開の欧州特許第１３９３８３号）；クリュイベロミセス宿主(Kluyveromyces hosts)（米国特許第４９４３５２９号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)）、例えばクリュイベロミセスラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS 683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983]）、クリュイベロミセス・フラギリス(K. fragilis)（ＡＴＣＣ１２４２４）、クリュイベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)（ＡＴＣＣ１６０４５）、クリュイベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii)（ＡＴＣＣ２４１７８）、クリュイベロミセス・ワルチイ(K. waltii)（ＡＴＣＣ５６５００）、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilarum)（ＡＴＣＣ３６９０６； Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990)）、クリュイベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクリュイベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（欧州特許第４０２２２６号）；ピシア・パストリス(Pichia pastoris)（欧州特許第１８３０７０号； Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988]）；カンジダ；トリコデルマ・レーシア(Trichoderma reesia)（欧州特許第２４４２３４号）；アカパンカビ（Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]）；シュワニオマイセス(Schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)（１９９０年１０月３１日公開の欧州特許第３９４５３８号）；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)（１９９１年１月１０日公開の国際公開９１／００３５７）；及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス（Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]）及びアスペルギルス・ニガー（Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]）が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(Ｃ１化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピシア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

【０２４６】

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

【０２４７】

しかし、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養(組織培養)した脊椎動物細胞の増殖がルーチン作業となった。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０(ＣＯＳ－７, ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１)で形質転換させたサル腎ＣＶ１細胞株；ヒト胚芽腎細胞株(２９３又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された２９３細胞, Graham等,J.Gen Virol.,36:59 (1977))；ベビーハムスター腎細胞(ＢＨＫ, ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０)；チヤイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ(ＣＨＯ, Urlaub等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 4216 (1980));マウスセルトリ細胞(ＴＭ４, Mather,Biol.Reprod.,23：243-251 (1980))

；サル腎細胞(ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０)；アフリカミドリザル腎細胞(ＶＥＲＯ－７６，ＡＴＣＣ ＣＲＬ-１５８７)；ヒト頚管腫瘍細胞(ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ２)；イヌ腎細胞(ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ ＣＣＬ３４)；バッファローラット肝細胞(ＢＲＬ ３Ａ，ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２)；ヒト肺細胞(Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５)；ヒト肝細胞(Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ ８０６５)；マウス乳房腫瘍細胞(ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１)；ＴＲＩ細胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 (1982))；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；及びヒト肝臓癌細胞（ＨｅｐＧ２）である。

【０２４８】

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

【０２４９】

３．複製可能なベクターの選択及び使用

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

【０２５０】

ＴＡＴは直接的に組換え手法によって生成されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのＮ-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生成される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチド-コード化ＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクリュイベロミセス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第５０１０１８２号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(１９９０年４月４日発行の欧州特許第３６２１７９号)、又は１９９０年１１月１５日に公開された国際公開９０／１３６４６に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【０２５１】

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

【０２５２】

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（ａ）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセー

トあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、（ｂ）栄養要求性欠陥を補い、又は（ｃ）複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子がある。

【０２５３】

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

【０２５４】

発現及びクローニングベクターは、通常、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチド-コード化核酸配列に作用可能に結合し、ｍＲＮＡ合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の有能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系［Chang等，Nature，275:615 (1978)； Goeddel等，Nature，281:544 (1979)］、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系［Goeddel，Nucleic Acids Res.，8:4057 (1980)；欧州特許第３６７７６号］、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーター［deBoer等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，80:21-25 (1983)］を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドをコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(Ｓ.Ｄ.)配列を有する。

【０２５５】

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

【０２５６】

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

【０２５７】

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

【０２５８】
より高等の真核生物による抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約１０から３００塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するＤＮＡのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のＳＶ４０エンハンサー(１００－２７０塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドコード化配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから５’位に位置している。
【０２５９】
また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの通常は５’、時には３’の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。
【０２６０】
組換え脊椎動物細胞培養での抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第１１７０６０号；及び欧州特許第１１７０５８号に記載されている。
【０２６１】
４．宿主細胞の培養
本発明の抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のＦ１０(シグマ)、最小必須培地((ＭＥＭ),シグマ)、ＲＰＭＩ-１６４０(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((ＤＭＥＭ),シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第４７６７７０４号；同４６５７８６６号；同４９２７７６２号；同４５６０６５５号；又は同５１２２４６９号；国際公開第９０／０３４３０号；国際公開第８７／００１９５号；又は米国特許再発行第３０９８５号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培養培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び／又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばＨＥＰＥＳ)、ヌクレオシド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン（商品名）薬)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、ｐＨ等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。
【０２６２】
５．遺伝子増幅／発現の検出
遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法［Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980)］、ドットブロット法(ＤＮＡ分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖、及びＤＮＡ－Ｒ

ＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

【０２６３】

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

【０２６４】

６．抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの精製

抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-Ｘ１００)を用いて又は酵素的切断により膜から引き離すことができる。抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

【０２６５】

抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドは、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過;ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及び抗ＴＡＴ抗体及びＴＡＴポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生成方法及び特に生成される特定の抗ＴＡＴ抗体又はＴＡＴポリペプチドの性質に依存する。

【０２６６】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第１工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(ｐＨ３．５)、ＥＤＴＡ、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(ＰＭＳＦ)の存在下で、３０分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばＡｍｉｃｏｎ又はＭｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｐｅｌｌｉｃｏｎの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質が外来性の汚染菌の増殖を防止するために含められ得る。

【０２６７】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインＡの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンＦｃ領域の種及びアイソタイプ

に依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、又はγ４重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる（Lindmark等，J．Immunol．Meth．62：1-13 [1983]）。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ３に推奨されている（Guss等，EMBO J．5：15671575 [1986]）。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ ＡＢＸ(商標)樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，ＮＪ）が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラム）上でのヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

【０２６８】

任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約２．５－４．５のｐＨでの溶離バッファーを用いて、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度（例えば、約０－０．２５Ｍ塩）で実施される。

【０２６９】

Ｊ．製薬製剤

本発明に係る抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド、ＴＡＴ結合有機分子及び／又はＴＡＴポリペプチドの治療的製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド又は有機分子を凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th 版，Osol，A．編．[1980]）。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、酢酸、Ｔｒｉｓ、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどのトニシファイヤー；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ポリソルベート等の界面活性剤；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ-タンパク質錯体）；及び／又はトゥイーン(ＴＷＥＥＮ)（登録商標）、プルロニクス(ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ)（登録商標）、又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。抗体は、好ましくは５－２００ｍｇ／ｍｌの間、好ましくは１０－１００ｍｇ／ｍｌの間の濃度の抗体で構成される。

【０２７０】

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

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

【０２７１】

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

【０２７２】

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

【０２７３】

Ｋ．抗ＴＡＴ抗体、ＴＡＴ結合オリゴペプチド又はＴＡＴ結合有機分子を用いる診断及び治療

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

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

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

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

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

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

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【０２７６】

上に記載したように、本発明の抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子には、種々の非治療的用途がある。本発明の抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、ＴＡＴ

ポリペプチドを発現している癌の診断及び染色にとって有用である（例えば、ラジオイメージングで）。他の細胞の精製の工程として、混合細胞の集団からＴＡＴ発現細胞を死滅させて除去するために、この抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、また、例えば、ＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットにおいて、インビトロでＴＡＴポリペプチドの検出及び定量化のために、細胞からＴＡＴポリペプチドを精製又は免疫沈降するのに有用である。

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

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

【０２８２】

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

【０２８３】

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

【０２８４】

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

【０２８５】

疾患の予防又は治療のための投与量及び方式は、公知の基準に従い、医師により選択されるであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子の適切な用量は、上記のような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び過程、抗体、オリゴペプチド又は有機分子を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体、オリゴペプチド又は有機分子の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。好ましくは、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は静脈注入又は皮下注射により投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、体重１ｋｇ当たり約１μｇないし５０ｍｇ(例えば０．１－１５ｍｇ／ｋｇ／用量)の抗体を患者への最初の投与量の候補とすることができる。投薬計画は、約４ｍｇ／ｋｇの初期負荷量、続いて１週間に約２ｍｇ／ｋｇの維持用量の抗ＴＡＴ抗体を投与することからなってよい。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、状態によっては、疾患の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。この治療の進行状態は、医師又は他の当業者に公知の基準をベースにした通常の方法やアッセイで容易にモニターされる。

【０２８６】

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

【０２８７】
核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという２つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常は抗体が必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第４８９２５３８号及び第５２８３１８７号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかによって異なる。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【０２８８】
現在好まれているインビボ核酸移入技術は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスＩウイルス、又はアデノ関連ウイルス）、及び脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ-Ｃｈｏｌである）での形質移入を含む。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第９３／２５６７３号及びそこに引用された参考文献も参照。

【０２８９】
本発明の抗ＴＡＴ抗体は、ここでの「抗体」の定義により包含される様々な形態であってよい。よって、抗体には、完全長又は無傷抗体、抗体断片、天然配列抗体又はアミノ酸変異体、ヒト化、キメラ又は融合抗体、免疫コンジュゲート、及びそれらの機能的断片が含まれる。融合抗体において、抗体配列は異種ポリペプチド配列に融合している。抗体はＦｃ領域が修飾されて、所望のエフェクター機能を提供することができる。以下の段落に詳細に記載されるように、適切なＦｃ領域と共に、細胞表面に結合したそのままの抗体は、例えば抗体-依存性細胞障害(ＡＤＣＣ)を介して又は補体依存性細胞障害において補体を補充することにより、又は他のいくつかのメカニズムにより、細胞障害性を誘発し得る。また、副作用及び治療による合併症を最小にするようにエフェクター機能を除去又は低減することが望ましい場合には、所定の他のＦｃ領域が使用される。

【０２９０】
一実施態様では、抗体は、本発明の抗体と同じエピトープとの結合に関して競合するか、又はこれに実質的に結合する。また、本発明の抗ＴＡＴ抗体の生物学的特徴を有する抗体、特にインビボ腫瘍ターゲティング及び任意の細胞増殖阻害又は細胞障害特性を含むものが考察される。
上述した抗体の産生方法をここで詳細に記載する。

【０２９１】
本抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物におけるＴＡＴ-発現癌の治療又は一又は複数の癌の徴候の緩和に有用である。このような癌には、前立腺癌、尿道癌、肺癌、乳癌、結腸癌及び卵巣癌、特に前立腺癌腫(ｐｒｏｓｔａｔｅ ａｄｅｎｏｃａｒｃｉｎｏｍａ)、腎細胞癌腫、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺細胞の扁平癌腫、及び胸膜中皮腫が含まれる。癌には、上述した任意の転移性癌が含まれる。抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、哺乳動物においてＴＡＴポリペプチドを発現している癌細胞の少なくとも一部に結合可能である。好ましい実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、インビボ又はインビトロで細胞のＴＡＴポリペプチドに結合して、ＴＡＴ-発現腫瘍細胞を破壊又は死滅させるか、又はこのような腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的である。このような抗体には、裸の抗ＴＡＴ抗体(いかなる薬剤にも結合していない)が含まれる。細胞傷害性又は細胞増殖阻害特性を有する裸の抗体は、細胞障害剤と併用すると、より強く腫瘍細胞を破壊することが可能である。例えば細胞障害剤と抗体とを結合させ、以下に

記載するような免疫コンジュゲートを形成させることによって、細胞障害特性を抗ＴＡＴ抗体に付与することができる。この細胞障害剤又は増殖阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシン又はメイタンシノイド、及びそれらの類似物又は誘導体が好ましい。

【０２９２】

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

【０２９３】

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

【０２９４】

本発明は、抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を治療的有効量、哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるＴＡＴポリペプチド-発現癌の治療又は癌の一又は複数の徴候を緩和するのに有用な方法を提供する。抗体、オリゴペプチド又は有機分子治療組成物は、医師の指示通りに、短い期間(急性)又は慢性的に、又は間欠的に投与することができる。また、ＴＡＴポリペプチド-発現細胞の増殖を阻害し、該細胞を殺傷する方法も提供される。

【０２９５】

本発明は少なくとも一つの抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキット又は製造品も提供する。抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットは、例えばＴＡＴ細胞殺傷アッセイ、細胞からのＴＡＴポリペプチドの精製又は免疫沈降における用途が見出されている。例えば、ＴＡＴの単離及び精製のためには、キットはビーズ(例えばセファロースビース)に結合した抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有することができる。インビトロにおけるＴＡＴの検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットにおける抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有するキットを提供することもできる。検出に有用なこのような抗体、オリゴペプチド又は有機分子は、蛍光又は放射標識などの標識が付されて提供され得る。

【０２９６】

Ｌ．製造品及びキット

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

【０２９７】

種々の目的、例えばＴＡＴ発現細胞殺傷アッセイ、細胞からのＴＡＴポリペプチドの精製又は免疫沈降に有用なキットも提供される。ＴＡＴポリペプチドの単離及び精製において、キットはビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合した抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むことが可能である。インビトロにおけるＴＡＴポリペプチドの検出及び定量化、例えばＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットのための抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含むキットを提供することもできる。製造品と同様、キットも容器と容器に付与又は添付されるラベル又は能書を含んでなる。容器には少なくとも１つの本発明の抗ＴＡＴ抗体、オリゴペプチド又は有機分子を含有する組成物が収容されている。希釈液及びバッファー、コントロール抗体等を収容する付加的な容器を具備していてもよい。ラベル又は能書は、組成物についての記載、並びに意図するインビトロ又は診断での使用に関する注意書きを提供するものである。

【０２９８】

Ｍ．ＴＡＴポリペプチド及びＴＡＴ-ポリペプチドコード核酸の用途

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

【０２９９】

完全長天然配列ＴＡＴ遺伝子又はその一部は、完全長ＴＡＴｃＤＮＡの単離又はここに開示した天然ＴＡＴ配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のｃＤＮＡ（例えば、ＴＡＴの天然発生変異体又は他の種からのＴＡＴをコードするもの）の単離のために、ｃＤＮＡライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約２０～約５０塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列ＴＡＴのプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から判定され得る。例えば、スクリーニング法は、ＴＡＴ遺伝子のコード化領域を周知のＤＮＡ配列を用いて単離して約４０塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、^{32}Ｐ又は^{35}Ｓ等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン／ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識され得る。本発明のＴＡＴ遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ又はｍＲＮＡのライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーにプローブがハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術を、以下の実施例において更に詳細に記載する。本出願に開示されている任意のＥＳＴ配列は、ここに開示している方法を利用して、同じようにプローブとして用い得る。

【０３００】

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

【０３０１】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成を

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

【０３０２】

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

【０３０３】

ＴＡＴタンパク質の発現を阻害するのに有用な好適なアンチセンス化合物の特定の例には、修飾骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには骨格にリン原子を保持しているものと骨格にリン原子を有していないものが含まれる。この明細書の目的のために、また当該分野でしばしば引用されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドはまたオリゴヌクレオシドであると考えることができる。好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えばホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネートで、３'-アルキレンホスホネート、５'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むもの、ホスフィネート、ホスホルアミデートで、３'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むもの、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェートで通常の３'-５'結合を持つもの、これらの２'-５'結合類似体、及び一又は複数のヌクレオチド間結合が３'から３'、５'から５'又は２'から２'結合である逆転された極性を持つものが含まれる。逆転した極性を持つ好適なオリゴヌクレオチドは単一の３'から３'結合を最も３'側のヌクレオチド間結合、つまり、非塩基性(abasic)でありうる単一の逆転ヌクレオシド残基（核酸塩基がないか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する）を含む。様々な塩、混合された塩及び遊離の酸形態がまた含まれる。リン含有結合の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許３６８７８０８；４４６９８６３；４４７６３０１；５０２３２４３；５１７７１９６；５１８８８９７；５２６４４２３；５２７６０１９；５２７８３０２；５２８６７１７；５３２１１３１；５３９９６７６；５４０５９３９；５４５３４９６；５４５５２３３；５４６６６７７；５４７６９２５；５５１９１２６；５５３６８２１；５５４１３０６；５５５０１１１；５５６３２５３；５５７１７９９；５５８７３６１；

５１９４５９９；５５６５５５５；５５２７８９９；５７２１２１８；５６７２６９７及び５６２５０５０が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０３０４】

リン原子をそこに含まない好適な修飾オリゴヌクレオチド骨格は短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は一又は複数の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有するもの；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；及び混合Ｎ、Ｏ、Ｓ及びCH_2成分部分を有する他のものが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許５０３４５０６；５１６６３１５；５１８５４４４；５２１４１３４；５２１６１４１；５２３５０３３；５２６４５６２；５２６４５６４；５４０５９３８；５４３４２５７；５４６６６７７；５４７０９６７；５４８９６７７；５５４１３０７；５５６１２２５；５５９６０８６；５６０２２４０；５６１０２８９；５６０２２４０；５６０８０４６；５６１０２８９；５６１８７０４；５６２３０７０；５６６３３１２；５６３３３６０；５６７７４３７；５７９２６０８；５６４６２６９及び５６７７４３９が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０３０５】

他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、糖とヌクレオシド間結合の双方、つまりヌクレオチド単位の骨格が新規な基と置換される。ベース単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。一つのそのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を持つことが示されているオリゴヌクレオチド擬態体はペプチド核酸（ＰＮＡ）と呼ばれる。ＰＮＡ化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。ＰＮＡ化合物の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許５５３９０８２；５７１４３３１；及び５７１９２６２が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。ＰＮＡ化合物の更なる教示はNielsen等, Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

【０３０６】

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

【０３０７】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一又は複数の置換糖部分を含みうる。好適なオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む：ＯＨ；Ｆ；Ｏ-アルキル、Ｓ-アルキル、又はＮ-アルキル；Ｏ-アルケニル、Ｓ-アルケニル又はＮ-アルケニル；Ｏ-アルキニル、Ｓ-アルキニル又はＮ-アルキニル；又はＯ-アルキル-Ｏ-アルキルを含み、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は非置換C_1～C_{10}アルキル又はC_2～C_{10}アルケニル及びアルキニルでありうる。特に好ましいものは$O[(CH_2)_nO]_mCH_3$、$O(CH_2)_nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、及び$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$であり、ここでｎ及びｍは１から約１０であ

る。他の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは2'位に次のものの一つを含む：C_1～C_{10}低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル又はO-アラルキル、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善する基、オリゴヌクレオチドの薬理的性質を改善する基、及び同様な性質を持つ他の置換基。好適な修飾は2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$)（Martin等, Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504）、つまりアルコキシアルコキシ基を含む。更に好適な修飾は、以下の実施例に記載されているように2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、つまり2'-DMAOEとしても知られている$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られている）、つまり2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)を含む。

【0308】

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

【0309】

他の好適な修飾は2'-メトキシ(2'-O-CH_3)、2'-アミノプロポキシ(2'-O$CH_2CH_2CH_2NH_2$)、2'-アリル(2'-CH_2-CH=CH_2)、2'-O-アリル(2'-O-CH_2-CH=CH_2)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾はアラビノ（上）位置又はリボ（下）位置においてでありうる。好適な2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾はまたオリゴヌクレオチドの他の位置、特に3'末端ヌクレオチドの糖の3'位又は2'－5'結合オリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位になすことができる。オリゴヌクレオチドはまたペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬態体を有しうる。そのような修飾糖構造の調製を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許４９８１９５７；５１１８８００；５３１９０８０；５３５９０４４；５３９３８７８；５４４６１３７；５４６６７８６；５５１４７８５；５５１９１３４；５５６７８１１；５５７６４２７；５５９１７２２；５５９７９０９；５６１０３００；５６２７０５３；５６３９８７３；５６４６２６５；５６５８８７３；５６７０６３３；５７９２７４７；及び５７００９２０が含まれ、その各々は出典明示により全体がここに取り込まれる。

【0310】

オリゴヌクレオチドにはまた核酸塩基（当該分野ではしばしば単に「塩基」と称される）の修飾又は置換が含まれうる。ここで使用される場合、「未修飾の」又は「天然の」核酸塩基にはプリン塩基アデニン（A）及びグアニン（G）及びピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-プロピル及び他のアデニン及びグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロポニル（-C≡C-CH_3又はCH_2-C≡CH）ウラシル及びシトシン及び他のピリミジン塩基のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン類及びグアニン類、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル類及びシトシン類、7-メチル

グアニン及び７-メチルアデニン、２-Ｆ-アデニン、２-アミノ-アデニン、８-アザグアニン及び８-アザアデニン、７-デアザグアニン及び７-デアザアデニン及び３-デアザグアニン及び３-デアザアデニンが含まれる。更なる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン類、例えばフェノキサジンシチジン(１Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾキサジン-２(３Ｈ)-オン)、フェノチアジンシチジン(１Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾチアジン-２(３Ｈ)-オン)、Ｇ-クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン（例えば９-(２-アミノエトキシ)-Ｈ-ピリミド[５,４-ｂ][１,４]ベンゾキサジン-２(３Ｈ)-オン）、カルバゾールシチジン(２Ｈ-ピリミド[４,５-ｂ]インドール-２-オン)、ピリドインドールシチジン(Ｈ-ピリド[３',２'：４,５]ピロロ[２,３-ｄ]ピリミジン-２-オン)が含まれる。修飾核酸塩基にはまたプリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば７-デアザ-アデニン、７-デアザグアノシン、２-アミノピリジン及び２-ピリドンが含まれうる。更なる核酸塩基には米国特許第３６８７８０８号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, ８５８-８５９頁, Kroschwitz, J.I.編 John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、及びEnglisch等, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30,613に開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のある種のものは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、５-置換ピリミジン、６-アザピリミジン及びＮ-２、Ｎ-６及びＯ-６置換プリンで、２-アミノプロピルアデニン、５-プロピニルウラシル及び５-プロピニルシトシンを含むものが含まれる。５-メチルシトシン置換は０．６－１．２℃だけ核酸二重安定性を増大させることが知られており（Sanghvi等, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278）、より詳細には２'-Ｏ-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、好適な塩基置換である。修飾核酸塩基の製造を教唆する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許３６８７８０８；並びに米国特許４８４５２０５；５１３０３０２；５１３４０６６；５１７５２７３；５３６７０６６；５４３２２７２；５４５７１８７；５４５９２５５；５４８４９０８；５５０２１７７；５５２５７１１；５５５２５４０；５５８７４６９；５５９４１２１；５５９６０９１；５６１４６１７；５６４５９８５；５８３０６５３；５７６３５８８；６００５０９６；５６８１９４１及び５７５０６９２が含まれ、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０３１１】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを亢進する一又は複数の部分又はコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合させる。本発明の化合物は第１級又は第２級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合したコンジュゲート基を含みうる。本発明のコンジュゲート基には、介入物（インターカレーター）、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬理的性質を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、カチオン脂質、リン脂質、カチオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が含まれる。この発明の文脈における薬理学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を亢進し、及び／又はＲＮＡとの配列特異的ハイブリダイゼーションを補強する基が含まれる。この発明の文脈における薬物動態学的性質を増強する基には、オリゴマー取り込み、分散、代謝又は排出を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には限定されるものではないが、脂質分子、例えばコレステロール部分（Letsinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸（Manoharan等, Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1063）、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan等, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660-306-309; Manoharan等, Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser等, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基（Saison-Behmoaras等, EMBOJ., 1991, 10

, 1111-1118; Kabanov等, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等, Biochimie, 1993, 75, 49-54）、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム１,２-ジ-Ｏ-ヘキサデシル-rac-グリセロ-３-Ｈ-ホスホナート（Manoharan等, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea等, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖（Manoharan等, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973）、又はアダマンタン酢酸（Manoharan等、Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654）、パルミチル部分（Mishra等, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237）、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた活性な薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(Ｓ)-(＋)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、２,３,５-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗菌剤又は抗生物質にコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲート及びその製造方法は米国特許出願第０９／３３４１３０号（１９９９年６月１５日出願）及び米国特許４８２８９７９；４９４８８８２；５２１８１０５；５５２５４６５；５５４１３１３；５５４５７３０；５５５２５３８；５５７８７１７；５５８０７３１；５５８０７３１；５５９１５８４；５１０９１２４；５１１８８０２；５１３８０４５；５４１４０７７；５４８６６０３；５５１２４３９；５５７８７１８；５６０８０４６；４５８７０４４；４６０５７３５；４６６７０２５；４７６２７７９；４７８９７３７；４８２４９４１；４８３５２６３；４８７６３３５；４９０４５８２；４９５８０１３；５０８２８３０；５１１２９６３；５２４１１３６；５０８２８３０；５１１２９６３；５２１４１３６；５２４５０２２；５２５４４６９；５２５８５０６；５２６２５３６；５２７２２５０；５２９２８７３；５３１７０９８；５３７１２４１；５３９１７２３；５４１６２０３；５４５１４６３；５５１０４７５；５５１２６６７；５５１４７８５；５５６５５５２；５５６７８１０；５５７４１４２；５５８５４８１；５５８７３７１；５５９５７２６；５５９７６９６；５５９９９２３；５５９９９２８及び５６８８９４１に記載され、その各々は出典明示によりここに取り込まれる。

【０３１２】

与えられた化合物の全ての位置を一様に修飾する必要はなく、実際、一を超える上述の修飾を単一化合物中に又はオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオシドにさえ導入することができる。本発明はまたキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈における「キメラ」アンチセンス化合物又は「キメラ」は、それぞれが少なくとも一のモノマー単位、つまりオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドからなる２以上の化学的に区別される領域を含むアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは典型的にはオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞性取り込み、及び／又は標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾されている少なくとも一の領域を含む。オリゴヌクレオチドの更なる領域はＲＮＡ：ＤＮＡ又はＲＮＡ：ＲＮＡハイブロッドを切断可能な酵素の基質となりうる。例を挙げると、ＲＮアーゼＨはＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖のＲＮＡ鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。故に、ＲＮアーゼＨの活性化はＲＮＡ標的の開裂を生じ、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効果を大きく向上させる。従って、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をしばしば得ることができる。本発明のキメラアンチセンス化合物は上述の二以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド及び／又はオリゴヌクレオチド擬態体の複合構造体として形成されてもよい。好適なキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性を付与するために３'末端に少なくとも一の２'修飾糖（好ましくは２'-Ｏ-(ＣＨ$_2$)$_2$-Ｏ-ＣＨ$_3$）とＲＮアーゼＨ活性を付与する

ために少なくとも４の隣接した２'-Ｈ糖を持つ領域を含む。このような化合物はまた当該分野においてハイブリッド又はギャプマー(ｇａｐｍｅｒｓ)とも呼ばれている。好適なギャプマーは少なくとも４の隣接した２'-Ｈ糖を持つ少なくとも一の領域で分離した３'末端と５'末端２'修飾糖（好ましくは２'-Ｏ-(ＣＨ$_2$)$_2$-Ｏ-ＣＨ$_3$）の領域を持ち、好ましくはホスホロチオネート骨格結合を含む。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第５０１３８３０；５１４９７９７；５２２０００７；５２５６７７５；５３６６８７８；５４０３７１１；５４９１１３３；５５６５３５０；５６２３０６５；５６５２３５５；５６５２３５６；及び５７００９２２が含まれ、これらのそれぞれが出典明示によりここに取り込まれる。

【０３１３】

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

【０３１４】

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

【０３１５】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、ＣａＰＯ$_4$-媒介ＤＮＡトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスＭ-ＭｕＬＶから誘導されるもの、Ｎ２（Ｍ-ＭｕＬＶから誘導されたレトロウイルス）、又はＤＣＴ５Ａ、ＤＣＴ５Ｂ及びＤＣＴ５Ｃと命名されたダブルコピーベクター（国際公開９０／１３６４１参照）を含む。

【０３１６】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開９１／０４７５３に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表

面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【０３１７】

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

【０３１８】

アンチセンス又はセンスＲＮＡ又はＤＮＡ分子は、通常は少なくとも約５ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、又は１０００ヌクレオチド長であり、この文脈の「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長にその参照長の１０％を加えるか又は減じたものを意味する。

【０３１９】

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

【０３２０】

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

【０３２１】

ＴＡＴのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、ＴＡＴがレセプターである場合）、ＴＡＴは、結合相互作用に関わっている他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに使用することができる。このような方法により、レセプター／リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。また、このような結合性相互作用に含まれるタンパク質は、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターＴＡＴは関連するリガンドの単離に使用できる。スクリーニングアッセイは、天然ＴＡＴ又はＴＡＴのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計してよい。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングを施すことができるアッセイを含み、それらアッセイを特に小分子薬剤候補を同定することに適したものにする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施

される。

【０３２２】

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

【０３２３】

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

【０３２４】

また、ＴＡＴポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、１回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なＤＮＡ又はｍＲＮＡの１回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスＲＮＡ及びＤＮＡは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは

既に示されている（Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]）。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【０３２５】

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

【０３２６】

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

【０３２７】

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

【０３２８】

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

【０３２９】

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

【０３３０】

アンタゴニストに関する全てのアッセイは、薬候補をここで同定された核酸によってコードされているＴＡＴポリペプチドと、これら両成分が相互作用するのに十分な条件下及

び時間にわたって接触させることを必要とする点で共通である。

【０３３１】

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

【０３３２】

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

【０３３３】

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

【０３３４】

アンタゴニストを検定するために、ＴＡＴポリペプチドを、特定の活性についてスクリ

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

【０３３５】

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

【０３３６】

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

【０３３７】

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

【０３３８】

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

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

【０３３９】

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

【０３４０】

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

【０３４１】

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

【０３４２】

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

【０３４３】

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

【０３４４】

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

【０３４５】

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

【０３４６】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に１つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれ

に加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は増殖阻害剤のようなその機能を高める薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

【０３４７】

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

【０３４８】

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

【０３４９】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ＡＴＣＣ受託番号により以下の実施例及び明細書全体の中で特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【０３５０】

実施例１：ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）を用いた組織発現プロファイリング

他のヒト腫瘍及び／又は正常ヒト組織に比べて対象となる特定のヒト腫瘍組織において発現が顕著に且つ検出可能に上方制御されるポリペプチド（及びそれをコードする核酸）を同定するために、遺伝子発現情報を含む専有データベース（ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）、Ｇｅｎｅ Ｌｏｇｉｃ Ｉｎｃ．、米国メリーランド州ゲイサーズバーグ）を分析した。具体的に言うと、ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースの分析は、Ｇｅｎｅ Ｌｏｇｉｃ Ｉｎｃ．（米国メリーランド州ゲイサーズバーグ）から入手できるＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースで使用するソフトウエア、またはＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースで使用する、ジェネンテック社で作成され、開発された専有ソフトウエアを用いて行った。分析のポジティブヒットの評価は、例えば、正常基本組織及び／又は正常増殖性組織における組織特異性、腫瘍特異性及び発現レベルなどを含むいくつかの基準に基づく。このｍＲＮＡの発現分析を用いて、ＴＡＴ１２１１ポリペプチドをコードするｍＲＮＡが、ヒト肺、卵巣、及び甲状腺膵臓腫瘍において、それぞれ対応する正常なヒト肺、卵巣、甲状腺組織に比べて、顕著に、再現可能に、且つ検出可能に過剰発現することが決定された。

【０３５１】

実施例２：インサイツハイブリダイゼーション

インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と局在化、特定のｍＲＮＡ合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

【０３５２】

インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコールの最適化バージョンに従って、ＰＣＲ生成^{32}Ｐ-標識リボプローブを用いて実施される。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼＫ（２０ｇ／ｍｌ）で１５分間３７℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリダイゼーションする。(^{32}Ｐ)ＵＴＰ-標識アンチセンスリボプローブをＰＣＲ産物から生成し、５５℃で終夜ハイブリダイゼーションする。スライドをＫｏｄａｋ ＮＴＢ２核トラックエマルションに浸漬して４週間露出する。

【０３５３】

^{32}Ｐ-リボプローブ合成

６．０μｌ（１２５ｍＣｉ）の^{32}Ｐ-ＵＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ ＢＦ １００２，ＳＡ＜２０００ Ｃｉ／ｍｍｏｌ）をスピード真空乾燥させた。乾燥^{32}Ｐ-ＵＴＰを含む各管に以下の成分を添加した：

２．０μｌの５ｘ転写バッファー
１．０μｌのＤＴＴ（１００ｍＭ）
２．０μｌのＮＴＰ混合物（２．５ｍＭ：各１０μｌの１０ｍＭ ＧＴＰ，ＣＴＰ及びＡＴＰ＋１０μｌのH_2O）
１．０μｌのＵＴＰ（５０μＭ）
１．０μｌのＲＮａｓｉｎ
１．０μｌのＤＮＡテンプレート（１μｇ）
１．０μｌのH_2O
１．０μｌのＲＮＡポメラーゼ（ＰＣＲ産物についてＴ３＝ＡＳ，Ｔ７＝Ｓ，通常）

【０３５４】

管を３７℃で１時間インキュベートし、１．０μｌのＲＱ１ ＤＮａｓｅを添加し、ついで３７℃で１５分間インキュベートした。９０μｌのＴＥ（１０ｍＭトリスｐＨ７．６／１ｍＭのＥＤＴＡｐＨ８．０）を添加し、混合物をＤＥ８１紙にピペットした。残りの溶液をＭｉｃｒｏｃｏｎ－５０限外濾過ユニットに充填し、プログラム１０を用いてスピンさせた（６分間）。濾過ユニットを第２の管に変換し、プログラム２を用いてスピンさせた（３分間）。最終回収スピンの後、１００μｌのＴＥを添加した。１μｌの最終生成物をＤＥ８１紙にピペットし６ｍｌのＢＩＯＦＬＵＯＲ ＩＩで数えた。

【０３５５】

プローブをＴＢＥ／尿素ゲル上で走らせた。１－３μｌのプローブ又は５μｌのＲＮＡ ＭｒｋＩＩＩを３μｌのローディングバッファーに添加した。加熱ブロック上で９５℃に３分間加熱した後、プローブを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルを流し、試料を充填し、１８０－２５０ボルトで４５分間走らせた。ゲルをサランラップでラップし、－７０℃冷凍機内で補強スクリーンを持つＸＡＲフィルムに１時間から終夜露出した。

【０３５６】

^{32}Ｐ-ハイブリダイゼーション

Ａ．凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で５分間解凍した。トレイを５５℃のインキュベータに５分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において４％パラホルムアルデヒド中で１０分間固定し、０．５ｘＳＳＣで５分間室温で洗浄した（２５ｍｌ ２０ｘＳＳＣ＋９７５ｍｌ ＳＱ H_2O）。０．５μｇ／ｍｌのプロテイナーゼ中、３７℃で１０分間の脱タンパクの後（２５０ｍｌの予備加熱ＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中の１０ｍｇ／ｍｌストック１２．５μｌ）、切片を０．５ｘＳＳＣで１０分間室温で洗浄した。切片を、７０％、９５％、１００％エタノール中、各２分間脱水した。

【０３５７】

Ｂ．パラフィン包埋切片の前処理：

スライドを脱パラフィンし、ＳＱ H_2O中に配置し、２ｘＳＳＣで室温において各々５分間２回リンスした。切片を２０μｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫ（２５０ｍｌのＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中１０ｍｇ／ｍｌを５００μｌ；３７℃、１５分間）－ヒト胚又は８ｘプロテイナーゼＫ（２５０ｍｌのＲＮａｓｅバッファー中１００μｌ、３７℃、３０分間）－ホルマリン組織で脱タンパクした。続く０．５ｘＳＳＣでのリンス及び脱水は上記のように実施した。

【０３５８】

Ｃ．プレハイブリダイゼーション

スライドをＢｏｘバッファー（４ｘＳＳＣ、５０％ホルムアミド）－飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。

【０３５９】

Ｄ．ハイブリダイゼーション

スライド当たり１．０ｘ10^6ｃｐｍのプローブ及び１．０μｌのｔＲＮＡ（５０ｍｇ／ｍｌストック）を９５℃で３分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり

４８μｌのハイブリダイゼーションバッファーを添加した。ボルテックスの後、５０μｌの^{32}Ｐ混合物をスライド上のプレハイブリダイゼーション５０μｌに添加した。スライドを５５℃で終夜インキュベートした。

【０３６０】

Ｅ．洗浄

洗浄は、２ｘ１０分間、２ｘＳＳＣ、ＥＤＴＡで室温で実施し（４００ｍｌの２０ｘＳＳＣ＋１６ｍｌの０．２５Ｍ ＥＤＴＡ、Ｖｆ＝４Ｌ）、次いでＲＮａｓｅＡ処理を３７℃で３０分間行った（２５０ｍｌＲＮａｓｅバッファー中１０ｍｇ／ｍｌを５００μｌ＝２０μｇ／ｍｌ）。スライドを２ｘ１０分間、２ｘＳＳＣＥＤＴＡで室温において洗浄した。ストリンジェントな洗浄条件は次の通り：５５℃で２時間、０．１ｘＳＳＣ、ＥＤＴＡ（２０ｍｌの２０ｘＳＳＣ＋１６ｍｌのＥＤＴＡ、V_f＝４Ｌ）。

【０３６１】

Ｆ．オリゴヌクレオチド

ここに開示した様々なＤＮＡ配列についてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは添付図に示した核酸（又はその相補鎖）に相補的であるように得られた。

【０３６２】

Ｇ．結果

正常なヒト組織におけるＴＡＴ２１１の発現に関し、弱から中程度の発現が、乳腺上皮、胆嚢粘膜、肺、及び腎尿細管の試験された試料の一部で観察された。正常ヒト卵巣間質及び子宮の子宮筋層の両方を含む、試験された他の全てのヒト組織は、ＴＡＴ２１１発現について陰性であった。これに対して、強いＴＡＴ２１１発現が、試験されたヒト非小細胞肺癌の２７件の内１６件に（５９％）観察された。更に、強いＴＡＴ２１１発現が、試験された子宮内膜癌の９件の内８件に（８９％）観察された。最後に、強いＴＡＴ２１１発現が、試験された卵巣癌の１４件の内１２件に観察された。

【０３６３】

実施例３：ＴＡＴ２１１ポリペプチドに結合する抗体の調製

この実施例は、ＴＡＴ２１１に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

【０３６４】

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。使用することができる免疫原には、精製ＴＡＴ、ＴＡＴを含む融合タンパク質、及び細胞表面上に組換えＴＡＴを発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくなすことができる。

【０３６５】

Ｂａｌｂ／ｃ等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に１－１００マイクログラムで注入したＴＡＴ免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ｒｉｂｉ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｈ，Ｈａｍｉｌｔｏｎ，ＭＴ）に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで１０から１２日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗ＴＡＴ抗体の検出のためのＥＬＩＳＡアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

【０３６６】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、ＴＡＴの静脈内注射の最後の注入をすることができる。３から４日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を（３５％ポリエチレングリコールを用いて）、ＡＴＣＣから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．１等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む９６ウェル組織培養プレートに

蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。
ハイブリドーマ細胞は、ＴＡＴに対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。ＴＡＴに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

【０３６７】

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のＢａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗ＴＡＴモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで増殖させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインＡ又はプロテインＧへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【０３６８】

上記の技術を使用して、様々な別々の異なるハイブリドーマ細胞株を生成した。このハイブリドーマ細胞株それぞれは天然型ＴＡＴ２１１ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体を生産する。これらのハイブリドーマ株によって生産されるモノクローナル抗体は、周知かつ慣例的に用いられる技術、例えばウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ分析、ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現している細胞のＦＡＣＳ分類分析及び／又は免疫組織化学分析を用いて、ＴＡＴ２１１ポリペプチドと結合することが示されている。ある特定のマウスハイブリドーマ細胞株が（本明細書中で１０Ｈ１として設計され、ｍｕ１０Ｈ１とも呼ばれるマウスモノクローナル抗体を発現する）、さらなる研究のために選択された。１０Ｈ１モノクローナル抗体、及びそれの様々な他のバージョンに関連したアミノ酸配列が図３－１２に示される。

【０３６９】

実施例４：競合的結合分析及びエピトープマッピング

記載のモノクローナル抗体に結合されるＴＡＴ２１１エピトープを、標準的な競合的結合分析により決定することができる(Fendlyら Cancer Reseach 50:1550-1558(1990))。交差阻害研究は、蛍光を定量化するＰＡＮＤＥＸ™スクリーン機を用いて、ＴＡＴ２１１を発現するように操作したインタクトＰＣ３細胞上で直接蛍光検定することにより、抗体で実施され得る。それぞれのモノクローナル抗体は、確立した方法(Wofsyら Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi(eds.)San Francisco: W.J.Freeman Co. (1980))を用いて、フルオレセインイソチオシアネート(ＦＩＴＣ)とコンジュゲートする。ＴＡＴ２１１発現ＰＣ３細胞の集密的な単層をトリプシン処理し、１回洗浄し、０．５％ウシ血清アルブミン(ＢＳＡ)及び０．１％ＮａＮ３を含有する冷却ＰＢＳ中に、１．７５×10^6細胞/ｍｌで再懸濁する。終濃度１％のラテックス粒子(ＩＤＣ, Ｐｏｒｔｌａｎｄ, ＯＲ)をＰＡＮＤＥＸ™プレート膜の目詰まりを減少させるために追加する。懸濁液中の細胞、２０μｌ、及び２０μｌの精製モノクローナル抗体(１００μｇ／ｍｌから０．１μｇ／ｍｌ)をＰＡＮＤＥＸ™プレートの穴に加え、３０分間氷上でインキュベートする。所定希釈のＦＩＴＣ標識されたモノクローナル抗体２０μＬをそれぞれの穴に加え、３０分間インキュベートし、洗浄し、更に蛍光がＰＡＮＤＥＸＴＭスクリーン機にて定量する。モノクローナル抗体は、それぞれが同じ抗体濃度の無関係なモノクローナル抗体コントロールと比較して他の結合を４０％又はそれ以上阻害した場合に、エピトープを共有するとみなされる。このアッセイを使用して、当業者は、上記のエピトープと同じエピトープと結合する他のモノクローナル抗体を同定することができる。

【０３７０】

欠失解析により、抗原エピトープの配列番号：２に示すポリペプチド配列中のおよその位置を同定を行うことができる。一つの実験において、抗ＴＡＴ２１１モノクローナル抗体が、図２に示す抗原エピトープのアミノ酸３２０－３６１の間に位置する抗原エピトープに結合することが示された。これら特異的に同定された抗原エピトープ部位の何れかを含むポリペプチド、これらのポリペプチドをコードする核酸分子、及びこれらのポリペプチドに結合する抗体は全て本発明の範囲内に包含される。

【０３７１】
実施例５：免疫組織化学分析
ＴＡＴ２１１に対する抗体を上述のように調製し、以下のようにして機能性抗ＴＡＴ２１１モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学分析を行った。まず組織切片をアセトン／エタノール（凍結又はパラフィン包埋）中で５分間固定した。次いで組織切片をＰＢＳで洗浄し、その後アビジン及びビオチン（Ｖｅｃｔｏｒ Ｋｉｔ）でそれぞれ１０分間遮断した後、ＰＢＳで洗浄した。次いで切片を１０％の血清で２０分間遮断し、その後ブロッティングにより過剰量を取り除いた。その後切片に１０μｇ／ｍｌの濃度で１時間にわたり一次抗体を添加し、その後ＰＢＳで洗浄した。次いでビオチン標識した二次抗体（抗一次抗体）を３０分間にわたって切片に添加し、その後切片をＰＢＳで洗浄した。次に切片をＶｅｃｔｏｒ ＡＢＣキットの試薬に３０分間曝し、その後ＰＢＳで洗浄した。さらに切片をジアミノベンジジン（Ｐｉｅｒｃｅ）に５分間曝し、その後ＰＢＳで洗浄した。次いでＭａｙｅｒｓのヘマトキシリンを用いて切片を対比染色し、カバーガラスで覆って可視化した。また、Sambrook等、Molecular Cloninng: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989及びAusubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley及びSons (1997)に記載のようにして、免疫組織化学分析を行うこともできる。
【０３７２】
これらの分析の結果は、用いた抗ＴＡＴ２１１モノクローナル抗体は以下の正常ヒト組織、脳、心臓、肝臓、前立腺、皮膚、脾臓、大動脈、精巣、甲状腺、小腸および大腸、胃、卵巣間質の何れにも検出可能に結合しないことを示し、弱い結合のみが正常な肺の肺胞細胞、乳房上皮、腎尿細管のサブセット及び扁桃に観察された。
【０３７３】
これに対して、ＴＡＴ２１１の中程度から強い発現が、１１件の独立した卵巣明細胞腺癌試料の内９件、２０件の独立した卵巣類内膜腺癌試料の内１９件、１０件の独立した卵巣粘液性腺癌の内４件、及び２５件の独立した卵巣漿液性腺癌の内２３件に観察された。全てにおいて、ＴＡＴ２１１の検出可能な発現が、試験された全ての独立した卵巣腺癌試料の総計６６件の５８件に観察された。
【０３７４】
更に、ＴＡＡ２１１の中程度から強発現が３１件の独立した肺腺癌試料中２４件に観察された。全てにおいて、ＴＡＡ２１１の検出可能な発現が試験された全ての独立した肺腺癌試料の総計３１件中２７件に（８７％）観察された。
【０３７５】
ＴＡＡ２１１の強発現が２３件の独立した甲状腺乳頭癌試料中１９件に観察された。全てにおいて、ＴＡＡ２１１の検出可能な発現が試験された全ての独立した甲状腺乳頭癌試料の総計２３件中２１件に（９１％）観察された。
【０３７６】
抗ＴＡＴ２１１モノクローナル抗体の１０Ｈ１（関連するアミノ酸配列は図３－１２に示される）を用いて、免疫組織化学分析は、様々な原発性試料及び対応した局所転移性癌組織試料で用いられ、ＴＡＴ２１１の発現が、（原発性と比較して）転移性状態で維持されるかどうかを判断した。これらの分析の結果は、原発性試料及び対応した局所転移性癌組織試料において、ＴＡＴ２１１発現が高度に一致していることを示した。特に、試験された１０件の卵巣腺癌試料の内、９件が原発性腫瘍及び対応した局所転移の両方において中程度から高度なＴＡＴ２１１発現を示した。試験された１４件の肺腺癌試料の内、１２件が原発性腫瘍及び対応した局所転移の両方において同様な中程度から高度なＴＡＴ２１１発現を示した。最後に、３件の扁平上皮細胞肺癌試料の内、２件が原発性腫瘍及び適合した局所転移の両方において同様な中程度から高度なＴＡＴ２１１発現を示した。
【０３７７】
実施例６：マウスモノクローナル抗体のヒト化
この実施例はマウス抗体１０Ｈ１をＴＡＴ２１１に対してヒト化する方法の適用性を示す

。ＴＡＴ２１１の細胞外ドメインがＥ．ｃｏｌｉ（非グリコシル化）で及びＣＨＯで（グリコシル化）イムノアドヘシン（Ｆｃ融合）として発現され、定法で精製された。抗体１０Ｈ１を発現するマウスハイブリドーマは、Ｅ．ｃｏｌｉ由来の組換えＴＡＴ２１１細胞外ドメインでマウスを免疫して得られ、ＥＬＩＳＡによりＴＡＴ２１１をコートしたプレートへの結合能により同定された。

【０３７８】

マウス１０Ｈ１可変ドメインのクローニング

全ＲＮＡを標準的な方法を用いて１０Ｈ１を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖(ＶＬ)及び可変重鎖(ＶＨ)ドメインは、重鎖及び軽鎖に対する変性プライマーを用いたＲＴ-ＰＣＲにより増幅した。フォワードプライマーは、ＶＬ及びＶＨ領域のＮ末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、ＬＣ及びＨＣリバースプライマーを、種全体で高度に保存されている定常軽鎖(ＣＬ)及び定常重鎖ドメイン１(ＣＨ１)の領域にアニールするように設定した。挿入物のポリヌクレオチド配列は、慣例的な配列決定法を用いて決定した。ｍｕ１０Ｈ１ ＶＬ（配列番号４）及びＶＨ（配列番号１３）のアミノ酸配列はそれぞれ図３と４に示される。

【０３７９】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク上への直接的な高頻度可変領域の移植

この作業のために使用するファージミドは、一価性Ｆａｂ-ｇ３ディスプレイベクターであって、単一のｐｈｏＡプロモーターの制御下の２つのオープンリーディングフレームからなる。１つ目のオープンリーディングフレームはＶＬに融合されるｓｔＩＩシグナル配列とアクセプター軽鎖のＣＨ１ドメインからなり、２つ目はＶＨに融合されるｓｔＩＩシグナル配列とアクセプター重鎖のＣＨ１ドメインに続く軽微なファージコートタンパク質Ｐ３からなる。

【０３８０】

マウスの１０Ｈ１（ｍｕ１０Ｈ１）のＶＬ及びＶＨドメインを、ヒトＶＬκＩ（ｈｕＫＩ）及び、ヒトＶＨサブグループＩＩＩ（ｈｕＩＩＩ）のコンセンサス配列と配列比較した。ＣＤＲ移植片を作製するために、ｍｕ１０Ｈ１の高頻度変異領域を、ｈｕＫＩ及びｈｕＩＩＩコンセンサスアクセプターフレームワークに移植し、「１０Ｈ１－移植片」、直接的ＣＤＲ移植片を生成した（図３及び４）。ＶＬドメインにおいて、以下の領域がヒトコンセンサスアクセプターに移植された：位置２４－３４（Ｌ１），５０－５６（Ｌ２）及び８９－９７（Ｌ３）。ＶＨドメインにおいて、位置２６－３５（Ｈ１），４９－６５（Ｈ２）及び９３－１０２（Ｈ３）が移植された。MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))は抗体及び抗原の複合体結晶構造を解析し、重鎖の位置４９及び９３が接触領域の一部であることを見いだし、よって抗体をヒト化する場合に、これらの位置をＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３の定義に含めることが合理的であるように見える。

【０３８１】

「１０Ｈ１移植片」は、各超可変領域について別個のオリゴヌクレオチドを用いて、ＬＣ及びＨＣ発現ベクターのキュンケル突然変異誘発として生成された。親和性又は安定性を増加させるアミノ酸の改変もまたキュンケル突然変異誘発を用いて行われた。正しいクローンはＤＮＡ配列決定により同定した。

【０３８２】

高頻度可変領域のランダム化

配列多様性は、マウスの高頻度可変領域配列に対するバイアスを維持する穏やかなランダム化法を用いて、１０Ｈ１移植片の各々の高頻度可変領域に導入された。これは、Gallop 等, J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)に最初に記述されるように、毒性オリゴヌクレオチド合成法を用いて行った。変異させる高頻度可変領域内の所与の位置について、各位置で平均５０パーセントの突然変異率を生じるように、野生型アミノ酸をコードするコドンが、ヌクレオチドの７０-１０-１０-１０混合物にて毒された。

【０３８３】

穏やかにランダム化されたオリゴヌクレオチドを、マウスの高頻度可変領域配列に倣っ

てパターン化し、直接的な高頻度可変領域移植片によって定められる同じ領域を包含させた。ＶＨドメインのＨ２の初めのアミノ酸位(位置４９)は、コドンＲＧＣを用いてＡ、Ｇ、Ｓ又はＴに配列多様性を限定した。

【０３８４】

野生型ＣＤＲ移植配列の再選択を避けるために、停止コドン（ＴＡＡ）をキュンケル突然変異誘発によって各々の１０Ｈ１移植片のＣＤＲの中央に導入して、異なるＣＤＲ内に導入された停止コドンを各々有する６つの異なる鋳型が生じた。ランダム化されたオリゴヌクレオチドを用いて、多様性を導入すると同時に対応する鋳型内の停止コドンを修復した。

【０３８５】

ファージライブラリの生成

上述の各々の高頻度可変領域に多様性を導入するために設定したランダム化オリゴヌクレオチドプールを、６６０ｎｇのオリゴヌクレオチド、５０ｍＭ トリスｐＨ７．５、１０ｍＭ $MgCl_2$、１ｍＭ ＡＴＰ、２０ｍＭ ＤＴＴ及び、５Ｕポリヌクレオチドキナーゼを含む２０μｌの反応溶液中で、３７℃で１時間かけて別々にリン酸化した。単一のＣＤＲ内に多様性を導入するための各リン酸化オリゴヌクレオチドプールを、対応する停止コドンを含有する２０μｇのキュンケル鋳型と混合させた。反応は、鋳型に対するオリゴヌクレオチドの比が３となるように、終容量５００μｌの５０ｍＭ トリスｐＨ７．５、１０ｍＭ $MgCl_2$ 中で行った。混合物を９０℃で４分間、５０℃で５分間アニールさせ、氷上で冷ました。次いで、アニールした鋳型(２５０μｌ)を、１μｌの１００ｍＭ ＡＴＰ、１０μｌの２５ｍＭ ｄＮＴＰ(各々２５ｍＭのｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ及びｄＴＴＰ)、１５μｌの１００ｍＭ ＤＴＴ、２５μｌの１０×ＴＭバッファ(０．５Ｍ トリスｐＨ７.５、０.１Ｍ $MgCl_2$)、２４００ＵのＴ４リガーゼ、及び３０ＵのＴ７ポリメラーゼを充填して、室温に３時間置いた。Sidhu 等, Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)に記述されるように、充填された生成物を精製し、ＳＳ３２０細胞に電気穿孔して、Ｍ１３／ＫＯ７ヘルパーファージ存在下にて広げた。ライブラリサイズは、１～ 2×10^9 の独立クローン の範囲とした。最初のライブラリからのランダムなクローンを配列決定して、ライブラリの質を評価した。

【０３８６】

ファージ選別

ファージ選別のために、ＣＨＯ由来ＴＡＴ２１１細胞外ドメイン（２μｇ／ｍｌ）をＰＢＳにてＭａｘｉＳｏｒｐマイクロタイタープレート(Ｎｕｎｃ)上に４℃で終夜をかけて固定した。プレートはカゼインブロッカー(Ｐｉｅｒｃｅ)を用いて少なくとも１時間ブロックした。ファージを培養液上清から回収し、０．５％ＢＳＡ及び０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ(ＰＢＳＢＴ)に懸濁した。ファージ選別後、マイクロタイターウェルは、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ(ＰＢＳＴ)にて広範に洗浄し、結合したファージを、ウェルを１００ｍＭ ＨＣｌにて３０分間インキュベートすることによって溶出した。ファージは、１Ｍ トリスｐＨ８にて中和して、ＸＬ１-青細胞及びＭ１３／ＫＯ７ヘルパーファージを用いて増幅させ、２ＹＴ、５０μｇ／ｍｌカルベニシリン中で３７℃で終夜生育させた。標的含有ウェルから溶出されるファージの力価は、非標的含有ウェルから回収したファージの力価と比較して、濃縮を評価した。

【０３８７】

Ｆａｂ及びＩｇＧ産生及び親和性測定

親和性測定のためにＦａｂタンパク質を発現させるため、停止コドンを、ファージディスプレイベクターの重鎖とｇ３の間に導入した。クローンを大腸菌３４Ｂ８細胞内に形質転換して、完全Ｃ.Ｒ.Ａ.Ｐ.培地中で３０℃で生育させた (Presta等 Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。細胞を遠心分離によって回収して、ＰＢＳ、１００ｕＭのＰＭＳＦ、１００ｕＭ ベンズアミジン、２．５ｍＭのＥＤＴＡに懸濁して、マイクロフルイダイザーを用いて破壊した。ＦａｂはプロテインＧアフィニティクロマトグラフィにて精製した。

【０３８８】
スクリーニングの目的のために、ＩｇＧ変異体は最初に２９３細胞中で産生された。ＶＬおよびＶＨ（２５μｇ）をコードするベクターは、ＦｕＧｅｎｅシステムを使用して２９３細胞にトランスフェクトした。５００μｌのＦｕＧｅｎｅはＦＢＳを含まないＤＭＥＭ培地の４．５ｍｌと混合し、室温で５分間インキュベートした。各鎖（２５μｇ）がこの混合物に添加され、室温で２０分間インキュベートし、ついで５本のＴ１５０フラスコへ移し５％CO_2中で３７℃で一晩トランスフェクトした。翌日、トランスフェクション混合物を含む培地を除去し、０．１ｍｌ／Ｌ微量元素（Ａ０９３４）と１０ｍｇ／Ｌインスリン（Ａ０９４０）を含むＰＳ０４培地を２３ｍｌと置換する。細胞は更に５日間インキュベートされ、その後培地は５分間、１０００ｒｐｍにて回収され、０．２２μｍの低タンパク質結合フィルターを用いて無菌濾過された。試料は０．１％のＰＭＳＦを２．５ｍｌの添加後に、１２５ｍｌの培地毎にて、４℃で貯蔵することが可能であった。ＩｇＧはプロテインＧ親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。

【０３８９】
親和性決定
親和性の決定はスキャッチャード分析及びＢＩＡｃｏｒｅＴＭ-２０００又はＡ１００を用いた表面プラズモン共鳴により行った。

【０３９０】
Ｂｉａｃｏｒｅ ２０００
ＴＡＴ２１１細胞外ドメイン（グリコシル化）は固定化され（ＣＭ５センサーチップ上で１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８中、約１００－４００ＲＵ）、１０Ｈ１抗体変異体が検体として役割を果たした（ＰＢＳＴ中で４から１０００ｎＭの２倍連続希釈を使用して、流速３０μＬ／分で注入されて）。各試料は４分間の会合及び１０分間の解離で分析された。各々の注入後、チップは１０ｍＭグリシンｐＨ１．７を使って再生させた。

【０３９１】
結果及び議論
ヒト化に使用されたヒトアクセプターフレームワークはコンセンサスヒトカッパＩのＶＬドメイン、及びヒトサブグループＩＩＩのＶＨドメインにもとずいている。ｍｕ１０Ｈ１のＶＬ及びＶＨドメインは、ヒトカッパＩ及びサブグループＩＩＩドメインと整列させた；それぞれの相補性決定領域（ＣＤＲ）が同定され、ＩｇＧ抗体（１０Ｈ１－グラフト）として発現することができるＣＤＲグラフトを生成するためにヒトアクセプターフレームワークに移植した（図３と図４）。Ｆａｂとしての１０Ｈ１グラフトの親和性は、表面プラズモン共鳴を用いて評価し、ＴＡＴ２１１細胞外ドメイン由来のＣＨＯに７４ｎＭの親和性を有することが見出され、ＣＤＲグラフトはｍｕ１０Ｈ１ハイブリドーマ抗体に対して約２倍の親和性を失ったことを示している。スキャッチャード分析により、ｍｕ１０Ｈ１ ＩｇＧの親和性は、Ｐ８２８、ＯＶＣＡＲ４、Ｐ７０１ｓｃ２０及びＩｇｒｏｖ１細胞（全てＴＡＴ２１１を発現する）への結合がそれぞれ３６ｎＭ、３７ｎＭ、５９ｎＭ及び６１ｎＭであると決定された。

【０３９２】
Ｆａｂを提示するファージライブラリーが生成され、そこで多様性が１０Ｈ１グラフトの各ＣＤＲに個別に導入され、ＣＨＯ由来ＴＡＴ２１１細胞外ドメインに対してパン（ｐａｎ）された。濃縮は全６ライブラリにおいて第２ラウンド後に観察された。ラウンド６に続いて、クローンは各ライブラリーからＤＮＡ配列分析のために採取され、６つのＣＤＲのそれぞれをターゲットにした配列の変化を明らかにした（図３、図４）。ライブラリーから同定されたこれらの配列の変化は、改良された結合を持つ変異体をもたらす変化を意味し得るか、又はＴＡＴ２１１細胞外ドメインの結合に影響を及ぼさない位置でのアミノ酸の変化を単に示している。いくつかの選択されたクローンはＦａｂとして発現され、ビアコアによりＴＡＴ２１１細胞外ドメインへの結合について特徴付けられた。細胞表面のＴＡＴ２１１へ結合した全てのクローン、及び親和性を有して結合した大半のクローンは１０Ｈ１グラフトに対して大きく改善した。

【０３９３】
１０Ｈ１グラフトの ＣＤＲ－Ｌ１の潜在的脱アミド部位及びｉｓｏ－アスパラギン酸を形成する部位の除去
潜在的な製造上の問題を回避するために、１０Ｈ１グラフトのＣＤＲ－Ｌ１における潜在的なＩＳＯ－アスパラギン酸を形成する部位Ａｓｎ２８－Ｇｌｙ２９は、これらの位置で他の抗体で見いだされた残基をサンプリングすることで除かれた。１０Ｈ１グラフトのＣＤＲ－Ｌ１のＡｓｎ２８をＳｅｒ２８変更することが（１０Ｈ１．ｖ１１．１）、適切な置換であることが判明し、潜在的な脱アミドおよびｉｓｏ－アスパラギン酸の形成を排除するために働いた。更に、ＶＨにおいてＶ９３Ａの逆突然変異は結合にほとんど影響を与えないことがわかり（１０Ｈ１．１１．２ｂ、図４）、アラニンはこの位置に最も一般的に見いだされるため、後のヒト化変異体へ取り込まれた。

【０３９４】
１０Ｈ１．１１の親和性成熟
追加のファージライブラリーがＴＡＴ２１１細胞外ドメインへの親和性成熟１０Ｈ１．１１結合に生成された。多様性は１０Ｈ１．１１．２Ｂにおいて以前のライブラリーで頻繁に変化した位置へ標的とされ、軽鎖の２７、２７ｃ、２７ｅ、２９、９３及び９４、及び重鎖の５４、５５及び６１の位置が含まれる。これらのライブラリーから同定された配列は、図３－１２に示されている。

【０３９５】
選択された配列から、いくつかはビアコアとスキャッチャード解析により評価するためにＩｇＧ抗体に再フォーマットされた。１０Ｈ１．１１．４Ｂは１０Ｈ１．１１．２Ｂで観察された変化の細分化から生成され、スキャッチャード分析により高い親和性を持っていた。抗体１０Ｈ１．１１．４Ｂは配列番号９のＶＬアミノ酸配列（配列番号８１の軽鎖アミノ酸配列）、及び配列番号１８のＶＨアミノ酸配列（配列番号８０の重鎖アミノ酸配列）を有し、マウス１０Ｈ１よりも高い親和性で細胞の表面上のＴＡＴ２１１へ結合することが示され、そのようなものとして、更なる開発のための主要候補として選択された。

【０３９６】
実施例７：ＴＡＴ１２１１に結合する、毒素をコンジュゲートした抗体の調整
細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療において腫瘍細胞を殺すか又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体－薬剤コンジュゲート（ＡＤＣ）、つまり免疫複合体を用いると(Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz及びSpringer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；米国特許第４９７５２７８号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwinら、(1986) Lancet (Mar. 15, 1986):pp603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pincheraら (ed.s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果が求められる。ＡＤＣを設定して精製するために、モノクローナル抗体(ｍＡｂ)の選択性並びに薬剤結合特性及び薬剤放出特性に注目した。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は共に、この方策に有用であるとして報告されている(Rowland等、(1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等、(1986)、上掲)。抗体－毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028；Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第１３９１２１３号；Liu等、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lodeら (1998) Cancer Res. 58:2928；Hinmanら (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)などの小分子毒素が含まれる。

【０３９７】
本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ＡＤＣ)において、抗体(Ａｂ)を、リンカー(Ｌ)を介して、一つ以上の薬剤部分(Ｄ)、例えば抗体につき約１～約２０の薬剤部分にコンジュゲートする。式：
Ａｂ－(Ｌ－Ｄ)$_p$
を有するＡＤＣはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態および試薬を用いて調製されうる：（１）共有結合の後に薬剤部分Ｄと反応してＡｂ-Ｌを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び（２）共有結合の後に抗体の求核基と反応してＤ-Ｌを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ＡＤＣを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。
【０３９８】
リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、６-マレイミドカプロイル(「ＭＣ」)、マレイミドプロパノイル(「ＭＰ」)、バリン-シトルリン(「ｖａｌ－ｃｉｔ」)、アラニン-フェニルアラニン(「ａｌａ－ｐｈｅ」)、ｐ-アミノベンジルオキシカルボンイル(「ＰＡＢ」)、Ｎ-スクシンイミジル４(２-ピリジルチオ)ペンタノエート(「ＳＰＰ」)、Ｎ-スクシンイミジル４-(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１カルボキシレート(「ＳＭＣＣ」)、及びＮ-スクシンイミジル(４-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「ＳＩＡＢ」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において記述される。
【０３９９】
いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(ｖｃ又はｖａｌ-ｃｉｔ)、アラニン-フェニルアラニン(ａｆ又はａｌａ-ｐｈｅ)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(ｇｌｙ-ｖａｌ-ｃｉｔ)及びグリシン-グリシン-グリシン(ｇｌｙ-ｇｌｙ-ｇｌｙ)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ及びＤ又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。
【０４００】
抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：（ｉ）Ｎ末端アミン基、（ｉｉ）側鎖アミン基、例えばリシン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えばシステイン、および（ｉｖ）抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およびリンカー試薬により共有結合を形成することができる：（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばＤＴＴ(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、２の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる２-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、１、２、３、４又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。
【０４０１】
また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成して

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

【０４０２】

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

【０４０３】

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

【０４０４】

毒素を精製した抗体に連結することによって抗体-薬剤コンジュゲートを生産するための技術には周知のものがあり、当分野で慣例的に用いられる。例えば、毒素ＤＭ１への精製されたモノクローナル抗体のコンジュゲートは、以下の通りに達成されうる。精製された抗体は、ジチオピリジル基を導入するために、Ｎ-スクシンイミジル-４-(２-ピリジルチオ)ペンタノエートによって、誘導体化される。ＮａＣｌ(５０ｍＭ)及びＥＤＴＡ(１ｍＭ)を含有する４４．７ｍＬの５０ｍＭ リン酸カリウムバッファ(ｐＨ６．５)中の抗体(３７６．０ｍｇ、８ｍｇ／ｍＬ)を、ＳＰＰ(２．３ｍＬ エタノール中に５．３のモル等量)にて処理した。室温、アルゴン下にて９０分間インキュベートした後、抗応混合物を、３５ｍＭのクエン酸ナトリウム、１５４ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＥＤＴＡにて平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５カラムにゲル濾過する。抗体含有分画をプールして、アッセイした。抗体-ＳＰＰ-Ｐｙ(３３７．０ｍｇ、解放可能な２-チオピリジン基を有する)を上記の３５ｍＭ クエン酸ナトリウムバッファ、ｐＨ６．５にて希釈して、およそ２．５ｍｇ／ｍＬの終濃度にした。次いで、ＤＭ１(１．７等量、１６．１モル)を含む３．０ｍＭのジメチルアセトアミド(ＤＭＡ、最終反応混合物中３％ｖ／ｖ）を抗体溶液に添加する。およそ２０時間、室温、アルゴン下にて反応を行う。反応物を、３５ｍＭのクエン酸ナトリウム、１５４ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５にて平衡化したセファクリルＳ３００ゲル濾過カラム(５．０ｃｍ×９０．０ｃｍ、１．７７Ｌ)に流す。流速は５．０ｍＬ／分、６５の分画(各々２０．０ｍＬ)を回収する。分画をプールし、分析した。この分析において、抗体分子当たりの結合されるＤＭ１薬剤分子の数(ｐ')は、２５２ｎｍ及び２８０ｎｍの吸光度を測定して決定する。

【０４０５】

また、例示として、毒素ＤＭ１への精製されたモノクローナル抗体のコンジュゲートは、以下の通りに達成されうる。精製された抗体は、(スクシンイミジル４(Ｎ-マレイミドメチル)シクロヘキサン-１-カルボキシレート(ＳＭＣＣ、Pierce Biotechnology, Inc)で誘導体化して、ＳＭＣＣリンカーを導入する。５０ｍＭ リン酸カリウム／５０ｍＭ 塩化ナトリウム／２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５中で、７．５モル等量のＳＭＣＣ(ＤＭＳＯ

中に２０ｍＭ、６．７ｍｇ／ｍＬ)にて２０ｍｇ／ｍＬの抗体を処理した。室温のアルゴン下で2時間撹拌した後に、反応混合物を、５０ｍＭ リン酸カリウム／５０ｍＭ 塩化ナトリウム／２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５にて平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５カラムにてろ過する。抗体を含有する分画をプールして、アッセイする。次いで、抗体-ＳＭＣＣを、５０ｍＭ リン酸カリウム／５０ｍＭ 塩化ナトリウム／２ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５で希釈して、最終濃度およそ１０ｍｇ／ｍｌとし、１０ｍＭのＤＭ１を含むジメチルアセトアミド溶液(１．７等量、５ ＳＭＣＣ／抗体と推定)にて反応させる。反応は、１６．５時間、室温、アルゴン下にて撹拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、ｐＨ６．５の１×ＰＢＳによるＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５ゲル濾過カラム(１．５×４．９ｃｍ)に濾過する。次いで、ＤＭ１／抗体の比(ｐ)を２５２ｎｍと２８０ｎｍの吸光度にて測定する。

【０４０６】

さらに、選択した抗体の遊離システインを、ビスマレイミド試薬ＢＭ(ＰＥＯ)４(Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ)にて修飾して、抗体の表面上の反応していないマレイミド基を除去する。これは、ＢＭ(ＰＥＯ)４を５０％のエタノール／水混合液に１０ｍＭの濃度になるまで溶解して、およそ１．６ｍｇ／ｍｌ(１０マイクロモル)の濃度でリン酸緩衝食塩水に抗体を含有する溶液に１０倍のモル過剰量を加え、１時間反応させることによって達成される。過剰なＢＭ(ＰＥＯ)４は、３０ｍＭ クエン酸塩、ｐＨ６と１５０ｍＭ ＮａＣｌバッファによるゲル濾過にて除去した。およそ１０倍のモル過剰ＤＭ１を、ジメチルアセトアミド(ＤＭＡ)に溶解して、抗体-ＢＭＰＥＯ中間生成物に加える。また、ジメチルホルムアミド(ＤＭＦ)を用いて薬剤成分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させて、ＰＢＳでゲル濾過ないし透析を行って反応していない薬剤を取り除く。ＰＢＳ中のＳ２００カラムによるゲル濾過を用いて、高分子量凝集塊を取り除いて、精製された抗体-ＢＭＰＥＯ-ＤＭ１コンジュゲートに供給する。

【０４０７】

典型的に、細胞毒性剤は、抗体の多数になりうるリジン残基により抗体にコンジュゲートされている。対象の抗体に存在するか、又は対象の抗体中に操作したチオール基によるコンジュゲートもまた達成されている。例えば、システイン残基は遺伝子工学技術によってタンパク質内に導入されて、リガンドの共有結合的付着部位を形成している(Better等(1994) J. Biol. Chem. 13:9644 9650；Bernhard等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:126 132；Greenwood等 (1994) Therapeutic Immunology 1:247 255；Tu等 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862 4867；Kanno等 (2000) J. of Biotechnology, 76:207 214；Chmura等 (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15): 8480 8484；米国特許第６２４８５６４号)。一旦遊離システイン残基が対象の抗体の中に存在すると、毒素はその部位に連結されうる。例えば、薬剤リンカー試薬であるマレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)、すなわちＭＣ-ＭＭＡＥ、マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンＦ(ＭＭＡＦ)、すなわちＭＣ-ＭＭＡＦ、ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ又はＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦをＤＭＳＯに溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やしたシステイン誘導体化抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水(ＰＢＳ)に添加する。およそ1時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって濃縮し、毒素コンジュゲート抗体を精製して、ＰＢＳ中のＧ２５樹脂による溶出によって脱塩して、無菌条件下で０．２ｍのフィルターにて濾過して、保存のために凍結した。

【０４０８】

さらに、本発明の抗ＴＡＴ２１１抗体は、以下の技術を用いてアウリスタチン及びドロスタチン毒素(例えばＭＭＡＥ及びＭＭＡＦ)にコンジュゲートされうる。抗体は、ｐＨ８．０の５００ｍＭ ホウ酸ナトリウムと５００ｍＭ 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の１００ｍＭ ジチオトレイトール(ＤＴＴ)で処理した。３７℃でおよそ３０分インキュベートした後、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５樹脂で溶出することによって、バッファを交換して、１ｍＭ ＤＴＰＡを含むＰＢＳにて溶出した。溶液の２８０ｎｍの吸光度とＤＴＮＢ

(Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ)と反応させて４１２ｎｍの吸光度の測定によるチオール濃度から、還元した抗体濃度を決定することによって、チオール／Ａｂ値を調べる。ＰＢＳに溶解した還元型抗体を氷上で冷やす。

【０４０９】

薬剤リンカー試薬である(１)マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＭＡＥ)、すなわちＭＣ-ＭＭＡＥ、(２)ＭＣ-ＭＭＡＦ、（３）ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ又は（４）ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦをＤＭＳＯに溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やした還元型抗体をＰＢＳに添加する。およそ１時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって濃縮し、コンジュゲートした抗体を精製して、ＰＢＳ中のＧ２５樹脂による溶出によって脱塩して、無菌条件下で０．２ｍのフィルターにて濾過して、保存のために凍結した。

【０４１０】

実施例８：インビトロでの腫瘍細胞死滅アッセイ

対象のＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を、標準的な発現ベクター及びクローニング法を使用して得る。あるいは、対象のＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する多くの腫瘍細胞株は例えばＡＴＣＣから公的に入手可能であり、標準的なＥＬＩＳＡ又はＦＡＣＳ分析法を使用して常套的に同定することができる。ついで抗ＴＡＴ２１１ポリペプチドモノクローナル抗体（及びその毒素コンジュゲート誘導体）をアッセイで用いて、ＴＡＴ２１１ポリペプチド発現細胞を死滅させるインビトロでの抗体の能力を定量することができる。

【０４１１】

例えば、対象のＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞を上述のようにして得て、９６ウェルの皿に蒔く。一分析例では、抗体／毒素コンジュゲート（又は裸の抗体）を４日の期間の細胞インキュベーションの間、含ませる。第二の独立の分析例では、細胞を抗体／毒素コンジュゲート（又は裸の抗体）と共に１時間インキュベートし、ついで洗浄して、４日の期間、抗体／毒素コンジュゲートの不存在下でインキュベートする。ついで、細胞生存度を、ＰｒｏｍｅｇａのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（カタログ番号Ｇ７５７１）を使用して測定する。未処理細胞はネガティブコントロールになる。

【０４１２】

第一の実験では、特に本発明に関し、様々な濃度のヒト化抗ＴＡＴ２１１ １０Ｈ１抗体のＡＤＣ ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ毒素コンジュゲート、及びＴＡＴ２１１への結合に非特異的であるコントロール抗体（抗ヒトｇＤ又は抗ブタクサ）がＴＡＴ２１１ポリペプチド発現細胞株ＯＶＣＡＲ－３へ結合し死滅させる能力について試験された。具体的には、ＯＶＣＡＲ－３細胞を９６ウェルプレートにウェルあたり３０００細胞で播種し、その後、抗体の様々な濃度で処理した。細胞死滅は、Ｃｅｌｌ Ｔｉｔｅｒ-Ｇｌｏ試薬を用いて７日目に定量した。これらの分析で用いられる抗体は、（ｉ）配列番号５に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号１４に示したＶＨアミノ酸配列を有する抗ＴＡＴ２１１抗体の１０Ｈ１グラフト、（ｉｉ）非特異的ｇＤ抗体、（ｉｉｉ）非特異的抗ブタクサ抗体、（ｉｖ）配列番号６に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号１５に示したＶＨアミノ酸配列を有するヒト化抗ＴＡＴ２１１抗体１０Ｈ１．１１、（ｖ）配列番号８に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号１７に示したＶＨアミノ酸配列を有するヒト化抗ＴＡＴ２１１抗体１０Ｈ１．１１．２Ｂ、（ｖｉ）配列番号９に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号１８に示したＶＨアミノ酸配列を有するヒト化抗ＴＡＴ２１１抗体１０Ｈ１．１１．４Ｂ、（ｖｉｉ）配列番号１１に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号２０に示したＶＨアミノ酸配列を有するヒト化抗ＴＡＴ２１１抗体１０Ｈ１．１１．６Ｂ、及び（ｖｉｉｉ）配列番号７に示したＶＬアミノ酸配列、及び配列番号１６に示したＶＨアミノ酸配列を有するヒト化抗ＴＡＴ２１１抗体１０Ｈ１．１１．１であった。これらの実験からの結果は図１５に示され、毒素コンジュゲート抗ＴＡＴ２１１抗体の各々はＯＶＣＡＲ-３細胞（す

なわち、細胞表面上にＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞）における細胞死を有意なレベルで引き起し、一方有意な細胞死は非特異的な抗体のいずれにも観察されなかったことを示している。これらのデータは、試験された抗ＴＡＴ２１１抗体は、ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞表面のＴＡＴ２１１ポリペプチドに結合し、インビトロでこれらの細胞の死を引き起こすことができるを示している。

【０４１３】

第二の実験において、様々な濃度の（ｉ）ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥがコンジュゲートした１０Ｈ１.１１.４Ｂ、または（ｉｉ）コントロールの抗ヒトｇＤ抗体のどちらかが、（内因性にＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現しない）２９３細胞か又は細胞表面にＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現するように組換え操作された２９３細胞（２９３／ＴＡＴ２１１細胞）のどちらかを死滅させる能力について、インビトロで試験された。より具体的には２９３細胞又は２９３／ＴＡＴ２１１細胞を９６ウェルプレートにウェルあたり２０００細胞で播種し、その後、抗体の様々な濃度で処置した。細胞死滅は、Ｃｅｌｌ Ｔｉｔｅｒ-Ｇｌｏ試薬を用いて７日目に定量した。２９３細胞で得られた結果は、図１６に示されており、そこでデータは、非特異的コントロール抗ヒトｇＤ抗体、または抗ＴＡＴ２１１ １０Ｈ１.１１.４Ｂ抗体のどちらも２９３細胞（ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現しない）の有意な死滅を生じる能力が無いことを示している。しかし、これに対して、細胞表面にＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する２９３／ＴＡＴ２１１細胞で得られた結果は（図１７）、毒素コンジュゲート抗ＴＡＴ２１１ １０Ｈ１.１１.４Ｂ抗体は、インビトロで有意な細胞死滅を引き起こすことを示している。

【０４１４】

これらの結果は、これらのアッセイで用いられる様々な抗ＴＡＴ２１１抗体は細胞表面上のＴＡＴ２１１ポリペプチドに結合し、抗体が結合するこれらの細胞の死を誘導することができることを示している。

【０４１５】

実施例９：インビトロでの腫瘍死滅アッセイ

インビボでの腫瘍死滅について様々な抗ＴＡＴ２１１抗体の有効性を試験するために、インビボモデルにおいてＯＶＣＡＲ-３乳腺脂肪体パッドを採用した。具体的には、ＯＶＣＡＲ－３乳腺脂肪体パッドの移植モデル番号４３８２-０６１４０４が、アメリカンタイプカルチャーコレクション（マナッサス、バージニア州）から得られたＴＡＴ２１１発現ＯＶＣＡＲ-３卵巣腺癌細胞株を用いて開発された。ＯＶＣＡＲ-３細胞は、ベージュ突然変異（ＣＢ-１７ ＳＣＩＤ．ベージュ）を持つメスのＣＢ-１７重症複合免疫不全マウスに腹腔内へ注射した。ドナーの腫瘍は、腹腔内腫瘍を有するマウスから摘出し細切し、外科的にメスのＣＢ-１７ ＳＣＩＤ．ベージュレシピエントマウスの右胸乳腺脂肪体に移植した。乳腺脂肪体腫瘍は移植株を維持し、有効性研究のための担癌マウス（通常は移植後１４から１８日後に用意）を提供するために連続的に継代した。移植株を維持するために用いたＣ．Ｂ-１７ ＳＣＩＤ．ベージュマウスは６－８週齢であって、チャールズ・リバー・ラボラトリーズ社（サンディエゴ、カリフォルニア州）から入手した。次いでインビボでの平均腫瘍体積への影響を決定するために、３ｍｇ／ｋｇを含む、様々な抗体の様々な濃度が用いられた。

【０４１６】

これらの様々なインビボ解析の結果を図１８及び１９に示す。これらの結果は、試験した種々の抗ＴＡＴ２１１抗体がインビボで腫瘍細胞の表面のＴＡＴ２１１ポリペプチドに結合し、それらのＴＡＴ２１１発現腫瘍細胞の死を誘導することができることを示している。したがって、これらの実験の結果は、試験した種々の抗ＴＡＴ２１１抗体は、インビボでＴＡＴ２１１発現腫瘍の治療に有効であることを示している。

【０４１７】

実施例１０：抗ＴＡＴ２１１抗体の細胞インターナリゼーション

本明細書に記載の抗ＴＡＴ２１１抗体が細胞表面上のＴＡＴ２１１ポリペプチドへの抗体の結合によってＴＡＴ２１１発現細胞に取り込まれているかどうかを判断するために、

細胞は８ウェルチャンバースライド（Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｌ．）に播種され（ＯＶＣＡＲ３について１００，０００細胞／ウェル、Ｉｇｒｏｖ１又は２９３について３０，０００細胞／ウェル）、２４?４８時間、３７℃／５％CO_2でインキュベートした。抗ＴＡＴ２１１抗体は、プロテアーゼ阻害剤（５０ｕｇ／ｍｌのロイペプチン及び５ｕｇ／ｍｌでのペプスタチン）とともに一晩または２時間のいずれかで増殖培地中に２－５ｕｇ／ｍｌで添加した。これらのプロテアーゼ阻害剤は、一次抗体の劣化を防ぎ、リソソーム中の抗体の検出を可能にする。生標識のために、細胞を４５分間室温で抗体とインキュベートした。全ての細胞は、その後、洗浄し、１０分間３％ホルムアルデヒドで固定し、５－１０分間０．０５％サポニンで浸透させ、非特異的抗体結合部位が室温で２０分間ＰＢＳ＋１％ＢＳＡでブロックされた。その後、細胞を、１時間３７℃でアレクサ－４８８（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）で標識した二次抗体とともにインキュベートし、洗浄し、その後チャンバーインサートは除かれ、ガラススライドを細胞とともに露出させた。ガラススライドは核を標識するためにＤＡＰＩでＶｅｃｔａＳｈｉｅｌｄを適用することでマウントし（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、その後カバーガラス下に置かれ、透明マニキュアで密封した。

【０４１８】

これらの分析結果からは、本明細書に記載の様々な抗ＴＡＴ２１１抗体が、生きた細胞の表面のＴＡＴ２１１ポリペプチドに結合し、細胞への抗体の添加後２０時間未満内で、過激に細胞内に内在化し、細胞のリソソームに配置されることを実証している。このように、本明細書に記載の抗ＴＡＴ２１１抗体はＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する腫瘍の毒素コンジュゲート腫瘍治療のための優れた候補である。

【０４１９】

実施例１１：ハイブリダイゼーションプローブとしてのＴＡＴの使用

以下の方法は、ＴＡＴをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとして、すなわち哺乳類における腫瘍の存在を診断するための使用を記載する。

【０４２０】

ここに開示した完全長又は成熟ＴＡＴのコード化配列を含んでなるＤＮＡを、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同的なＤＮＡ（例えば、ＴＡＴの天然に生じる変異体をコードするもの）のスクリーニングのためのプローブとしてもまた用いられる。

【０４２１】

いずれかのライブラリーＤＮＡを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高ストリンジェント条件で実施した。放射標識ＴＡＴ誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、５０％ホルムアルデヒド、５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、２×デンハルト溶液、及び１０％硫酸デキストランの溶液中で、４２℃において２０時間行った。フィルターの洗浄は、０．１×ＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳの水溶液中、４２℃で行った。

【０４２２】

ついで、完全長天然配列ＴＡＴをコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡは、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【０４２３】

実施例１２：大腸菌中でのＴＡＴの発現

この実施例は、大腸菌中での組換え発現によるＴＡＴの非グリコシル化形態の調製を例証する。

【０４２４】

ＴＡＴをコードするＤＮＡ配列は、選択されたＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（大腸菌由来のもの；Bolivar等，Gene，2:95 (1977)参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、

脱リン酸化される。ＰＣＲ増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、ｔｒｐプロモーター、ポリ-Ｈｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリ-Ｈｉｓ配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＴＡＴコードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びａｒｇＵ遺伝子を含む。

【０４２５】

ライゲーション混合物は、ついで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いて選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのＬＢプレートで増殖する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドＤＮＡが単離され、制限分析及びＤＮＡ配列で確認される。

【０４２６】

選択されたクローンは、抗生物質を添加したＬＢブロスなどの液体培地で終夜増殖させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を所望の光学密度まで増殖させ、その間に発現プロモーターが作動する。

【０４２７】

さらに数時間の細胞培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化ＴＡＴタンパク質を、タンパク質が堅く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【０４２８】

以下の手法を用いて、ポリ-Ｈｉｓ（ポリ-ヒス）タグ形態でＴＡＴを大腸菌で発現させてもよい。ＴＡＴをコードするＤＮＡを選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでＰＣＲ増幅された、ポリ-Ｈｉｓタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株５２（Ｗ３１１０ ｆｕｈＡ（ｔｏｎＡ） ｌｏｎ ｇａｌＥ ｒｐｏＨｔｓ（ｈｔｐＲｔｓ） ｃｌｐＰ（ｌａｃＩｑ））に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に５０ｍｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＬＢ中、３０℃で振盪しながら３－５のＯ．Ｄ．６００に達するまで増殖させた。ついで培地をＣＲＡＰ培地（３．５７ｇの$(NH_4)_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム・２Ｈ２Ｏ、１．０７gのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母抽出物、５００ｍＬ水中の５．３６ｇのＳｈｅｆｉｅｌｄ ｈｙｃａｓｅ ＳＦ、並びに１１０ｍＭのＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）のグルコース及び７ｍＭの$MgSO_4$の混合で調製）中に５０－１００倍希釈し、３０℃で振盪させながら約２０－３０時間増殖させた。試料を取り出してＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析により発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及びリフォールディングまで凍結させた。

【０４２９】

０．５から１Ｌの発酵（６－１０gペレット）からの大腸菌ペーストを、７Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ８バッファー中で１０容量（ｗ／ｖ）で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々０．１Ｍ及び０．０２Ｍとし、溶液を４℃で終夜撹拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をＢｅｃｋｍａｎのＵｌｔｒａｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ中で４０，０００ｒｐｍで３０分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（６Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４）の３－５容量で希釈し、０．２２ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた５ｍｌのＱｉａｇｅｎ Ｎｉ－ＮＴＡ金属キレートカラムに充填した。カラムを５０ｍＭのイミダゾール（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，Ｕｔｒｏｌ ｇｒａｄｅ）を含む添加バッファー、ｐＨ７．４で洗浄した。タンパク質を２５０ｍＭのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、４℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に

基づいて計算した吸光係数を用いて２８０ｎｍにおけるその吸収により見積もった。
【０４３０】
試料を、２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．６、０．３ＭのＮａＣｌ、２．５Ｍの尿素、５ｍＭのシステイン、２０ｍＭのグリシン及び１ｍＭのＥＤＴＡからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が５０～１００マイクログラム／ｍｌとなるように選択した。リフォールディング溶液を４℃で１２－３６時間ゆっくり撹拌した。リフォールディング反応はＴＦＡを最終濃度０．４％（約３のｐＨ）で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を０．２２ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度２－１０％で添加した。再生したタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ Ｒ１／Ｈ逆相カラムで、０．１％ＴＦＡの移動バッファーと１０～８０％のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。Ａ２８０吸収を持つ画分の一定分量をＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最も緻密であり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。
【０４３１】
所望の折り畳みＴＡＴポリペプチドを含有する画分をプールし、その溶液に向けられた弱い窒素の気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質は、透析によるか、又は調製バッファーで平衡化したＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）樹脂を用いたゲル濾過により、０．１４Ｍの塩化ナトリウム及び４％のマンニトールを含む２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ６．８に調製され、滅菌濾過された。
【０４３２】
ここで記載されるＴＡＴポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。
【０４３３】
実施例１３：哺乳動物細胞中でのＴＡＴの発現
この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるＴＡＴの潜在的なグリコシル化形態の調製を例示する。
【０４３４】
発現ベクターとしてｐＲＫ５（１９８９年3月１５日発行のＥＰ３０７２４７を参照のこと）を用いた。場合によっては、ＴＡＴＤＮＡを選択した制限酵素を持つｐＲＫ５に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてＴＡＴＤＮＡを挿入させる。得られたベクターは、各々ｐＲＫ５-ＴＡＴと呼ばれる。
【０４３５】
一実施態様では、選択された宿主細胞は２９３細胞とすることができる。ヒト２９３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １５７３）は、ウシ胎児血清及び場合によっては栄養成分及び／又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの媒質中で組織培養プレートにおいて増殖させて集密化した。約１０μｇのｐＲＫ５－ＴＡＴ ＤＮＡを、ＶＡ ＲＮＡ遺伝子をコードする約１μｇのＤＮＡと混合し[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]、５００μｌの１ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭＥＤＴＡ、０．２２７ＭＣａＣｌ$_2$に溶解させた。この混合物に、５００μｌの５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのＮａＰＯ$_4$を滴下添加し、２５℃で１０分間沈殿物を形成させた。沈殿物を懸濁し、２９３細胞に加えて３７℃で約４時間定着させた。培養培地を吸引し、２ｍｌのＰＢＳ中２０％グリセロールを３０秒間添加した。２９３細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約５日間インキュベートした。
【０４３６】
形質移入の約２４時間後、培養培地を除去し、培養培地（単独）又は２００μＣｉ／ｍ

ｌ^{35}Ｓ－システイン及び２００μＣｉ／ｍｌ^{35}Ｓ－メチオニンを含む培養培地で置換した。１２時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、１５％ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＴＡＴポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０４３７】

これに換わる技術において、ＴＡＴは、Somparyrac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載された硫酸デキストラン法を用いて２９３細胞に一過的に導入される。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで増殖させ、７００μｇのｐＲＫ５－ＴＡＴＤＮＡを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳで洗浄した。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を２０%グリセロールで９０秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、５μｇ／ｍｌウシインシュリン及び０．１μｇ／ｍｌウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約４日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたＴＡＴを含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

【０４３８】

他の実施態様では、ＴＡＴをＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５－ＴＡＴは、ＣａＰＯ$_4$又はＤＥＡＥ－デキストランなどの公知の試薬を用いてＣＨＯ細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は^{35}Ｓ-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ＴＡＴポリペプチドの存在を判定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約６日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたＴＡＴを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

【０４３９】

また、エピトープタグＴＡＴは、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＴＡＴは、ｐＲＫ５ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、ついで、ＰＣＲを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-Ｈｉｓタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-ＨｉｓタグＴＡＴ挿入物は、ついで、安定なクローンの選択のためのＤＨＦＲ等の選択マーカーを含むＳＶ４０誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、ＣＨＯ細胞をＳＶ４０誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-ＨｉｓタグＴＡＴを含む培養培地は、次いで濃縮し、Ｎｉ$^{2+}$－キレートアフィニティークロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

【０４４０】

また、ＴＡＴは、一過性発現法によって、ＣＨＯ及び／又はＣＯＳ細胞中で、あるいは他の安定な発現法によってＣＨＯ細胞中で発現させることもできる。

【０４４１】

ＣＨＯ細胞における安定な発現は，以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ２ドメインを含むＩｇＧ１定常領域配列に融合したＩｇＧコンストラクト（イムノアドヘシン）及び／又はポリ-Ｈｉｓタグ形態として発現する。

【０４４２】

ＰＣＲ増幅に続いて、それぞれのＤＮＡを、Ausubel等, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングした。ＣＨＯ発現ベクターは、対象とするＤＮＡの５’及び３’に適合する制限部位を有し、ｃＤＮＡの便利なシャトル化(Ｓｈｕｔｔｌｉｎｇ)ができるように作製される。ベクターは、Lucas等, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにＣＨＯ細胞での発現を用い、対象とするｃＤ

ＮＡ及びジヒドロフォレートレダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現の制御にＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

【０４４３】

所望のプラスミドＤＮＡの１２マイクログラムを、市販の形質移入試薬Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ（登録商標）（Ｑｕｉａｇｅｎ）、Ｄｏｓｐｅｒ（登録商標）及びＦｕｇｅｎｅ（登録商標）（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を用いいて約一千万のＣＨＯ細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように増殖させた。約3×10^{7}細胞を、下記のような更なる増殖及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【０４４４】

プラスミドＤＮＡを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を１０ｍＬの媒質を含む遠心管にピペットして、１０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を１０ｍＬの選択培地（０．２μｍ濾過ＰＳ２０、５％の０．２μｍ透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。次いで細胞を９０ｍＬの選択培地を含む１００ｍｌスピナーに分けた。１－２日後、細胞を１５０ｍＬの選択増殖培地を満たした２５０ｍＬスピナーに移し、３７℃でインキュベートした。さらに２－３日後、２５０ｍＬ、５００ｍＬ及び２０００ｍＬのスピナーを3×10^{5}細胞／ｍＬで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なＣＨＯ培地を用いてもよいが、実際には１９９２年６月１６日に発行された米国特許第５１２２４６９号に記載された生産培地を使用した。３Ｌの生産スピナーを1.2×10^{6}細胞／ｍＬで播種した。０日目に、細胞数とｐＨを測定した。１日目に、スピナーをサンプリングし、濾過空気での散布を実施した。２日目に、スピナーをサンプリングし、温度を３３℃に変え、５００ｇ／Ｌのグルコース及び０．６ｍＬの１０％消泡剤（例えば３５％ポリジメチルシロキサンエマルション、Ｄｏｗ Ｃｏｒｎｉｎｇ ３６５ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｇｒａｄｅ Ｅｍｕｌｓｉｏｎ）の３０ｍＬとした。生産を通して、ｐＨは７．２近傍に調節し維持した。１０日後、又は生存率が７０％を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して０．２２μｍフィルターを通して濾過した。濾過物は、４℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

【０４４５】

ポリ-Ｈｉｓタグコンストラクトについて、タンパク質はＮｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に５ｍＭの濃度まで添加した。条件培地を、０．３ＭのＮａＣｌ及び５ｍＭイミダゾールを含む２０ｍＭのHepes、ｐＨ７．４バッファーで平衡化した６ｍｌのＮｉ－ＮＴＡカラムに４－５ｍｌ／分の流速で４℃においてポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、０．１４ＭのＮａＣｌ及び４％のマンニトール、ｐＨ６．８を含む貯蔵バッファー中で２５ｍｌのＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）カラムを用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

【０４４６】

イムノアドヘシン（Ｆｃ含有）コンストラクトを以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、２０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６．８で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）にポンプ供給した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、１００ｍＭのクエン酸、ｐＨ３．５で溶離した。溶離したタンパク質は、１ｍｌの画分を２７５μＬの１Ｍトリスバッファー、ｐＨ９を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン（Ｅｄｍａｎ）分解によりＮ末端アミノ酸配列決定した。

【０４４７】

ここに開示されるＴＡＴポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現

させ精製した。
【０４４８】
実施例１４：酵母中でのＴＡＴの発現
以下の方法は、酵母中でのＴＡＴの組換え発現を記述する。
第１に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＴＡＴの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。ＴＡＴをコードするＤＮＡ及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してＴＡＴの細胞内発現を指示する。分泌のために、ＴＡＴをコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターをコードするＤＮＡ、天然ＴＡＴシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又は転化酵素分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＴＡＴの発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。
【０４４９】
酵母菌株ＡＢ１１０等の酵母菌は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、１０％トリクロロ酢酸での沈降及びＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。
【０４５０】
続いて組換えＴＡＴは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ＴＡＴを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。
【０４５１】
ここに開示されるＴＡＴポリペプチドのあるものは、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。
【０４５２】
実施例１５：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのＴＡＴの発現
以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるＴＡＴの組換え発現を示す。
ＴＡＴをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-Ｈｉｓタグ及び免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Ｎｏｖａｇｅｎ）などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単に述べると、ＴＡＴコード化配列，又はＴＡＴのコード化配列の所望する部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、５’及び３’領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅される。５’プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。
【０４５３】
組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ^{TM}ウイルスＤＮＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）中にリポフェクチン（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販）を用いて同時形質移入することにより作成される。２８℃で４－５日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等，Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual，Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。
【０４５４】
次に、発現されたポリ-ＨｉｓタグＴＡＴは、例えばＮｉ$^{2+}$－キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等，Nature，362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えＳｆ９細胞から調製し

た。簡単には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（２５ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．９；１２．５ｍＭの$MgCl_2$；０．１ｍＭのＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％のＮＰ－４０；０．４ＭのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で２回２０秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清をローディングバッファー（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターで濾過した。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販）を５ｍＬの総容積で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬのローディングバッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分０．５ｍＬでカラムに充填した。カラムを、分画回収が始まる点であるA_{280}のベースラインまでローディングバッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ６．０）で洗浄した。A_{280}のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で０から５００ｍＭイミダゾール勾配で展開した。１ｍＬの分画を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Ｑｉａｇｅｎ）に複合したNi^{2+}－ＮＴＡでのウエスタンブロットで分析した。溶離したHis_{10}－タグＴＡＴを含む画分をプールしてローディングバッファーで透析した。

【０４５５】

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）ＴＡＴの精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

【０４５６】

ここに開示されるＴＡＴポリペプチドの一部は、この方法を使用して成功裏に発現させ精製した。

【０４５７】

実施例１６：特異的抗体を用いたＴＡＴポリペプチドの精製

天然又は組換えＴＡＴポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-ＴＡＴポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-ＴＡＴポリペプチドは、対象のＴＡＴポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗ＴＡＴポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

【０４５８】

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインＡ(Ｐｈａｒｍａｃｉａ ＬＫＢ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ)での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインＡでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、ＣｎＢｒ-活性化セファロース™(Ｐｈａｒｍａｃｉａ ＬＫＢ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ)等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

【０４５９】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のＴＡＴポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるＴＡＴポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化ＴＡＴポリペプチドは、細胞が増殖する培地中に有用な量で分泌される。

【０４６０】

可溶化ＴＡＴポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはＴＡＴポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。ついで、カラムは、抗体／ＴＡＴポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約２－３といった低いｐＨ、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカ

オトロープ)で溶離され、ＴＡＴポリペプチドが回収される。

【０４６１】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した実施物は、本発明のある態様の一つの例示として意図されており、機能的に等価なあらゆるコンストラクトがこの発明の範囲内にあるため、寄託されたコンストラクトにより、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の態様の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

【図１】

FIGURE 1

CAGCCCAGCACCTGCGGAGGGAGCGCTGACC**ATG**GCTCCCTGGCCTGAATTGGGAGATGCCCAGCCCAACCC
CGATAAGTACCTCGAAGGGGCCGCAGGTCAGCAGCCCACTGCCCCTGATAAAAGCAAAGAGACCAACAAAAC
AGATAACACTGAGGCACCTGTAACCAAGATTGAACTTCTGCCGTCCTACTCCACGGCTACACTGATAGATGA
GCCCACTGAGGTGGATGACCCCTGGAACCTACCCACTCTTCAGGACTCGGGGATCAAGTGGTCAGAGAGAGA
CACCAAAGGGAAGATTCTCTGTTTCTTCCAAGGGATTGGGAGATTGATTTTACTTCTCGGATTTCTCTACTT
TTTCGTGTGCTCCCTGGATATTCTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGAGGAAAAATGGCAGGACAGTTCTT
CAGCAACAGCTCTATTATGTCCAACCCTTTGTTGGGGCTGGTGATCGGGGTGCTGGTGACCGTCTTGGTGCA
GAGCTCCAGCACCTCAACGTCCATCGTTGTCAGCATGGTGTCCTCTTCATTGCTCACTGTTCGGGCTGCCAT
CCCCATTATCATGGGGGCCAACATTGGAACGTCAATCACCAACACTATTGTTGCGCTCATGCAGGTGGGAGA
TCGGAGTGAGTTCAGAAGAGCTTTTGCAGGAGCCACTGTCCATGACTTCTTCAACTGGCTGTCCGTGTTGGT
GCTCTTGCCCGTGGAGGTGGCCACCCATTACCTCGAGATCATAACCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTCCACTT
CAAGAATGGAGAAGATGCCCCAGATCTTCTGAAAGTCATCACTAAGCCCTTCACAAAGCTCATTGTCCAGCT
GGATAAAAAAGTTATCAGCCAAATTGCAATGAACGATGAAAAAGCGAAAAACAAGAGTCTTGTCAAGATTTG
GTGCAAAACTTTTACCAACAAGACCCAGATTAACGTCACTGTTCCCTCGACTGCTAACTGCACCTCCCCTTC
CCTCTGTTGGACGGATGGCATCCAAAACTGGACCATGAAGAATGTGACCTACAAGGAGAACATCGCCAAATG
CCAGCATATCTTTGTGAATTTCCACCTCCCGGATCTTGCTGTGGGCACCATCTTGCTCATACTCTCCCTGCT
GGTCCTCTGTGGTTGCCTGATCATGATTGTCAAGATCCTGGGCTCTGTGCTCAAGGGGCAGGTCGCCACTGT
CATCAAGAAGACCATCAACACTGATTTCCCCTTTCCCTTTGCATGGTTGACTGGCTACCTGGCCATCCTCGT
CGGGGCAGGCATGACCTTCATCGTACAGAGCAGCTCTGTGTTCACGTCGGCCTTGACCCCCCTGATTGGAAT
CGGCGTGATAACCATTGAGAGGGCTTATCCACTCACGCTGGGCTCCAACATCGGCACCACCACCACCGCCAT
CCTGGCCGCCTTAGCCAGCCCTGGCAATGCATTGAGGAGTTCACTCCAGATCGCCCTGTGCCACTTTTTCTT
CAACATCTCCGGCATCTTGCTGTGGTACCCGATCCCGTTCACTCGCCTGCCCATCCGCATGGCCAAGGGGCT
GGGCAACATCTCTGCCAAGTATCGCTGGTTCGCCGTCTTCTACCTGATCATCTTCTTCTTCCTGATCCCGCT
GACGGTGTTTGGCCTCTCGCTGGCCGGCTGGCGGGTGCTGGTTGGTGTCGGGGTTCCCGTCGTCTTCATCAT
CATCCTGGTACTGTGCCTCCGACTCCTGCAGTCTCGCTGCCCACGCGTCCTGCCGAAGAAACTCCAGAACTG
GAACTTCCTGCCGCTGTGGATGCGCTCGCTGAAGCCCTGGGATGCCGTCGTCTCCAAGTTCACCGGCTGCTT
CCAGATGCGCTGCTGCTGCTGCTGCCGCGTGTGCTGCCGCGCGTGCTGCTTGCTGTGTGGCTGCCCCAAGTG
CTGCCGCTGCAGCAAGTGCTGCGAGGACTTGGAGGAGGCGCAGGAGGGGCAGGATGTCCCTGTCAAGGCTCC
TGAGACCTTTGATAACATAACCATTAGCAGAGAGGCTCAGGGTGAGGTCCCTGCCTCGGACTCAAAGACCGA
ATGCACGGCCTTG**TAG**GGGACGCCCCAGATTGTCAGGGATGGGGGGATGGTCCTTGAGTTTTGCATGCTCTC
CTCCCTCCCACTTCTGCACCCTTTCACCACCTCGAGGAGATTTGCTCCCCATTAGCGAATGAAATTGATGCA
GTCCTACCTAACTCGATTCCCTTTGGCTTGGTGGGTAGGCCTGCAGGGCACTTTTATTCCAACCCATGGCCT
CCATGACTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図２】

FIGURE 2

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTEVDDPWNLPTL
QDSGIKWSERDTKGKILCFFQGIGRLILLLGFLYFFVCSLDILSSAFQLVGGKMAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIG
VLVTVLVQSSSTSTSIVVSMVSSSLLTVRAAIPIIMGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFFNW
LSVLVLLPVEVATHYLEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPFTKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKSLVK
IWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKNVTYKENIAKCQHIFVNFHLPDLAVGTILLILSLLV
LCGCLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKTINTDPFPFPAWLTGYLAILVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVIT
IERAYPLTLGSNIGTTTTAILAALASPGNALRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLPIRMAKGLGNISAKY
RWFAVFYLIIFFFLIPLTVPGLSLAGWRVLVGVGVPVVFIIILVLCLRLLQSRCPRVLPKKLQNWNFLPLWMRSL
KPWDAVVSKFTGCFQMRCCCCCRVCCRACCLLCGCPKCCRCSKCCEDLEEAQEGQDVPVKAPETFDNITISREAQ
GEVPASDSKTECTAL

膜貫通ドメイン

amino acids 96-116, 136-156, 178-198, 219-239, 356-376, 372-392, 406-426, 445-465, 488-508, 523-543, 547-567, 563-583, 592-612

N-グリコシル化部位

amino acids 36-39, 136-139, 295-298, 308-311, 313-316, 321-324, 335-338, 340-343, 495-498, 520-523, 667-670

N-ミリストイル化部位

amino acids 23-28, 79-84, 126-131, 131-136, 146-151, 150-155, 187-192, 191-196, 393-398, 423-428, 460-465, 464-469, 519-524, 546-551, 634-639

4Fe-4S フェレドキシン、鉄硫黄結合領域の特徴

amino acids 635-645

インスリンファミリーの特徴

amino acids 621-635

Na+/Pi-共輸送体

amino acids 118-549

【図３Ａ】

FIGURE 3A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mu10H1-L	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
10H1-グラフト	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.2B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.4B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.5B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.6B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mu10H1-L	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	L
10H1-グラフト	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.1	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.2B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.4B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.5B	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.6B	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P

【図３Ｂ】

FIGURE 3A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mu10H1-L	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
10H1-グラフト	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.2B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.4B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.5B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.6B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mu10H1-L	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	L
10H1-グラフト	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.1	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.2B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.4B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.5B	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.6B	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P

【図３Ｃ】

FIGURE 3B

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mu10H1-L	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S
10H1-graft	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.2B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.4B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.5B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.6B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S

Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mu10H1-L	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	L	E	A	E	D	L	G	V	Y
10H1-graft	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.1	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.2B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.4B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.5B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.6B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

FIGURE 3C

Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号3)
mu10H1-L	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号4)
10H1-グラフト	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号5)
10H1.11	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号6)
10H1.11.1	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号7)
10H1.11.2B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号8)
10H1.11.4B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号9)
10H1.11.5B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号10)
10H1.11.6B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(配列番号11)

【図４Ａ】

FIGURE 4A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mu10H1-H	E	V	M	L	V	E	S	G	G	G	L	V	R	P	G	G	S	L	K	V	S	C	A	A	S
10H1-グラフト	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.2B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.4B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.5B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.6B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V
mu10H1-H	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	R	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T
10H1-グラフト	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.1	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.2B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.4B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.5B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.6B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T

【図４Ｂ】

FIGURE 4B

Kabat#	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
hum III	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
mu10H1-H	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A
10H1-グラフト	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.1	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.2B	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	Y	P	V	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.4B	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.5B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.6B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S

Kabat#	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
hum III	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	
mu10H1-H	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	S	D	D	T	A	I	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1-グラフト	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.1	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.2B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.4B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.5B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.6B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R

【図４Ｃ】

FIGURE 4C

Kabat#	97	98	99	100	A	B	...	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
hum III								F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号12)
mu10H1-H	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	L	T	V	S	A	(配列番号13)
10H1-グラフト	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号14)
10H1.11	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号15)
10H1.11.1	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号16)
10H1.11.2B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号17)
10H1.11.4B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号18)
10H1.11.5B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号19)
10H1.11.6B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(配列番号20)

【図５】

FIGURE 5

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	
	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	(配列番号21)
	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	(配列番号22)
	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号23)
	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号24)
	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号25)
	R	S	S	G	T	L	L	H	N		N	G	N	T	Y	L	E	(配列番号26)
	R	S	S	E	T	L	V	H	R		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号27)
	R	S	S	E	T	L	V	H	T		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号28)
	R	S	S	E	T	L	V	H	G		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号29)
	R	S	S	E	T	L	V	H	A		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号30)
	R	S	S	E	T	L	V	H	N		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号31)
	R	S	S	E	T	L	V	H	K		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号32)
	R	S	S	R	T	L	E	H	A		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号33)
	R	S	S	Q	T	L	Q	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(配列番号34)

【図６】

FIGURE 6

Kabat#	50	51	52	53	54	55	56	
	A	A	S	S	L	E	S	(配列番号35)
	R	V	S	N	R	F	S	(配列番号36)
	R	V	S	Q	R	F	T	(配列番号37)
	R	V	S	N	R	F	R	(配列番号38)

【図７】

FIGURE 7

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	(配列番号39)
	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	(配列番号40)
	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	(配列番号41)

【図８】

FIGURE 8

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	(配列番号42)
	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	(配列番号43)
	S	S	S	F	S	D	F	A	L	S	(配列番号44)
	G	F	N	F	R	G	F	A	M	S	(配列番号45)

【図９】

FIGURE 9

Kabat#	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G (配列番号46)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G (配列番号47)
	A	T	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	Y	P	V	S	M	K	G (配列番号48)
	A	T	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	I	P	D	S	M	K	G (配列番号49)
	S	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	V	G	M	T	G (配列番号50)
	A	T	I	G	R	V	W	Y	H	R	Y	Y	P	D	S	M	V	R (配列番号51)
	G	T	I	G	W	M	V	S	H	T	Y	Y	P	Q	R	L	N	G (配列番号52)
	A	T	I	G	R	V	T	S	R	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G (配列番号53)
	A	T	I	G	R	V	Y	R	H	T	Y	Y	P	T	S	M	K	G (配列番号54)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	R	S	M	K	G (配列番号55)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	G	S	M	K	G (配列番号56)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	Y	P	A	S	M	K	G (配列番号57)
	A	T	I	G	R	V	E	Q	H	T	Y	Y	P	Q	S	M	K	G (配列番号58)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	G	S	M	K	G (配列番号59)
	A	T	I	G	R	V	A	L	H	T	Y	Y	P	Q	S	M	K	G (配列番号60)

【図１０】

FIGURE 10

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100 A	B	K	101	102	
	A	R	G								F	D	Y (配列番号61)
	V	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F (配列番号62)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	V	F (配列番号63)
	A	R	H	R	G	W	V	V	G	H	F	D	L (配列番号64)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F (配列番号65)

【図１１】

FIGURE 11

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT[-H1-]WVRQAPGQGLEWMG[-H2-]RVTITAD
TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号66)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS[-H1-]WVRQAPGQGLEWM[-H2-]RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYCAR[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号67)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS[-H1-]WVRQAPGQGLEWM[-H2-]RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号68)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS[-H1-]WVRQAPGQGLEWM[-H2-]RVTITADTSTSTA
YMELSSLRSEDTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号69)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS[-H1-]WIRQPPGKGLEWIG[-H2-]RVTISVD
TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号70)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS[-H1-]WIRQPPGKGLEWI[-H2-]RVTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCAR[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号71)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS[-H1-]WIRQPPGKGLEWI[-H2-]RVTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号72)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS[-H1-]WIRQPPGKGLEWI[-H2-]RVTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS[-H1-]WVRQAPGKGLEWV[-H2-]RFTISRDNSKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS[-H1-]WVRQAPGKGLEWV[-H2-]RFTISRDNSKNTF
YLQMNSLRAEDTAVYYC[-H3-]WGQGTLVTVSS (配列番号75)

【図１２】

FIGURE 12

```
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C [-L1-] W Y Q Q K P G K A P K L L I [-L2-] G V P S R F S G S G S G T D
F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K R (配列番号76)

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C [-L1-] W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (配列番号77)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C [-L1-] W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y [-L2-] G I P D R F S G S G S G T
D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (配列番号78)

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C [-L1-] W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T
D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (配列番号79)
```

【図１３】

FIGURE 13

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAPGKGLEWVATIGRVAFHTYYPDSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号80)
```

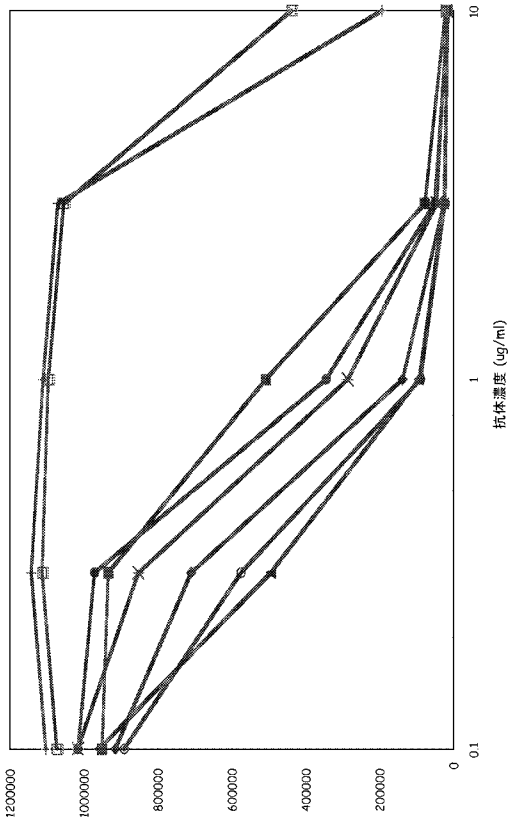
【図１４】

FIGURE 14

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号81)
```

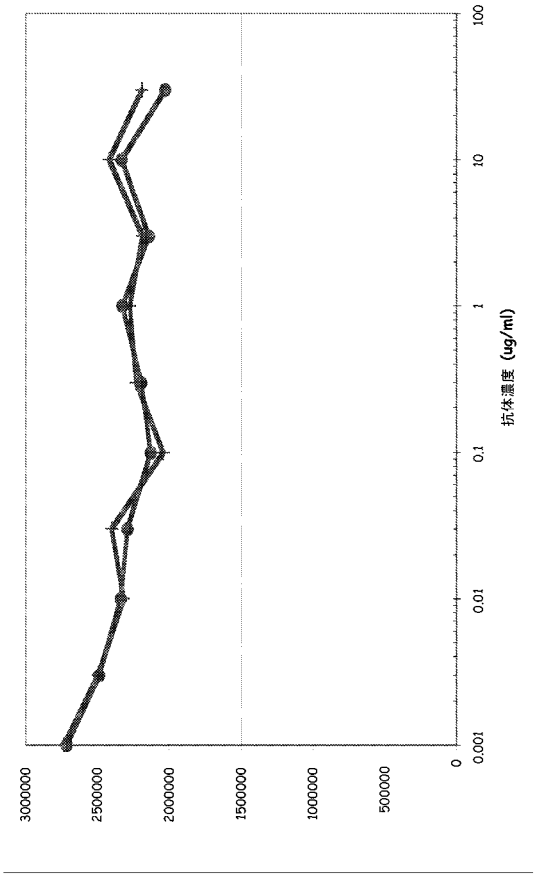
【図１５】

FIGURE 15



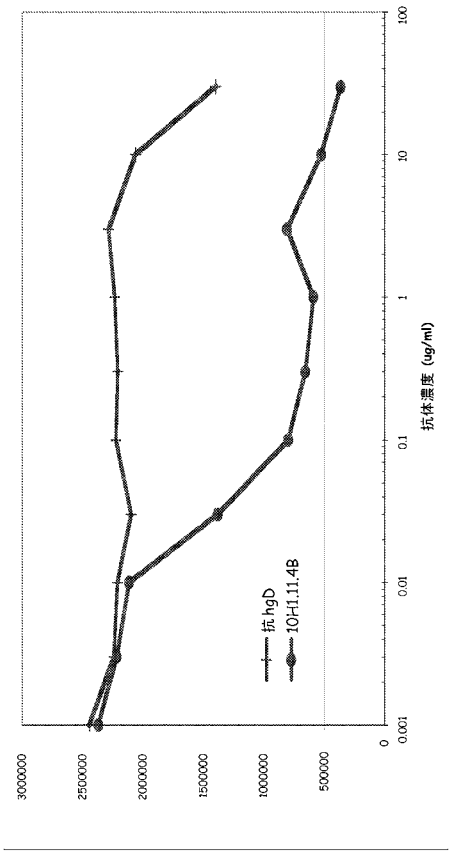
【図１６】

FIGURE 16



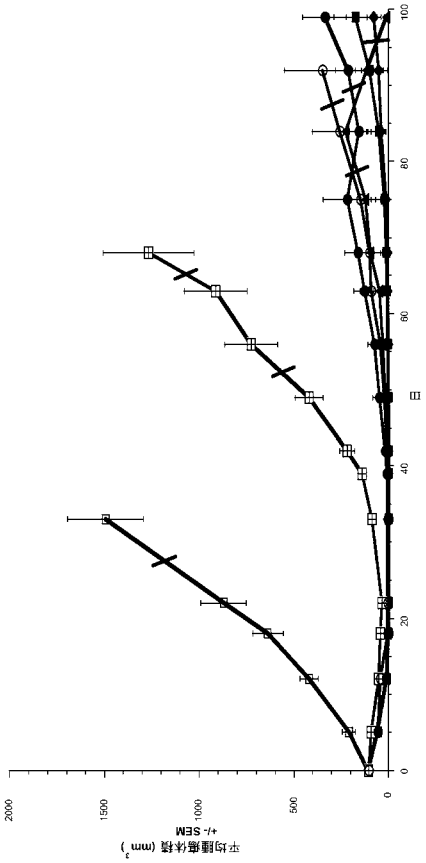
【図１７】

FIGURE 17



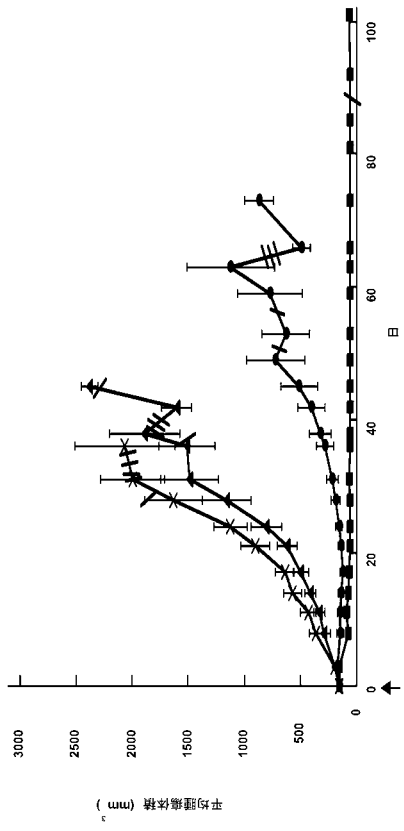
【図１８】

FIGURE 18



【図１９】

FIGURE 19



【配列表】
2013511993000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成23年10月18日(2011.10.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号２１－３４の何れか一のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３５－３８の何れか一のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号３９－４１の何れか一のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４２－４５の何れか一のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４６－６０の何れか一のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６１－６５の何れか一のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含むＴＡＴ２１１を結合する単離された抗体。
【請求項２】
（ａ）配列番号２２のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６２のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項３】
（ａ）配列番号２３のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６２のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項４】
（ａ）配列番号２３のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４８のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６５のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項５】
（ａ）配列番号２３のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４９のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６５のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。

【請求項６】
（ａ）配列番号２４のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６５のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項７】
（ａ）配列番号２５のＣＤＲ－Ｌ１配列、
（ｂ）配列番号３６のＣＤＲ－Ｌ２配列、
（ｃ）配列番号４１のＣＤＲ－Ｌ３配列、
（ｄ）配列番号４３のＣＤＲ－Ｈ１配列、
（ｅ）配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ２配列、及び
（ｆ）配列番号６５のＣＤＲ－Ｈ３配列
を含む請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項８】
図２（配列番号２）に示されたＴＡＴ２１１ポリペプチドのアミノ酸３２０－３６１の間に位置する抗原エピトープに結合する単離された抗体。
【請求項９】
配列番号６６－７５の何れか一のＶＨアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む請求項１から７の何れか一項に記載の単離された抗体。
【請求項１０】
配列番号７６－７９の何れか一のＶＬアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む請求項１－７の何れか一項に記載の単離された抗体。
【請求項１１】
配列番号６６－７５の何れか一つのＶＨアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列、及び配列番号７６－７９の何れか一つのＶＬアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を更に含む、請求項１から７の何れか一項に記載の単離された抗体。
【請求項１２】
抗体断片である、請求項１から８の何れか一項に記載の抗体。
【請求項１３】
キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項１から８の何れか一項に記載の抗体。
【請求項１４】
増殖阻害剤にコンジュゲートしている、請求項１から８の何れか一項に記載の抗体。
【請求項１５】
細胞障害性剤にコンジュゲートしている、請求項１から８の何れか一項に記載の抗体。
【請求項１６】
細胞障害性剤が、毒素、抗生物質、放射性同位元素及び核酸分解酵素からなる群より選択される、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１７】
細胞障害性剤が毒素である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１８】
毒素が、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項１７に記載の抗体。
【請求項１９】
毒素がアウリスタチンである、請求項１７に記載の抗体。
【請求項２０】
毒素がモノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）である、請求項１９に記載の抗体。
【請求項２１】

毒素がモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）である、請求項１９に記載の抗体。
【請求項２２】
マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-ｐ-アミノベンジルオキシカルボニル-モノメチルアウリスタチンＥ(ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ)にコンジュゲートした、請求項２に記載の抗体。
【請求項２３】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項３に記載の抗体。
【請求項２４】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項４に記載の抗体。
【請求項２５】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項５に記載の抗体。
【請求項２６】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項６に記載の抗体。
【請求項２７】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項７に記載の抗体。
【請求項２８】
細菌中で産生される、請求項１に記載の抗体。
【請求項２９】
ＣＨＯ細胞中で産生される、請求項１に記載の抗体。
【請求項３０】
結合する細胞の死を誘発する、請求項１から２７の何れか一項に記載の抗体。
【請求項３１】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項３０に記載の抗体。
【請求項３２】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項３０に記載の抗体。
【請求項３３】
検出可能に標識される、請求項１から８の何れか一項に記載の抗体。
【請求項３４】
配列番号６－１１に示された何れかのＶＬ配列を含む単離された抗体。
【請求項３５】
配列番号１５－２０に示された何れかのＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項３６】
配列番号６のＶＬ配列及び配列番号１５のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項３７】
配列番号７のＶＬ配列及び配列番号１６のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項３８】
配列番号８のＶＬ配列及び配列番号１７のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項３９】
配列番号９のＶＬ配列及び配列番号１８のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項４０】
配列番号１０のＶＬ配列及び配列番号１９のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項４１】
配列番号１１のＶＬ配列及び配列番号２０のＶＨ配列を含む単離された抗体。
【請求項４２】
配列番号８０の重鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項４３】
配列番号８１の軽鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項４４】
配列番号８０の重鎖配列及び配列番号８１の軽鎖配列を含む単離された抗体。
【請求項４５】

ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項３６に記載の抗体。
【請求項４６】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項３７に記載の抗体。
【請求項４７】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４８】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項３９に記載の抗体。
【請求項４９】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項４０に記載の抗体。
【請求項５０】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項４１に記載の抗体。
【請求項５１】
ＭＣ-ｖａｌ-ｃｉｔ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥへコンジュゲートした、請求項４４に記載の抗体。
【請求項５２】
請求項１から７及び３４から４４の何れか一項に記載の抗体を産生する細胞。
【請求項５３】
請求項１から７及び３４から４４の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。
【請求項５４】
第二の抗体が結合したＴＡＴ２１１抗原性エピトープへ結合する第一の抗体を同定する方法であって、該第二の抗体は請求項１に記載の抗体であり、該方法は、該第二の抗体のＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合を遮断する該第一の抗体の能力を決定することを含み、該第二の抗体の該ＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合を遮断する該第一の抗体の能力が、等しい抗体濃度で少なくとも４０％であった場合に、該第二の抗体が結合したエピトープへ結合することができる該第一の抗体を示す方法。
【請求項５５】
ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、該細胞に、請求項１から２７及び３４から５１の何れか一項に記載の抗体を接触させることを含み、該抗体の該ＴＡＴ２１１ポリペプチドへの結合が、該細胞の増殖の阻害を引き起こす方法。
【請求項５６】
前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５９】
ＴＡＴ２１１ポリペプチドを発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、該方法が、該哺乳動物に対して請求項１から２７及び３４から４４の何れか一項に記載の抗体の治療的有効量を投与することにより、該哺乳動物を効果的に処置することを含む方法。
【請求項６０】

前記ＴＡＴ２１１ポリペプチドが配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６２】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６３】
ＴＡＴ２１１タンパク質を含むと疑われる試料中における該タンパク質の存在を決定する方法であって、該方法が、請求項１から８及び３４から４４の何れか一項に記載の抗体に該試料を曝露し、該試料中の該タンパク質に対する該抗体の結合を決定することを含み、該タンパク質への抗体の結合が、該試料中における該タンパク質の存在を示す方法。
【請求項６４】
前記試料が、前記タンパク質を発現すると疑われる細胞を含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記細胞が卵巣癌細胞である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記細胞が肺癌細胞である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６７】
前記抗体が検出可能に標識される、請求項６４に記載の方法。
【請求項６８】
哺乳動物において腫瘍の存在を診断する方法であって、該哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料を、請求項１から８及び３４から４４の何れか一項に記載の抗体と接触させて、試験試料中での該抗体とＴＡＴ２１１タンパク質との複合体の形成を検出することを含み、複合体の形成が、該哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。
【請求項６９】
前記の組織細胞の試験試料が、癌性腫瘍を有すると疑われる個体から得られる、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記癌性腫瘍が卵巣又は肺腫瘍である、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記ＴＡＴ２１１タンパク質が配列番号２のアミノ酸配列又はその細胞外ドメインを含む、請求項６８に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30 C07K16/28 A61K47/48 G01N33/574 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/81579 A1 (EURO CELTIQUE SA [LU]; BURCH RONALD MARTIN [US]; SOLTIS DANIEL ANDREW) 1 November 2001 (2001-11-01)	1-18,30, 31
Y	SeqID 32; abstract; sequences 2, 32	2-4
X	WO 01/88159 A2 (EURO CELTIQUE SA [LU]; BURCH RONALD MARTIN [US]; SOLTIS DANIEL ANDREW) 22 November 2001 (2001-11-22)	1-18
Y	seqID 10claim 34; sequence 10	2-4
Y	WO 2007/001851 A2 (GENENTECH INC [US]; DENNIS MARK [US]; MALLET WILLIAM [US]; POLAKIS PAU) 4 January 2007 (2007-01-04) the whole document	2-4

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 April 2011	18/07/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lechner, Oskar

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/058197

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-18, 30, 31(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058197

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RANGEL LETICIA B A ET AL: "Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression.", ONCOGENE 16 OCT 2003 LNKD-PUBMED:14562052, vol. 22, no. 46, 16 October 2003 (2003-10-16), pages 7225-7232, XP002633637, ISSN: 0950-9232 the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/058197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0181579 A1	01-11-2001	AU 4787801 A	07-11-2001
WO 0188159 A2	22-11-2001	AU 6162801 A	26-11-2001
WO 2007001851 A2	04-01-2007	AU 2006262603 A1	04-01-2007
		AU 2010251794 A1	13-01-2011
		BR PI0613382 A2	29-06-2010
		CA 2611778 A1	04-01-2007
		CN 101948541 A	19-01-2011
		EC SP088122 A	20-02-2008
		EP 1910419 A2	16-04-2008
		EP 2135881 A1	23-12-2009
		JP 2008546780 A	25-12-2008
		KR 20080017104 A	25-02-2008
		KR 20090101980 A	29-09-2009
		KR 20100084706 A	27-07-2010
		MA 29615 B1	01-07-2008
		NZ 563370 A	29-10-2010
		RU 2009136946 A	20-04-2011
		SG 155947 A1	29-10-2009
		US 2009041749 A1	12-02-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/ US2010/ 058197

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-18, 30, 31(all partially)

An isolated antibody comprising at least one CDR sequence according to SEQID 21

2-45. claims: 1-18, 30, 31(all partially)

An isolated antibody comprising at least one CDR sequence according to SEQID 22...65, respectively, excluding Ab comprising a sequence of a previous invention.

46-51. claims: 19, 21-29(all partially)

An isolated Ab comprising a VL sequence of any shown in SeqID 6-11

52-57. claims: 20-26(partially)

An isolated Ab comprising a VH sequence of any shown in SeqID 15-20

---

58. claim: 27

An isolated Ab comprising a VL sequence of any shown in SeqID 80

---

59. claim: 28

An isolated Ab comprising a VH sequence of any shown in SeqID 81

---

60. claims: 29, 32-45, 51-54

Method of identifying TAT211 specific Ab and their therapeutic and diagnostic use esp. in the context of cancer.

---

61. claims: 46-50

A method of determining the presence of a TAT211 protein in a sample suspected of containing said protein, said method comprising exposing said sample to an antibody of Claim 1 and determining binding of said antibody to said protein in said sample, wherein binding of the antibody to said protein is indicative of the presence of said protein in said

International Application No. PCT/US2010/058197

sample.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１	
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
			Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．サランラップ

(72)発明者 ポラキス, ポール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 ルービンフェエルド, ボニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA04 DA02 EA04 GA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB31 DD63 DD88 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	用于肿瘤诊断和治疗的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2013511993A5	公开(公告)日	2013-05-30
申请号	JP2012541221	申请日	2010-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	デニスマーク ポラキスポール ルービンフェエルドボニー		
发明人	デニス, マーク ポラキス, ポール ルービンフェエルド, ボニー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/537 A61K47/6817 A61K47/6849 A61K47/6851 A61P35/00 A61P37/04 A61K47/6803 A61K47/6809 A61K47/6857 A61K47/6869 C07K16/28 C07K16/30 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/73 C07K2317/77 G01N33/57492 A61K45/06 A61K47/6813 A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/3023 C07K16/3069 C07K2317/14 C07K2317/56 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/57423 G01N33/57449		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	61/265262 2009-11-30 US 61/384467 2010-09-20 US		
其他公开文献	JP2013511993A JP5856065B2		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断和治疗哺乳动物肿瘤的组合物和使用这些组合物的方法。