

(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2010-513306

(P2010-513306A)

(43) 公表日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 B O 2 4
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 190 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-541586 (P2009-541586)	(71) 出願人	506199879
(86) (22) 出願日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		メダレックス インコーポレーティッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月5日 (2009.8.5)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/087401		リンストン ステイト ロード 707
(87) 国際公開番号	W02008/074004	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成20年6月19日 (2008.6.19)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/870,091	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成18年12月14日 (2006.12.14)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	60/915,314		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成19年5月1日 (2007.5.1)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	60/991,702	(74) 代理人	100142929
(32) 優先日	平成19年11月30日 (2007.11.30)		弁理士 井上 隆一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 CD70に結合するヒト抗体およびその使用

(57) 【要約】

本開示は、CD70に高親和性で特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。好ましくは、抗体はヒトCD70に結合する。特定の実施形態では、抗体は、CD70発現細胞に内在化されうるかまたは抗原依存性細胞障害作用を媒介する能力がある。本開示の抗体をコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞および本開示の抗体を発現するための方法も提供される。抗体-パートナー分子複合体、二重特異性分子および本開示の抗体を含有する医薬組成物も提供される。本開示はまた、CD70を検出するための方法、ならびに本開示の抗CD70抗体を用いて癌、例えば腎癌およびリンパ腫を治療するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体であって、

前記抗体が、ヒトCD70に結合し、かつ

(a) ヒトCD70に 1×10^{-7} M以下の K_D で結合する特性、および

(b) 腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する特性、

(c) リンパ腫細胞系に結合する特性、

(d) CD70発現細胞により内在化される特性、

(e) CD70発現細胞に対して抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を示す特性、および

(f) 細胞毒素に結合される場合、インビボでCD70発現細胞の成長を阻害する特性のうち少なくとも1つを示し、

前記パートナー分子が治療剤である、抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 2】

前記抗体が特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうち少なくとも2つを示す、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 3】

前記抗体が特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうち少なくとも3つを示す、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 4】

前記抗体が特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうち少なくとも4つを示す、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 5】

前記抗体が特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうち少なくとも5つを示す、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 6】

前記抗体が特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)の6つ全部を示す、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 7】

ヒトCD70に 5.5×10^{-9} M以下の親和性で結合する、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 8】

ヒトCD70に 3×10^{-9} M以下の親和性で結合する、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 9】

ヒトCD70に 2×10^{-9} M以下の親和性で結合する、請求項1記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 10】

参照抗体により認識されるヒトCD70上のエピトープに結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体であって、

前記参照抗体が、

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(d) 配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号10のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む軽鎖可変領域、

(e) 配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(f) 配列番号73のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(g) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含み、前記パートナー分子が治療剤である、抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項11】

前記参照抗体が配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

10

【請求項12】

前記参照抗体が配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項13】

前記参照抗体が配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項14】

前記参照抗体が配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

20

【請求項15】

前記参照抗体が配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項16】

前記参照抗体が配列番号73のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

。

【請求項17】

前記参照抗体が配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項10記載の抗体 - パートナー分子複合体。

30

【請求項18】

ヒトV_H3-30.3遺伝子、ヒトV_H3-33遺伝子、ヒトV_H4-61遺伝子、またはヒトV_H3-23遺伝子の、産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体であって、前記抗体がCD70に特異的に結合し、前記パートナー分子が治療剤である、抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項19】

ヒトV_KL6遺伝子、ヒトV_KL18遺伝子、ヒトV_KL15遺伝子、ヒトV_KL6遺伝子、またはヒトV_KA27遺伝子の、産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体であって、前記抗体がCD70に特異的に結合し、前記パートナー分子が治療剤である、抗体 - パートナー分子複合体。

40

【請求項20】

以下を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

(a) ヒトV_H3-33遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域およびヒトV_KL15遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域、

(b) ヒトV_H3-30.3遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域およびヒトV_KL6遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域、ここで前記抗体はヒトCD70に特異的に結合し、

(c) ヒトV_H3-30.3遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域

50

およびヒト $V_{\kappa}L18$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域、ここで前記抗体はヒトCD70に特異的に結合し、

(d) ヒト V_H4-61 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域およびヒト $V_{\kappa}L6$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域、ここで前記抗体はヒトCD70に特異的に結合し、あるいは

(e) ヒト V_H3-23 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域およびヒト $V_{\kappa}A27$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域、ここで前記抗体はヒトCD70に特異的に結合する；ならびに

治療剤であるパートナー分子

を含む、抗体 - パートナー分子複合体。

10

【請求項 2 1】

- (a) 配列番号 1 3 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 1 9 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 2 5 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 3 1 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 3 7 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 4 3 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 2 2】

- (a) 配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 2 0 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 2 6 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 3 2 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 3 8 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 4 4 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

20

【請求項 2 3】

- (a) 配列番号 1 5 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 2 1 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 2 7 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 3 3 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 3 9 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 4 5 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

30

【請求項 2 4】

- (a) 配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 2 2 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 2 8 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 3 4 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 4 0 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 4 6 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

40

【請求項 2 5】

- (a) 配列番号 1 7 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 2 3 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 2 9 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 4 1 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 4 7 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

50

【請求項 26】

- (a) 配列番号 17 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 23 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 75 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 35 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 41 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 47 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 27】

- (a) 配列番号 18 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 24 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 30 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 36 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 42 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 48 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 28】

(a) 配列番号 1 ~ 6 および 73 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

(b) 配列番号 7 ~ 12 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、パートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体であって、前記抗体がヒト CD70 タンパク質に特異的に結合し、前記パートナー分子が治療剤である、抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 29】

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 30】

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 31】

- (a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 32】

- (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 33】

- (a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 34】

- (a) 配列番号 73 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 35】

- (a) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

10

20

30

40

50

を含む、請求項 28 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 36】

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(f) 配列番号 73 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(g) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む抗体により認識されるヒト CD70 タンパク質上のエピトープに結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、治療剤であるパートナー分子とを含む、抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 37】

請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体および薬学的に許容できる担体を含む、組成物。

【請求項 38】

治療剤が細胞毒素である、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 39】

請求項 38 記載の抗体 - パートナー分子複合体および薬学的に許容できる担体を含む、組成物。

【請求項 40】

治療剤が放射性同位体である、請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体。

【請求項 41】

請求項 40 記載の抗体 - パートナー分子複合体および薬学的に許容できる担体を含む、組成物。

【請求項 42】

CD70 発現腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、CD70 発現腫瘍細胞と請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子複合体とを、CD70 発現腫瘍細胞の成長が阻害されるように接触させる工程を含む、方法。

【請求項 43】

CD70 発現腫瘍細胞が腎腫瘍細胞またはリンパ腫細胞である、請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

CD70 発現腫瘍細胞が腎細胞癌またはリンパ腫からなる群より選択される癌に由来する、請求項 42 記載の方法。

【請求項 45】

対象における癌を治療する方法であって、対象に請求項 1 記載の抗体 - パートナー分子を、対象における癌が治療されるように投与する工程を含む、方法。

【請求項 46】

癌が腎細胞癌またはリンパ腫である、請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

癌が、腎細胞癌 (RCC)、明細胞 RCC、グリア芽腫、非ホジキンリンパ腫 (NHLL)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、パーキットリンパ

10

20

30

40

50

腫、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）、多発性骨髄腫、皮膚T細胞リンパ腫、結節性小切れ込み細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T細胞白血病/リンパ腫（ATLL）、成人T細胞白血病（T-ALL）、中心芽細胞性/中心細胞性（cb/cc）濾胞性リンパ腫癌、B細胞系のびまん性大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症（AILD）様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔に基づくリンパ腫、胎生期癌、鼻咽腔の未分化癌、シュミンケ腫瘍、キャッスルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストロームマクログロブリン血症、およびB細胞リンパ腫からなる群より選択される、請求項45記載の方法。

【請求項48】

対象における自己免疫疾患を治療または予防する方法であって、請求項1記載の抗体-パートナー分子を対象に投与する工程を含み、それによって対象における自己免疫疾患が治療または予防される、方法。

10

【請求項49】

対象における炎症を治療または予防する方法であって、対象における炎症が治療または予防されるように、請求項1記載の抗体-パートナー分子を前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項50】

対象におけるウイルス感染を治療する方法であって、対象におけるウイルス感染が治療されるように、請求項1記載の抗体-パートナー分子を対象に投与する工程を含む、方法。

20

【請求項51】

パートナー分子が化学リンカーにより抗体に結合される、請求項1記載の抗体-パートナー分子複合体。

【請求項52】

化学リンカーが、ペプチジルリンカー、ヒドラジンリンカー、およびジスルフィドリンカーからなる群より選択される、請求項51記載の抗体-パートナー分子複合体。

【請求項53】

腎細胞癌腫瘍細胞系が、786-O、A-498、ACHN、Caki-1およびCaki-2細胞系からなる群より選択される、請求項1記載の抗体-パートナー分子複合体。

30

【請求項54】

リンパ腫細胞系がB細胞腫瘍細胞系である、請求項1記載の抗体-パートナー分子複合体。

【請求項55】

B細胞腫瘍細胞系が、Dauidi、HuT78、RajiおよびGrant519細胞系からなる群より選択される、請求項54記載の抗体-パートナー分子複合体。

【請求項56】

抗体またはその抗原結合部分が非フコシル化される、請求項1記載の抗体-パートナー分子複合体。

【請求項57】

配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

40

【請求項58】

配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体により認識されるヒトCD70タンパク質上のエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項59】

- (a) 配列番号18を含む重鎖可変領域CDR1、
- (b) 配列番号24を含む重鎖可変領域CDR2、
- (c) 配列番号30を含む重鎖可変領域CDR3、

50

- (d) 配列番号 36 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 42 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、および
- (f) 配列番号 48 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 60】

抗体またはその抗原結合部分が非フコシル化される、請求項 57 記載の抗体。

【請求項 61】

請求項 57 記載の抗体またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子。

【請求項 62】

請求項 61 記載の核酸分子を含む発現ベクター。

10

【請求項 63】

請求項 62 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2006年12月14日に出願された米国仮特許出願第60/870,091号明細書、2007年5月1日に出願された米国仮特許出願第60/915,314号明細書および2007年11月30日に出願された米国仮特許出願第60/991,702号明細書に対する優先権を主張するものであり、それらの内容は参照により本明細書中に

20

援用される。

【背景技術】

【0002】

背景

サイトカイン受容体 CD27 は、細胞成長および分化ならびにアポトーシスまたはプログラム化された細胞死における役割を果たす腫瘍壊死因子受容体 (TFNR) スーパーファミリーのメンバーである。CD27 に対するリガンドは CD70 であり、それはリガンドの腫瘍壊死因子ファミリーに属する。CD70 は、2つの有望な N-結合グリコシル化部位を有する 20 アミノ酸の親水性 N 末端ドメインおよび C 末端ドメインを有する 193 アミノ酸ポリペプチドである (Goodwin R. G. ら (1993 年) Cell 73: 447 - 56 頁 (非特許文献 1); Bowman ら (1994 年) Immunol 152: 1756 - 61 頁 (非特許文献 2))。これらの特徴に基づき、CD70 は細胞外 C 末端部分を有する II 型膜貫通タンパク質であることが判定された。

30

【0003】

CD70 は活性化され、静止していない T および B リンパ球と樹状細胞上に一時的に見出される (Hintzen ら (1994 年) J. Immunol. 152: 1762 - 1773 頁 (非特許文献 3); Oshima ら (1998 年) Int. Immunol. 10: 517 - 26 頁 (非特許文献 4); Tesselaar ら (2003 年) J. Immunol. 170: 33 - 40 頁 (非特許文献 5))。CD70 の発現は、正常細胞上での発現に加え、腎細胞癌、転移性乳癌、脳腫瘍、白血病、リンパ腫および鼻咽腔癌を含む異なるタイプの癌において報告されている (Junker ら (2005 年) J. Urol. 173: 2150 - 3 頁 (非特許文献 6); Sloan ら (2004 年) Am. J. Pathol. 164: 315 - 23 頁 (非特許文献 7); Held-Feindt および Mentlein (2002 年) Int. J. Cancer 98: 352 - 6 頁 (非特許文献 8); Hishima ら (2000 年) Am. J. Surg. Pathol. 24: 742 - 6 頁 (非特許文献 9); Lens ら (1999 年) Br. J. Haematol. 106: 491 - 503 頁 (非特許文献 10))。さらに、CD70 は、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤または ERK 経路阻害剤で処理された T 細胞上で過剰発現され、場合により薬剤誘発性および特発性のループスをもたらすことが見出されている (Oelke ら (2004 年) Arthritis Rheum. 50: 1850 - 60 頁 (

40

50

非特許文献11))。CD70とCD27の相互作用はまた、細胞媒介性自己免疫疾患およびTNF- α の生成の阻害における役割を果たすことが提示されている(Nakajimaら(2000年)J. Neuroimmunol. 109: 188-96頁(非特許文献12))。

【0004】

したがって、CD70は、癌、自己免疫疾患およびCD70発現で特徴づけられる種々の他の疾患の治療における重要な標的を表す。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Goodwin R. G.ら(1993年)Cell 73: 447-56頁

【非特許文献2】Bowmanら(1994年)Immunol 152: 1756-61頁

【非特許文献3】Hintzenら(1994年)J. Immunol. 152: 1762-1773頁

【非特許文献4】Oshimaら(1998年)Int. Immunol. 10: 517-26頁

【非特許文献5】Tesselaarら(2003年)J. Immunol. 170: 33-40頁

【非特許文献6】Junkerら(2005年)J. Urol. 173: 2150-3頁

【非特許文献7】Sloanら(2004年)Am. J. Pathol. 164: 315-23頁

【非特許文献8】Held-FeindtおよびMentlein(2002年)Int. J. Cancer 98: 352-6頁

【非特許文献9】Hishimaら(2000年)Am. J. Surg. Pathol. 24: 742-6頁

【非特許文献10】Lensら(1999年)Br. J. Haematol. 106: 491-503頁

【非特許文献11】Oelkeら(2004年)Arthritis Rheum. 50: 1850-60頁

【非特許文献12】Nakajimaら(2000年)J. Neuroimmunol. 109: 188-96頁

【発明の概要】

【0006】

概要

本開示は、CD70に特異的に結合しかつ望ましい機能特性を有する単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。これらの特性は、ヒトCD70への高親和性結合、CD70を発現する細胞による内在化、抗体依存性細胞障害作用に対する媒介能、腎細胞癌腫瘍細胞系に対する結合能、および/またはリンパ腫細胞系、例えばB細胞腫瘍細胞系に対する結合能を含む。本発明の抗体を用い、例えばCD70タンパク質の検出またはCD70を発現する細胞、例えばCD70を発現する腫瘍細胞の成長に対する阻害が可能である。

【0007】

また、種々のCD70媒介性疾患を本開示の単離されたモノクローナル抗体およびその組成物を用いて治療するための方法が提供される。

【0008】

一態様では、本開示は、CD70に結合し、かつ、

(a) ヒトCD70に 1×10^{-7} M以下の K_D で結合する特性、および

(b) 腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する特性、

10

20

30

40

50

(c) リンパ腫細胞系、例えばB細胞腫瘍細胞系に結合する特性、
 (d) CD70発現細胞により内在化される特性、
 (e) CD70発現細胞に対して抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を示す特性、および
 (f) 細胞毒素に複合される場合、インビボでCD70発現細胞の成長を阻害する特性、
 のうちの少なくとも1つを示す、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。

【0009】

好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの少なくとも2つを示す。より好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの少なくとも3つを示す。より好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの4つを示す。さらにより好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの5つを示す。さらにより好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)の6つ全部を示す。さらに別の好ましい実施形態では、抗体は、細胞毒素に複合される場合、インビボでCD70発現腫瘍細胞の成長を阻害する。

10

【0010】

好ましくは、抗体は、786-O(ATCC登録番号CRL-1932)、A-498(ATCC登録番号HTB-44)、ACHN(ATCC登録番号CRL-1611)、Caki-1(ATCC登録番号HTB-46)およびCaki-2(ATCC登録番号HTB-47)からなる群より選択される腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する。

20

【0011】

好ましくは、抗体は、Dauid(ATCC登録番号CCL-213)、HuT78(ATCC登録番号TIB-161)、Raji(ATCC登録番号CCL-86)またはGrant-519(DSMZ登録番号342)細胞から選択されるB細胞腫瘍細胞系に結合する。

【0012】

好ましくは、抗体はヒト抗体であるが、他の実施形態では抗体はマウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体でありうる。

30

【0013】

より好ましい実施形態では、抗体はヒトCD70に 5.5×10^{-9} M以下の K_D で結合するかまたはヒトCD70に 3×10^{-9} M以下の K_D で結合するかまたはヒトCD70に 2×10^{-9} M以下の K_D で結合するかまたはヒトCD70に 1.5×10^{-9} M以下の K_D で結合する。

【0014】

別の実施形態では、抗体は786-O腎細胞癌腫瘍細胞により、同細胞上で発現されるCD70への結合後に内在化される。

【0015】

別の実施形態では、本開示は参照抗体により認識されるCD70上のエピトープへの結合に対して交差競合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで参照抗体は(a)ヒトCD70に 1×10^{-7} M以下の K_D で結合しかつ(b)腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する。

40

【0016】

様々な実施形態では、参照抗体は、
 (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域
 を含むか、または参照抗体は(a)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
 を含むか、または参照抗体は(a)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

50

(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または参照抗体は (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または参照抗体は (a) 配列番号 5 または 73 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または参照抗体は (a) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0017】

別の実施形態では、本開示の参照抗体は抗体 69A7Y である。69A7Y は、抗体 69A7 と同じであるが、配列番号 5 の V_H アミノ酸配列内に保存的修飾を有し、アミノ酸位置 100 での C (システイン) から Y (チロシン) への突然変異をもたらす。69A7Y の V_H アミノ酸配列は配列番号 73 で示される。C から Y への突然変異は、69A7 の V_H ヌクレオチド配列 (配列番号 53) のヌクレオチド位置 323 での G から A への単一の塩基対置換から生じる。69A7Y の V_H ヌクレオチド配列は配列番号 74 で示される。69A7Y は、配列番号 75 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR3 を有する。

【0018】

別の態様では、本発明は、ヒト V_H 3 - 30 . 3 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合された単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。本開示はまた、ヒト V_H 3 - 33 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体を提供する。本開示はまた、ヒト V_H 4 - 61 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体を提供する。本開示はまた、ヒト V_H 3 - 23 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体を提供する。

【0019】

本開示はまた、ヒト V_K L6 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体をさらに提供する。本開示はまた、ヒト V_K L18 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体をさらに提供する。本開示は、ヒト V_K L15 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体をさらに提供する。本開示は、ヒト V_K A27 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD70 に特異的に結合する、治療剤に結合されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む単離されたモノクローナル抗体をさらに提供する。

【0020】

特に好ましい抗体またはその抗原結合部分は、

- (a) 配列番号 13 を含む重鎖可変領域の CDR1
- (b) 配列番号 19 を含む重鎖可変領域の CDR2 ;
- (c) 配列番号 25 を含む重鎖可変領域の CDR3 ;
- (d) 配列番号 31 を含む軽鎖可変領域の CDR1 ;
- (e) 配列番号 37 を含む軽鎖可変領域の CDR2 ; および
- (f) 配列番号 43 を含む軽鎖可変領域の CDR3

10

20

30

40

50

を含む。

【0021】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号14を含む重鎖可変領域CDR1、
- (b) 配列番号20を含む重鎖可変領域CDR2、
- (c) 配列番号26を含む重鎖可変領域CDR3、
- (d) 配列番号32を含む軽鎖可変領域CDR1、
- (e) 配列番号38を含む軽鎖可変領域CDR2、および
- (f) 配列番号44を含む軽鎖可変領域CDR3

を含む。

10

【0022】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号15を含む重鎖可変領域CDR1、
- (b) 配列番号21を含む重鎖可変領域CDR2、
- (c) 配列番号27を含む重鎖可変領域CDR3、
- (d) 配列番号33を含む軽鎖可変領域CDR1、
- (e) 配列番号39を含む軽鎖可変領域CDR2、および
- (f) 配列番号45を含む軽鎖可変領域CDR3

を含む。

【0023】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号16を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号22を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 配列番号28を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 配列番号34を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 配列番号40を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 配列番号46を含む軽鎖可変領域のCDR3

を含む。

20

【0024】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号17を含む重鎖可変領域CDR1、
- (b) 配列番号23を含む重鎖可変領域CDR2、
- (c) 配列番号29または75を含む重鎖可変領域CDR3、
- (d) 配列番号35を含む軽鎖可変領域CDR1、
- (e) 配列番号41を含む軽鎖可変領域CDR2、および
- (f) 配列番号47を含む軽鎖可変領域CDR3

を含む。

30

【0025】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号18を含む重鎖可変領域CDR1、
- (b) 配列番号24を含む重鎖可変領域CDR2、
- (c) 配列番号30を含む重鎖可変領域CDR3、
- (d) 配列番号36を含む軽鎖可変領域CDR1、
- (e) 配列番号42を含む軽鎖可変領域CDR2、および
- (f) 配列番号48を含む軽鎖可変領域CDR3

を含む。

40

【0026】

本開示の他の好ましい抗体は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b) 配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合部分を有する。

50

【 0 0 2 7 】

別の好ましい組み合わせは、(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 2 8 】

別の好ましい組み合わせは、(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 2 9 】

別の好ましい組み合わせは、(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 0 】

別の好ましい組み合わせは、(a) 配列番号 5 または 7 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 1 】

別の好ましい組み合わせは、(a) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および (b) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 2 】

別の実施形態では、本開示の抗体は抗体 6 9 A 7 Y である。6 9 A 7 Y は抗体 6 9 A 7 と同じであるが、アミノ酸位置 1 0 0 での C (システイン) から Y (チロシン) への突然変異をもたらす、配列番号 5 の V_H アミノ酸配列内に保存的修飾を有する。6 9 A 7 Y の V_H アミノ酸配列は配列番号 7 3 として示される。C から Y への突然変異は、6 9 A 7 の V_H ヌクレオチド配列 (配列番号 5 3) のヌクレオチド位置 3 2 3 での G から A への単一の塩基対置換から生じる。6 9 A 7 Y の V_H ヌクレオチド配列は配列番号 7 4 として示される。6 9 A 7 Y は、配列番号 7 5 として示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を有する。

【 0 0 3 3 】

本開示の抗体は、例えば I g G 1 または I g G 4 アイソタイプの例えば完全長抗体でありうる。あるいは、抗体は、抗体断片、例えば F a b、F a b' または F a b' 2 断片、または一本鎖抗体でありうる。

【 0 0 3 4 】

本開示は、治療物質、例えば細胞毒素または放射性同位体に連結された本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体も提供する。特に好ましい実施形態では、本発明は、細胞毒素 (例えば、本明細書または 2 0 0 6 年 1 2 月 2 8 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 8 8 2 , 4 6 1 号明細書または 2 0 0 7 年 1 1 月 3 0 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 9 9 1 , 3 0 0 号明細書 (それら全体が参照により本明細書中に援用される) に記載の細胞毒素) に (例えばチオール結合により) 結合された本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体を提供する。特定の実施形態では、免疫複合体の細胞毒素およびリンカーは N 1 または N 2 の構造を有する。

【 0 0 3 5 】

例えば、様々な実施形態では、本発明は、

(i)

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(e) 配列番号 5 または 7 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および

10

20

30

40

50

(f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含み、細胞毒素に結合される、抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体、

(i i)

(a) 配列番号 1 3 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 1 9 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 2 5 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 1 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 3 7 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 3 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

10

を含む抗体またはその抗原結合部分、または

(a) 配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 2 0 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 2 6 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 2 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 3 8 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 4 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

を含む抗体またはその抗原結合部分、または

(a) 配列番号 1 5 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 2 1 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 2 7 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 3 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 3 9 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 5 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

20

を含む抗体またはその抗原結合部分、または

(a) 配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 2 2 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 2 8 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 4 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 4 0 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 6 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

30

を含む抗体またはその抗原結合部分、または

(a) 配列番号 1 7 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 2 3 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 2 9 または 7 5 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 4 1 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 7 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

を含む抗体またはその抗原結合部分、または

(a) 配列番号 1 8 を含む重鎖可変領域 C D R 1、

(b) 配列番号 2 4 を含む重鎖可変領域 C D R 2、

(c) 配列番号 3 0 を含む重鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号 3 6 を含む軽鎖可変領域 C D R 1、

(e) 配列番号 4 2 を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および

(f) 配列番号 4 8 を含む軽鎖可変領域 C D R 3

40

を含み、細胞毒素に連結される、抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体、ならびに

(i i i)

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

50

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(e) 配列番号 5 または 7 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および

(f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含み、細胞毒素に結合される、抗体により認識される（例えばヒト CD70 への結合に対してその抗体と交差競合する）場合と同じエピトープに結合する抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体

といった好ましい免疫複合体を提供する。

【0036】

本開示は、抗体またはその抗原結合部分とは異なる結合特異性を有する第 2 の機能部分に連結された本開示の抗体またはその抗原結合部分を含む二重特異性分子も提供する。

【0037】

本開示の抗体またはその抗原結合部分あるいは免疫複合体または二重特異性分子と薬学的に許容できる担体とを含む組成物も提供される。

【0038】

本開示の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸分子、ならびにかかる核酸を含む発現ベクターおよびかかる発現ベクターを含む宿主細胞も本開示によって包含される。かかる発現ベクターを含む宿主細胞を用いて抗 CD70 抗体を調製するための方法も提供され、それは (i) 宿主細胞内で抗体を発現する工程と、(ii) 宿主細胞から抗体を単離する工程とを含みうる。

【0039】

さらに別の態様では、本発明は抗 CD70 抗体を調製するための方法に関する。本方法は、

(a) (i) 配列番号 13 ~ 18 からなる群より選択される CDR1 配列、配列番号 19 ~ 24 からなる群より選択される CDR2 配列、および / または配列番号 25 ~ 30 および 75 からなる群より選択される CDR3 配列を含む重鎖可変領域抗体配列；および / または (ii) 配列番号 31 ~ 36 からなる群より選択される CDR1 配列、配列番号 37 ~ 42 からなる群より選択される CDR2 配列、および / または配列番号 43 ~ 48 からなる群より選択される CDR3 配列を含む軽鎖可変領域抗体配列を提供する工程と、

(b) 重鎖可変領域抗体配列内および / または軽鎖可変領域抗体配列内の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を改変し、少なくとも 1 つの改変抗体配列を作製する工程と、

(c) タンパク質として改変抗体配列を発現させる工程と、を含む。

【0040】

本開示は、CD70 に高親和性で特異的に結合する単離された抗 CD70 抗体 - パートナー分子複合体、特にヒトモノクローナル抗体を含むものも提供する。特定のかかる抗体 - パートナー分子複合体は、CD70 発現細胞内に内在化される能力があり、かつ抗体依存性細胞障害作用を媒介する能力がある。本開示は、本明細書中に開示される抗 CD70 抗体 - パートナー分子複合体を用い、癌、例えば腎細胞癌またはリンパ腫を治療するための方法も提供する。

【0041】

本開示のパートナー分子に複合される抗体またはその抗原結合部分を含有する組成物も提供される。本明細書中に開示される抗体パートナー分子複合体中での抗体に有利に複合されうるパートナー分子として、限定はされないが、薬剤としての分子、毒素、マーカー

10

20

30

40

50

分子（例えば放射性同位体）、タンパク質および治療剤が挙げられる。抗体 - パートナー分子複合体および薬学的に許容できる担体を含む組成物も本明細書中に開示される。

【0042】

一態様では、かかる抗体 - パートナー分子複合体は化学リンカーを介して複合される。一部の実施形態では、リンカーはペプチジルリンカーであり、本明細書中で (L4) p - F - (L1) m として示される。他のリンカーはヒドラジンおよびジスルフィドリンカーを含み、それぞれ本明細書中で (L4) p - H - (L1) m または (L4) p - J - (L1) m として示される。パートナーに結合されているようなリンカーに加え、本発明は、本質的に任意の分子種への結合に適する切断可能なリンカーアームも提供する。

【0043】

別の態様では、本発明は CD70 発現腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関する。本方法は、CD70 発現腫瘍細胞を本開示の抗体 - パートナー分子複合体に CD70 - 腫瘍細胞の成長が阻害されるように接触させる工程を含む。好ましい実施形態では、パートナー分子は治療剤、例えば細胞毒素である。特に好ましい CD70 発現腫瘍細胞は腎癌細胞およびリンパ腫細胞である。

【0044】

別の態様では、本発明は、対象における癌を治療する方法に関する。本方法は、対象に本開示の抗体 - パートナー分子複合体を癌が対象において治療されるように投与する工程を含む。好ましい実施形態では、パートナー分子は治療剤、例えば細胞毒素である。治療にとって特に好ましい癌は腎癌およびリンパ腫である。

【0045】

別の態様では、本発明は、対象における自己免疫疾患、炎症、またはウイルス感染を治療する方法に関する。本方法は、対象に本開示の抗体 - パートナー分子複合体を、自己免疫疾患が対象において治療されるように投与する工程を含む。

【0046】

本開示の他の特徴および利点は以下の詳細な説明および実施例から明白となり、それらは限定するものとして解釈されるべきではない。本願の全体を通じて言及されるあらゆる参考文献の内容、GenBank 登録番号、特許および公開された特許出願は、参照により本明細書中に明示的に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1A】2H5 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号49）およびアミノ酸配列（配列番号1）を示す。CDR1（配列番号13）、CDR2（配列番号19）およびCDR3（配列番号25）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が示される。

【図1B】2H5 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号55）およびアミノ酸配列（配列番号7）を示す。CDR1（配列番号31）、CDR2（配列番号37）およびCDR3（配列番号43）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が示される。

【図2A】10B4 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号50）およびアミノ酸配列（配列番号2）を示す。CDR1（配列番号14）、CDR2（配列番号20）およびCDR3（配列番号26）領域が図示され、かつV、D、およびJ生殖細胞系誘導体が示される。

【図2B】10B4 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号56）およびアミノ酸配列（配列番号8）を示す。CDR1（配列番号32）、CDR2（配列番号38）およびCDR3（配列番号44）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が示される。

【図3A】8B5 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号51）およびアミノ酸配列（配列番号3）を示す。CDR1（配列番号15）、CDR2（配列番号21）およびCDR3（配列番号27）領域が図示され、かつV、DおよびJ

10

20

30

40

50

生殖細胞系誘導体が示される。

【図 3 B】8 B 5 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 57）およびアミノ酸配列（配列番号 9）を示す。CDR 1（配列番号 33）、CDR 2（配列番号 39）および CDR 3（配列番号 45）領域が図示され、かつ V および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 4 A】18 E 7 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 52）およびアミノ酸配列（配列番号 4）を示す。CDR 1（配列番号 16）、CDR 2（配列番号 22）および CDR 3（配列番号 28）領域が図示され、かつ V、D および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 4 B】18 E 7 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 58）およびアミノ酸配列（配列番号 10）を示す。CDR 1（配列番号 34）、CDR 2（配列番号 40）および CDR 3（配列番号 46）領域が図示され、かつ V および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 5 A】69 A 7 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 53）およびアミノ酸配列（配列番号 5）を示す。CDR 1（配列番号 17）、CDR 2（配列番号 23）および CDR 3（配列番号 29）領域が図示され、かつ V、D および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 5 B】69 A 7 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 59）およびアミノ酸配列（配列番号 11）を示す。CDR 1（配列番号 35）、CDR 2（配列番号 41）および CDR 3（配列番号 47）領域が図示され、かつ V および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 6 A】1 F 4 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 54）およびアミノ酸配列（配列番号 6）を示す。CDR 1（配列番号 18）、CDR 2（配列番号 24）および CDR 3（配列番号 30）領域が図示され、かつ V、D および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 6 B】1 F 4 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 60）およびアミノ酸配列（配列番号 12）を示す。CDR 1（配列番号 36）、CDR 2（配列番号 42）および CDR 3（配列番号 48）領域が図示され、かつ V および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 7】2 H 5 および 10 B 4 の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_H 3 - 30 . 3 のアミノ酸配列（配列番号 61）とのアラインメントを示す。

【図 8】8 B 5 および 18 E 7 の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_H 3 - 33 のアミノ酸配列（配列番号 62）とのアラインメントを示す。

【図 9】69 A 7 の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_H 4 - 61 のアミノ酸配列（配列番号 63）とのアラインメントを示す。

【図 10】1 F 4 の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_H 3 - 23 のアミノ酸配列（配列番号 64）とのアラインメントを示す。

【図 11】2 H 5 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_K L 6 のアミノ酸配列（配列番号 65）とのアラインメントを示す。

【図 12】10 B 4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_K L 18 のアミノ酸配列（配列番号 66）とのアラインメントを示す。

【図 13】8 B 5 および 18 E 7 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_K L 15 のアミノ酸配列（配列番号 67）とのアラインメントを示す。

【図 14】69 A 7 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_K L 6 のアミノ酸配列（配列番号 65）とのアラインメントを示す。

【図 15】1 F 4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系 V_K A 27 のアミノ酸配列（配列番号 68）とのアラインメントを示す。

【図 16】ヒト CD 70 に対するヒトモノクローナル抗体が CD 70 に特異的に結合することを示す E L I S A 実験の結果を示す。

【図 17】抗 CD 70 ヒトモノクローナル抗体 2 H 5 が腎癌細胞系に結合することを示す

10

20

30

40

50

フローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図18A】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体が濃度依存的に腎細胞癌(RCC)細胞系の786-O RCC細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図18B】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体が濃度依存的に腎細胞癌(RCC)細胞系のA498 RCC細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図18C】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体が腎癌細胞系786-Oに結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図18D】ヒトCD70に対するHuMAb 69A7抗体が濃度依存的に腎細胞癌(RCC)細胞系786-Oに結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図19】抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5がヒトリンパ腫細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図20A】抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5が濃度依存的にヒトリンパ腫細胞系のRajiリンパ腫細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図20B】抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5が濃度依存的にヒトリンパ腫細胞系のGrant-519リンパ腫細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図20C】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体がRajiリンパ腫細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図20D】HuMAb 2H5および69A7が類似の結合エピトープを共有することを示す競合フローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図20E】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体がDaudiリンパ腫細胞系および786-O腎癌細胞系に結合することを示すフローサイトメトリー実験の結果を示す。

【図21】ヒトCD70に対するヒトモノクローナル抗体がCD70+細胞に内在化されることを示すHum-Zap内在化実験の結果を示す。

【図22A】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体が腎細胞癌(RCC)細胞系のCaki-2 RCCを死滅させることを示す細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図22B】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体が腎細胞癌(RCC)細胞系の786-O RCCを死滅させることを示す細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図22C】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体が腎細胞癌(RCC)細胞系のACHN RCCを死滅させることを示す細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図23A】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的に白血病・リンパ腫細胞系のARH-77白血病細胞系を死滅させることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図23B】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的に白血病・リンパ腫細胞系のHuT 78リンパ腫細胞系を死滅させることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図23C】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的に白血病・リンパ腫細胞系のRajiリンパ腫細胞系を死滅させることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図23D】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的に白血病・リンパ腫細胞系の、CD70を発現しないL-540細胞系を死滅させることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図24】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体がヒトリンパ腫細胞系を死滅させることを示す細胞増殖アッセイの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図25A】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体がRaji細胞に対する細胞毒性を示すことを示す、3時間の洗浄を伴う細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図25B】細胞毒素に複合されたヒトモノクローナル抗CD70抗体がRaji細胞に対する細胞毒性を示すことを示す、連続洗浄を伴う細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図26A】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボで腎細胞癌(RCC)腫瘍のA-498 RCC腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図26B】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボで腎細胞癌(RCC)腫瘍のACHN RCC腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図27A】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞のARH-77細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図27B】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞のMEC-1細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図27C】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞の抗CD16抗体で治療されたMEC-1細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図27D】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞のSU-DHL-6細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図27E】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞のIM-9細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図27F】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC依存的にヒト白血病細胞のHUT78細胞に対する細胞毒性を増大させていることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図28】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC濃度依存的にヒト白血病細胞を死滅させることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図29】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がADCC濃度依存的にヒト白血病細胞を死滅させるが、細胞毒性がCD16に依存することを示す抗体依存性細胞障害作用(ADCC)アッセイの結果を示す。

【図30】ヒトモノクローナル抗CD70抗体がヒト活性化T細胞を死滅させかつ効果が抗CD16抗体の添加で反転されることを示すADCCアッセイの結果を示す。

【図31】一部のヒトモノクローナル抗CD70抗体がCD70のCD27への結合を遮断し、それら以外のヒトモノクローナル抗CD70抗体がCD70のCD27への結合を遮断しないことを示す遮断アッセイの結果を示す。

【図32A】裸抗CD70抗体2H5による治療がインビボでリンパ腫Raji腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図32B】裸抗CD70抗体2H5による治療がインビボでリンパ腫ARH-77腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図33A】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボでリンパ腫ARH-77腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図33B】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボでリンパ腫Grant519腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図33C】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボでリンパ腫Raji腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図34】抗CD70抗体69A7がアカゲザルCD70+Bリンパ腫細胞系上に発現されるCD70と交差反応することを示す試験の結果を示す。

【図35】ヒト抗CD70抗体が既知のマウス抗ヒトCD70抗体の結合を遮断することを示す遮断アッセイの結果を示す。

【図36A】抗CD70抗体または非フコシル化形態の抗体のいずれかによる治療の結果を示す。抗CD70抗体は、CD70で共刺激された細胞増殖を用量依存的に阻害する。

【図36B】抗CD70抗体または非フコシル化形態の抗体のいずれかによる治療の結果を示す。抗CD70抗体は、CD70で共刺激されたIFN- γ の分泌を用量依存的に阻害する。

【図37A】ペプチド刺激細胞に対する抗CD70抗体または非フコシル化形態の抗体のいずれかによる治療の結果を示す。抗CD70抗体はペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖を阻害する。

【図37B】ペプチド刺激細胞に対する抗CD70抗体または非フコシル化形態の抗体のいずれかによる治療の結果を示す。全細胞生存度に有意な低下は全く認められなかった。

【図37C】ペプチド刺激細胞に対する抗CD70抗体または非フコシル化形態の抗体のいずれかによる治療の結果を示す。CD8+細胞の総数に有意な減少は全く認められなかった。

【図38】ペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖に対する抗CD70抗体の効果が抗CD16抗体の添加により遮断されることを示す。

【図39A】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボで腎癌腫瘍の786-O腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図39B】細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5による治療がインビボで腎癌腫瘍のCaki-1腫瘍に対して直接の阻害効果を有することを示すインビボでのマウス腫瘍モデル試験の結果を示す。

【図40】786-O腎細胞癌異種移植片NOD-SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する免疫複合体の抗CD70-N1および抗CD70-N2のインビボでの有効性を示す。

【図41】786-O腎細胞癌異種移植片SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の免疫複合体抗CD70-N2のインビボでの有効性を示す。

【図42】786-O腎細胞癌異種移植片SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する様々な用量の免疫複合体抗CD70-N2のインビボでの有効性を示す。

【図43】Caki-1腎細胞癌異種移植片SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する様々な用量の免疫複合体抗CD70-N2のインビボでの有効性を示す。

【図44】Raji細胞リンパ腫SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する免疫複合体抗CD70-N2のインビボでの有効性を示す。

【図45】BALB/cマウスにおける免疫複合体抗CD70-N2のインビボでの安全性を示す。

【図46A】イヌにおける免疫複合体抗CD70-N2の薬剤なしに対するインビボでの安全性を示す。

【図46B】イヌにおける免疫複合体抗CD70-N2の薬剤なしに対するインビボでの安全性を示す。

【図46C】イヌにおける免疫複合体抗CD70-N2の薬剤なしに対するインビボでの安全性を示す。

【図46D】イヌにおける免疫複合体抗CD70-N2の薬剤なしに対するインビボでの安全性を示す。

【図47A】ADCCアッセイの結果を示す。hIgG1nf Neg Ctrl = ヒト

10

20

30

40

50

I g G 1 N F 陰性対照抗体。h I g G 1 N e g C t r l = ヒト I g G 1 陰性対照抗体。m I g G 1 N e g C t r l = マウス I g G 1 陰性対照抗体。2 H 5 の活性化 B 細胞への結合についての F A C S 分析。

【図 4 7 B】A D C C アッセイの結果を示す。h I g G 1 n f N e g C t r l = ヒト I g G 1 N F 陰性対照抗体。h I g G 1 N e g C t r l = ヒト I g G 1 陰性対照抗体。m I g G 1 N e g C t r l = マウス I g G 1 陰性対照抗体。活性化ヒト B 細胞に対する 2 H 5 N F および 2 H 5 についての A D C C アッセイ。

【図 4 7 C】A D C C アッセイの結果を示す。h I g G 1 n f N e g C t r l = ヒト I g G 1 N F 陰性対照抗体。h I g G 1 N e g C t r l = ヒト I g G 1 陰性対照抗体。m I g G 1 N e g C t r l = マウス I g G 1 陰性対照抗体。抗 C D 1 6 抗体の添加を伴う A D C C アッセイ。

【図 4 8】抗 C D 7 0 抗体の、刺激されたヒト P B M C 培養物中に自然に存在するエフェクター細胞による、A D C C を介した抗原活性化 C D 7 0 + ヒト T 細胞の溶解に対する媒介能を示す。

【図 4 9】抗 C D 7 0 抗体の天然に発現する C D 7 0 + ヒト癌細胞系 7 8 6 - O 細胞に対する結合特性を示す。

【図 5 0】フコシル化および非フコシル化抗 C D 7 0 抗体の、C D 7 0 + リンパ腫細胞系 A R H 7 7 に対する A D C C に対する媒介能を示す。

【図 5 1】7 8 6 - O 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 2】A 4 9 8 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 3】C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 4】R a j i 細胞リンパ腫 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 5】D a u d i 細胞リンパ腫 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 6】C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片ラットモデルにおける腫瘍形成に対する抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの有効性を示す。

【図 5 7】B A L B / c マウスにおける抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの安全性を示す。

【図 5 8】イヌにおける抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの安全性を示す。

【図 5 9】サルにおける抗 C D 7 0 - サイトトキシン E のインビボでの安全性を示す。

【図 6 0】7 8 6 - O 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン F のインビボでの有効性を示す。

【図 6 1】C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン F のインビボでの有効性を示す。

【図 6 2】R a j i 細胞リンパ腫 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン F のインビボでの有効性を示す。

【図 6 3】7 8 6 - O 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン G のインビボでの有効性を示す。

【図 6 4】C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン G のインビボでの有効性を示す。

【図 6 5】A 4 9 8 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン H のインビボでの有効性を示す。

【図 6 6】C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン H のインビボでの有効性を示す。

【図 6 7】7 8 6 - O 腎細胞癌異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗 C D 7 0 - サイトトキシン I のインビボでの有効性を示す。

10

20

30

40

50

【図68】Caki-1腎細胞癌異種移植片ラットモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗CD70-サイトトキシンIのインビボでの有効性を示す。

【図69】786-O腎細胞癌異種移植片SCIDマウスモデルにおける腫瘍形成に対する単回用量の抗CD70-サイトトキシンJのインビボでの有効性を示す。

【図70】抗CD70抗体2H5のCD70で刺激されたヒトT細胞の増殖の機能的遮断を示す。

【図71】サイトトキシンBの構造である。

【図72】サイトトキシンCの構造である。

【図73】サイトトキシンDの構造である。

【図74】サイトトキシンEの構造である。

【図75】サイトトキシンFの構造である。

【図76】サイトトキシンGの構造である。

【図77】サイトトキシンHの構造である。

【図78】サイトトキシンIの構造である。

【図79】サイトトキシンJの構造である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

詳細な説明

本開示は、ヒトCD70に結合しかつ望ましい機能特性を有する単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体に関する。特定の実施形態では、本開示の抗体は、特定の重鎖および軽鎖生殖細胞系配列に由来し、および/または特定のアミノ酸配列を含むCDR領域などの特定の構造的特徴を含む。本開示は、単離された抗体や、かかる抗体、抗体-パートナー分子複合体、およびかかる抗体を含む二重特異性分子を作製する方法、ならびに本開示の抗体、抗体-パートナー分子複合体または二重特異性分子を含有する医薬組成物を提供する。本開示はまた、抗体を用いて例えばCD70タンパク質を検出する方法、ならびに本発明の抗CD70抗体を用いてCD70発現細胞、例えば腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関する。したがって、本開示はまた、本開示の抗CD70抗体および抗体-パートナー分子複合体を用いて様々なタイプの癌、例えば腎細胞癌またはリンパ腫を治療する方法を提供する。

【0049】

本開示がより十分に理解されうるように、最初に特定の用語が定義される。詳細な説明を通じてさらなる定義が示される。

【0050】

本明細書で用いられる「CD70」という用語は、変異体、アイソフォーム、相同体、オルソログおよびパラログを含む。例えば、ヒトCD70タンパク質に特異的な抗体は、特定の場合、ヒト以外の種由来のCD70タンパク質と交差反応しうる。他の実施形態では、ヒトCD70タンパク質に特異的な抗体は、ヒトCD70タンパク質に対して完全に特異的でありかつ種または他のタイプの交差反応性を示さないか、または特定の他の種由来であってそれ以外のあらゆる種に由来しないCD70と交差反応する(例えばマウスCD70ではなく霊長類CD70と交差反応する)場合がある。「ヒトCD70」という用語は、ヒトCD70配列、例えばGenbank登録番号P32970(配列番号76)を有するヒトCD70の完全なアミノ酸配列を示す。「マウスCD70」という用語は、マウスCD70配列、例えばGenbank登録番号NP_035747を有するマウスCD70の完全なアミノ酸配列を示す。ヒトCD70配列は例えば保存された変異または非保存領域内の変異を有することによりGenbank登録番号P32970のヒトCD70と異なる場合があり、CD70はGenbank登録番号P32970のヒトCD70と実質的に同じ生物学的機能を有する。例えば、ヒトCD70の1つの生物学的機能はサイトカイン受容体CD27に結合することである。

【0051】

特定のヒトCD70配列は、一般にアミノ酸配列がGenbank登録番号P3297

10

20

30

40

50

0 のヒト CD70 に対して少なくとも 90% 同一となり、アミノ酸配列が他の種（例えばマウス）の CD70 アミノ酸配列と比較される場合にヒトであることが同定されたアミノ酸残基を有する。特定の場合、ヒト CD70 は、アミノ酸配列が Genbank 登録番号 P32970 の CD70 に対して少なくとも 95%、またはさらに少なくとも 96%、97%、98%、もしくは 99% 同一でありうる。特定の実施形態では、ヒト CD70 配列は、Genbank 登録番号 P32970 の CD70 配列とは 10 個以下のアミノ酸の差を示すことになる。特定の実施形態では、ヒト CD70 は、Genbank 登録番号 P32970 の CD70 配列とは 5 個以下、またはさらに 4 個以下、3、2、もしくは 1 個のアミノ酸の差を示しうる。同一性パーセントは、本明細書中に記載のように決定されうる。

10

【0052】

「免疫応答」という用語は、侵入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合での正常なヒト細胞もしくは組織に対する選択的損傷、それらの破壊または人体からの除去をもたらす、例えば、（抗体、サイトカイン、および補体を含む）上記の細胞または肝臓によって生成されるリンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および可溶性高分子の作用を示す。

【0053】

「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達を担う種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を示す。本明細書で用いられる「細胞表面受容体」という語句は、例えばシグナルの受け取りおよび細胞の原形質膜を通過するかかるシグナルの伝達が可能な分子および分子の複合体を含む。本発明の「細胞表面受容体」の例として、CD70 受容体が挙げられる。

20

【0054】

本明細書で記載の「抗体」という用語は、全抗体および任意の抗原結合断片（すなわち「抗原結合部分」）またはその一本鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも 2 つの重（H）鎖および 2 つの軽（L）鎖またはその抗原結合部分を含む糖タンパク質を示す。各重鎖は重鎖可変領域（本明細書中で V_H と略記）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} という 3 つのドメインからなる。各軽鎖は軽鎖可変領域（本明細書中で V_L または V_K と略記）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は C_L という 1 つのドメインからなる。 V_H および V_L 領域は、相補性決定領域（CDR）と称される超可変領域にさらに再分化され、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存される領域が組み入れられうる。各 V_H および V_L は 3 つの CDR および 4 つの FR からなり、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ配列される。重鎖および軽鎖の可変領域は抗原と相互作用する結合ドメインを有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織または免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第 1 の成分（C1q）を含む因子への結合を媒介しうる。

30

【0055】

本明細書で用いられる抗体の「抗体断片」および「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」という用語は、抗原（例えば CD70）に特異的に結合する能力を保持する抗体の 1 つ以上の断片を示す。抗体の抗原結合機能が完全長抗体の断片により果たされることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含される結合断片の例として、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる一価断片である Fab 断片；(ii) ヒンジ領域でのジスルフィド架橋により連結された 2 つの Fab 断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片；(iii) 本質的にヒンジ領域の一部を有する Fab である Fab' 断片（「FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY」（Paul 編、第 3 版、1993 年）を参照）；(iv) V_H および C_{H1} ドメインからなる Fd 断片；(v) 抗体の単一の腕の V_L および V_H ドメインからなる Fv 断片、(vi) V_H ドメインからなる dAb 断片（Wardら、(1989年) Nature 341: 544-546 頁）；(vii) 単離された相補性決定領域（CDR）；ならびに (viii)

40

50

）1つの可変ドメインおよび2つの定常ドメインを有する重鎖可変領域であるナノボディ (nanobody) が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインのV_LおよびV_Hが別々の遺伝子でコードされるが、V_LおよびV_H領域が、それらの一価分子を形成するように対をなす場合の単一のタンパク質鎖としての作製を可能にする合成リンカーによる組換え方法を用いて連結されうる (一本鎖Fv (scFv) として知られる; 例えばBirdら (1988年) Science 242: 423-426頁、およびHustonら (1988年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883頁を参照)。かかる一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含されるようにも意図されている。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来技術を用いて得られ、断片における有用性が無傷抗体の場合と同様の方法でスクリーニングされる。

10

【0056】

本明細書で用いられる「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を示すように意図されている (例えば、CD70に対して特異的に結合する単離された抗体は、CD70以外の抗原に対して特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかし、CD70に対して特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原、例えば他の種由来のCD70分子に対する交差反応性を有しうる。特定の実施形態では、単離された抗体はヒトCD70に対して特異的に結合し、他の非ヒトCD抗原と交差反応しない。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まない場合がある。

20

【0057】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を示す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【0058】

本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、フレームワークおよびCDR領域の双方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する場合の可変領域を有する抗体を含むように意図されている。さらに、抗体が定常領域を有する場合、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、天然修飾または合成修飾を含む後の修飾を含みうる。本開示のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされることのないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的な突然変異誘発またはインビボでの体細胞突然変異により導入される突然変異) を含む。しかし、本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳類種、例えばマウスの生殖細胞系に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている場合の抗体を含むように意図されていない。

30

【0059】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワークおよびCDR領域の双方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する場合の可変領域を有する単一の結合特異性を提示する抗体を示す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマにより産生される。

40

【0060】

本明細書で用いられる「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段により調製、発現、作製または単離されるすべてのヒト抗体、例えば (a) ヒト免疫グロブリン遺伝子におけるトランスジェニックまたはトランスクロモソーム (transchromosomal) である動物 (例えばマウス) あるいはそれから調製されるハイブリドーマから単離される抗体 (さらに下記に記載)、(b) 形質転換されることでヒト抗体を発現する宿主細胞、例えばトランスフェクターマ (Transfectoma) から単離される抗体、(c) 組換えられたコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離される抗体、および (d)

50

）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段により調製、発現、作製または単離される抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワークおよびCDR領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する場合の可変領域を有する。しかし、特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体に対し、インビトロでの突然変異誘発（または、ヒトIg配列に対してトランスジェニックな動物が用いられる場合、インビボでの体細胞突然変異誘発）を実施可能であり、それ故、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V_HおよびV_L配列に由来しかつそれらに関連する一方、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリーの範囲内に天然に存在することがない配列である。

【0061】

本明細書で用いられる「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス（例えばIgMまたはIgG1）を示す。

【0062】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という語句は、本明細書中で「抗原に対して特異的に結合する抗体」という用語と同義的に用いられる。

【0063】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、ヒト抗体の任意の修飾形態、例えば抗体と別の作用物質または抗体との複合体を示す。

【0064】

「ヒト化抗体」という用語は、別の哺乳類種、例えばマウスの生殖細胞系に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている場合の抗体を示すように意図されている。さらなるフレームワーク領域の修飾がヒトフレームワーク配列内でなされうる。

【0065】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が1種に由来しかつ定常領域配列が別種に由来する場合の抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来しかつ定常領域配列がヒト抗体に由来する場合の抗体を示すように意図されている。

【0066】

「抗体模倣体」は、抗体の抗原に対する結合能を模倣する能力があるが、天然の抗体構造に限定されない分子を示すように意図されている。かかる抗体模倣体の例として、限定はされないが、アフィボディ(Affibodies)、ダルピン(DARPins)、アンチカリン(Anticalins)、アビマー(Avimers)、およびバーサボディ(Versabodies)が挙げられ、これらのすべては従来式の抗体結合を模倣する間に異なる機序から生成されかつそれを介して機能する結合構造を用いる。

【0067】

本明細書で用いられる「パートナー分子」という用語は、抗体-パートナー分子複体内で抗体に複合された実体を示す。パートナー分子の例として、薬剤、毒素、(限定はされないが、ペプチドおよび蛍光色素マーカーなどの小分子マーカーと放射性同位体などの単一原子マーカーとを含む)マーカー分子、タンパク質ならびに治療剤が挙げられる。

【0068】

本明細書で用いられる「ヒトCD70に特異的に結合する」抗体は、ヒトCD70に 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、より好ましくは 6×10^{-9} M以下、より好ましくは 3×10^{-9} M以下、さらにより好ましくは 2×10^{-9} M以下のK_Dで結合する抗体を示すように意図されている。

【0069】

本明細書で用いられる「K_{assoc}」または「K_a」という用語は特定の抗体-抗原相互作用の結合速度を示すように意図されている一方、本明細書で用いられる「K_{diss}」または「K_d」という用語は特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を示すように意図されている。本明細書で用いられる「K_D」という用語は解離定数を示すように意図されており、それはK_d対K_aの比(すなわちK_d/K_a)から得られ、かつモル濃度(M)として表現されるものである。抗体におけるK_D値は、当該技術分野で十分に確立された方

10

20

30

40

50

法を用いて決定可能である。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴、好ましくはBiacore（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムの利用によるものである。

【0070】

本明細書で用いられる「IgG抗体への高親和性」という用語は、標的抗原に対して 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-9} M以下、およびさらにより好ましくは 1×10^{-10} M以下の K_D を有する抗体を示す。しかし、「高親和性」結合は他の抗体アイソタイプに対しては変化しうる。例えば、IgMアイソタイプへの「高親和性」結合は、 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、さらにより好ましくは 1×10^{-9} M以下の K_D を有する抗体を示す。

10

【0071】

本明細書で用いられるタンパク質または細胞に「実質的に結合しない」という用語は、タンパク質または細胞に結合しないかまたは高親和性で結合しない、すなわちタンパク質または細胞に 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上の K_D で結合することを意味する。

【0072】

本明細書で用いられる「対象」という用語は任意のヒトまたは非ヒト動物を示す。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば哺乳類および非哺乳類、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、魚、爬虫類などを含む。

20

【0073】

結合として用いられるかまたは結合に垂直に示される記号「-」は、示される部分が固体支持体などの分子の残りに結合される点を示す。

【0074】

「アルキル」という用語は、それ単独でまたは別の置換基の一部として、他に明記しない限り、直鎖または分岐鎖または環状の炭化水素基、またはそれらの組み合わせを意味し、それは完全に飽和、単不飽和もしくはポリ不飽和の場合があり、かつ規定数の炭素原子を有する（すなわち $C_1 \sim C_{10}$ は1～10個の炭素を意味する）二価および多価基を含みうる。飽和炭化水素基の例として、限定はされないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチルなどの基や、例えば*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなどの相同体および異性体が挙げられる。不飽和アルキル基は1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例として、限定はされないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2,4-ペンタジエニル、3-（1,4-ペンタジエニル）、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにより高級な相同体および異性体が挙げられる。「アルキル」という用語はまた、他に明記しない限り、下記により詳細に定義されるアルキルの誘導体、例えば「ヘテロアルキル」を含むように意図されている。炭化水素基に限定されたアルキル基は「ホモアルキル」と称される。

30

40

【0075】

単独でのまたは別の置換基の一部としての「アルキレン」という用語は、限定はされないが、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ として例示される、アルカンから誘導される二価基を意味し、下記に「ヘテロアルキレン」として記述される基をさらにも含む。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24個の炭素原子を有することになり、本発明では10個以下の炭素原子を有する基が好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、一般に8個以下の炭素原子を有する、鎖がより短いアルキルまたはアルキレン基である。

【0076】

単独でのまたは別の用語と組み合わせられた「ヘテロアルキル」という用語は、他に明

50

記しない限り、安定な直鎖または分岐鎖または環状の炭化水素基、またはそれらの組み合わせを意味し、規定数の炭素原子とO、N、S i、およびSからなる群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子からなり、ここで窒素、炭素および硫黄原子は場合により酸化され、窒素ヘテロ原子は場合により四級化されうる。ヘテロ原子O、N、S、およびS iは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置または分子の残りに結合されたアルキル基の位置に配置されうる。例として、限定はされないが、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-O-CH_3$ 、および $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ が挙げられる。最大で2つのヘテロ原子、例えば $-CH_2-NH-OCH_3$ および $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ などが連続しうる。同様に、単独でのまたは別の置換基の一部としての「ヘテロアルキレン」という用語は、限定はされないが $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ および $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ として例示される、ヘテロアルキルから誘導される二価基を意味する。ヘテロアルキレン基においては、ヘテロ原子はまた鎖末端の一方または両方を占有しうる（例えばアルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。「ヘテロアルキル」および「ヘテロアルキレン」という用語は、ポリ（エチレングリコール）およびその誘導体を包含する（例えば、*Shearwater Polymers Catalog*、2001年を参照）。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基においては、連結基の方向は連結基の式が記された方向を全く意味していない。例えば、式 $-C(O)_2R'$ は $-C(O)_2R'$ および $-R'C(O)_2$ の双方を表す。

【0077】

「アルキル」または「ヘテロアルキル」という用語と併用される「低級」という用語は、1～6個の炭素原子を有する部分を示す。

【0078】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、「アルキルスルホニル」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）という用語は、それらの従来の意味で用いられ、それぞれ酸素原子、アミノ基、 SO_2 基または硫黄原子を介して分子の残りに結合されたアルキル基を示す。「アリールスルホニル」という用語は SO_2 基を介して分子の残りに結合されたアリール基を示し、「スルフヒドリル」という用語はSH基を示す。

【0079】

一般に「アシル置換基」もまた上記の基から選択される。本明細書で用いられる「アシル置換基」という用語は、本発明の化合物の多環核に結合された基を示し、それに直接的または間接的に結合されたカルボニル炭素の原子価を満たしている。

【0080】

単独でのまたは別の用語と組み合わせられた「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」という用語は、他に明記しない限り、それぞれ置換もしくは未置換「アルキル」および置換もしくは未置換「ヘテロアルキル」の環状バージョンを示す。さらに、ヘテロシクロアルキルにおいては、ヘテロ原子が分子の残りに結合された複素環の位置を占有しうる。シクロアルキルの例として、限定はされないが、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例として、限定はされないが、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられる。環状構造のヘテロ原子および炭素原子は場合により酸化される。

【0081】

単独でのまたは別の置換基の一部としての「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、

他に明記しない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むように意図されている。例えば、「ハロ(C₁~C₄)アルキル」という用語は、限定はされないが、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-プロモプロピルなどを含むように意図されている。

【0082】

「アリール」という用語は、他に明記しない限り、置換もしくは未置換のポリ不飽和の芳香族炭化水素置換基を意味し、これは共に縮合されるかまたは共有結合される単一環または複数環（好ましくは1~3つの環）でありうる。「ヘテロアリール」という用語は、N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有するアリール基（または環）を示し、ここで窒素、炭素および硫黄原子は場合により酸化され、かつ窒素原子は場合により四級化される。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残りに結合されうる。アリールおよびヘテロアリール基の非限定例として、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ピフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリーニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが挙げられる。上記のアリールおよびヘテロアリール環系の各々における置換基は、下記の許容できる置換基の群から選択される。「アリール」および「ヘテロアリール」は、縮合されるかまたはそれ以外ではアリールまたはヘテロアリール系に結合された1つ以上の非芳香環系といった環系も包含する。

【0083】

簡略化のため、「アリール」という用語は、他の用語（例えばアリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）と併用される場合、上で定義されたアリールおよびヘテロアリール環の双方を含む。したがって、「アリールアルキル」という用語は、炭素原子（例えばメチレン基）が例えば酸素原子（例えばフェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなど）で置換されているアルキル基を含むアルキル基（例えばベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）に結合されたアリール基といった基を含むように意図されている。

【0084】

上記の各用語（例えば「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）は、指定される基の置換および未置換形態の双方を含む。基の各タイプにおける好ましい置換基は下記に提供される。

【0085】

アルキルにおける置換基およびヘテロアルキル基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルとも称されることが多い基を含む）はそれぞれ一般に「アルキル置換基」および「ヘテロアルキル置換基」と称され、限定はされないが、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、NRSO₂R'、-CNおよび-NO₂から、0~(2m'+1)（式中、m'はかかる基内の炭素原子の総数である）の範囲の数で選択される種々の基のうちの1つ以上でありうる。R'、R''、R'''およびR''''

10

20

30

40

50

'の各々は、好ましくは独立して、水素、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、例えば1~3個のハロゲンで置換されたアリール、置換もしくは未置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を示す。本発明の化合物が例えば2つ以上のR基を含む場合、R基の各々はR'、R''、R'''およびR''''基の各々としてこれらの基の2つ以上が存在する場合に独立して選択される。R'およびR''が同じ窒素原子に結合される場合、それらは窒素原子と結合し、5、6、もしくは7員環が形成されうる。例えば、-NR'R''は、限定はされないが、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含むように意図されている。置換基についての上の考察から、当業者は、「アルキル」という用語が水素基以外の基に結合された炭素原子を含む基、例えばハロアルキル(例えば-CF₃および-CH₂CF₃)およびアシル(例えば-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃など)を含むように意図されることを理解するであろう。

10

【0086】

アルキル基について記述される置換基と同様、アリール置換基およびヘテロアリール置換基はそれぞれ、一般に「アリール置換基」および「ヘテロアリール置換基」と称され、例えば、ハロゲン、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R''''、OC(O)R'、-C(O)R'、CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、NR'、-C(O)NR''R''''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R'')

=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、NRSO₂R'、-CNおよび-NO₂、-R'、N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁~C₄)アルコキシ、ならびにフルオロ(C₁~C₄)アルキルから、0から芳香環系上の開放原子価(open valence)の総数の範囲の数で選択され、ここでR'、R''、R''''およびR''''''は、好ましくは水素、(C₁~C₈)アルキルおよびヘテロアルキル、未置換アリールおよびヘテロアリール、(未置換アリール)-(C₁~C₄)アルキル、ならびに(未置換アリール)オキシ-(C₁~C₄)アルキルから独立して選択される。本発明の化合物が例えば2つ以上のR基を含む場合、各R基はR'、R''、R''''およびR''''''基の各々としてこれらの基の2つ以上が存在する場合に独立して選択される。

20

【0087】

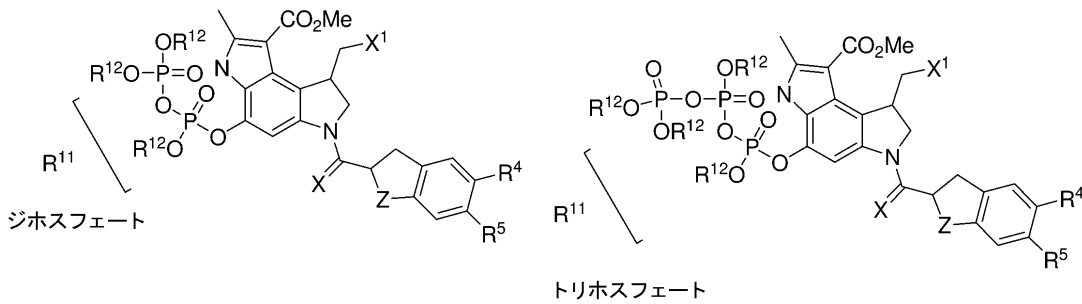
アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上のアリール置換基のうち2つが、場合により、式-T-C(O)-(CRR')_q-U-(式中、TおよびUは独立に-NR'-、-O'-、-CRR'-または単結合であり、かつqは0~3の整数である)の置換基と置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうち2つが、場合により式-A(CH₂)_rB-(式中、AおよびBは独立して-CRR'-、-O'-、-NR'-、-S'-、-S(O)-、S(O)₂-、-S(O)₂NR'-または単結合であり、かつrは1~4の整数である)の置換基と置換されうる。そのように形成された新環の単結合のうち1つが、場合により二重結合と置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうち2つが、場合により式(CRR')_s-X-(CRR''R''''R''''''_d-(式中、sおよびdは独立して0~3の整数であり、かつXはO'-、-NR'-、-S'-、-S(O)-、-S(O)₂-、または-S(O)₂NR'-である)の置換基と置換されうる。置換基R、R'、R''およびR''''は、好ましくは水素または置換もしくは未置換(C₁~C₆)アルキルから独立して選択される。

30

40

【0088】

本明細書で用いられる「ジホスフェート」という用語は、限定はされないが、2つのリン酸基を有するリン酸のエステルを含む。「トリホスフェート」という用語は、限定はされないが、3つのリン酸基を有するリン酸のエステルを含む。例えば、ジホスフェートまたはトリホスフェートを有する特定の薬剤は、



を含む。

【0089】

本明細書で用いられる「ヘテロ原子」という用語は、酸素（O）、窒素（N）、硫黄（S）およびケイ素（Si）を含む。

【0090】

記号「R」は、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクリル基から選択される置換基を表す一般的略語である。

【0091】

本開示の様々な態様は、以下のサブセクションでさらに詳述される。

【0092】

特定の機能特性を有する抗CD70抗体

本開示の抗体は、抗体の特定の機能的特徴または特性により特徴づけられる。例えば、抗体は細胞の表面上に発現されるヒトCD70、例えばヒトCD70に特異的に結合する。好ましくは、本開示の抗体は、CD70に高親和性、例えば 1×10^{-7} M以下の K_D 、より好ましくは 5×10^{-8} M以下の K_D 、およびさらにより好ましくは 1×10^{-8} M以下の K_D で結合する。抗体のCD70に対する結合能を評価するための標準アッセイは当該技術分野で既知であり、例えばELISA、ウエスタンブロットおよびRIAを含む。適切なアッセイは実施例において詳述される。抗体の結合動態、（例えば結合親和性）はまた、当該技術分野で既知の標準アッセイ、例えばELISA、スキャッチャードおよびBiacore分析により評価可能である。別の例としては、本開示の抗体は、腎癌腫瘍細胞系、例えば786-O、A-498、ACHN、Caki-1またはCaki-2細胞系に結合しうる。さらに別の例としては、本開示の抗体は、B細胞腫瘍細胞系、例えばDaudi、HuT78、RajiまたはGranta-519細胞系に結合しうる。

【0093】

本開示の抗CD70抗体は、ヒトCD70に結合し、かつ好ましくは

(a) ヒトCD70に 1×10^{-7} M以下の K_D で結合する特性、および

(b) 腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する特性、

(c) リンパ腫細胞系、例えばB細胞腫瘍細胞系に結合する特性、

(d) CD70発現細胞により内在化される特性、

(e) CD70発現細胞に対して抗体依存性細胞障害作用（ADCC）を示す特性、および

(f) 細胞毒素に複合される場合、インビボでCD70発現細胞の成長を阻害する特性

、
のうちの1つ以上を示す。

【0094】

好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの少なくとも2つを示す。より好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの少なくとも3つを示す。より好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のうちの4つを示す。さらにより好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)のう

10

20

30

40

50

ちの5つを示す。さらにより好ましくは、抗体は特性(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f)の6つ全部を示す。

【0095】

別の好ましい実施形態では、抗体はCD70に 5×10^{-9} M以下の親和性で結合する。さらに別の好ましい実施形態では、抗体は、細胞毒素に複合される場合、インビボでCD70発現腫瘍細胞の成長を阻害する。

【0096】

本発明の抗体のCD70への結合は、当該技術分野で十分に確立された1つ以上の技術を用いて評価されうる。例えば、好ましい実施形態では、抗体はフローサイトメトリーアッセイにより試験可能であり、そこでは抗体はヒトCD70を発現する細胞系、例えばCD70を細胞表面上で発現するように形質移入されているCHO細胞あるいは786-O、A498、ACHN、Caki-1、および/またはCaki-2などのCD70発現細胞系と反応する(適切なアッセイおよび細胞系のさらなる説明については、例えば実施例4および5を参照)。さらにまたはその他として、結合動態(例えば K_D 値)を含む抗体の結合については、BIACORE結合アッセイで試験可能である。さらに他の適切な結合アッセイは、例えば組換えCD70タンパク質を用いるELISAアッセイを含む(適切なアッセイについては、例えば実施例1を参照)。

【0097】

好ましくは、本開示の抗体は、CD70タンパク質に 5×10^{-8} M以下の K_D で結合するか、CD70タンパク質に 3×10^{-8} M以下の K_D で結合するか、CD70タンパク質に 1×10^{-8} M以下の K_D で結合するか、CD70タンパク質に 7×10^{-9} M以下の K_D で結合するか、CD70タンパク質に 6×10^{-9} M以下の K_D で結合するか、またはCD70タンパク質に 5×10^{-9} M以下の K_D で結合する。CD70に対する抗体の結合親和性は、例えば標準BIACORE分析により評価可能である。

【0098】

CD70発現細胞により抗CD70抗体の内在化を評価するための標準アッセイは当該技術分野で既知である(例えば、実施例7および21に記載のHum-Zapおよび免疫蛍光アッセイを参照)。CD70のCD27への結合および抗CD70抗体によるその阻害を評価するための標準アッセイもまた当該技術分野で既知である(例えば、実施例17に記載のアッセイを参照)。CD70発現細胞に対するADCCを評価するための標準アッセイもまた当該技術分野で既知である(例えば、実施例9に記載のADCCアッセイを参照)。抗CD70抗体およびその細胞毒素複合体によるインビボでの腫瘍細胞成長の阻害を評価するための標準アッセイもまた当該技術分野で既知である(例えば、実施例18、19、24~31および36~41に記載の腫瘍異種移植片マウスモデルを参照)。

【0099】

本発明の好ましい抗体はヒトモノクローナル抗体である。さらにまたはその他として、抗体は例えばキメラまたはヒト化モノクローナル抗体でありうる。

【0100】

モノクローナル抗体2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4

例示される本開示の抗体は、実施例1および2に記載のように単離および構造的特徴づけがなされたヒトモノクローナル抗体2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4を含む。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_H アミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、2、3、4、5、73、および6で示される。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_L アミノ酸配列は、それぞれ配列番号7、8、9、10、11、11、および12で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号11の V_L アミノ酸配列を有する)。これらの各抗体がCD70に結合しうると仮定すると、 V_H および V_L 配列は「混合され、一致する」ことで本開示の他の抗CD70結合分子の作製が可能である。かかる「混合され、一致する」抗体のCD70への結合は、上記でかつ実施例に記載の

10

20

30

40

50

結合アッセイ（例えばFACSまたはELISA）を用いて試験されうる。好ましくは、 V_H および V_L 鎖が混合され、一致する場合、特定の V_H / V_L 対由来の V_H 配列は構造的に類似の V_H 配列と交換される。同様に、好ましくは特定の V_H / V_L 対由来の V_L 配列は構造的に類似の V_L 配列と交換される。

【0101】

したがって、一態様では、本開示は、

(a) 配列番号1、2、3、4、5、6、および73からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

(b) 配列番号7、8、9、10、11、および12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含み、CD70に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0102】

好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせは、

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(a) 配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(a) 配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(a) 配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(a) 配列番号5または73のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(a) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および(b)配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0103】

別の態様では、本開示は、2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3またはそれらの組み合わせを含む抗体を提供する。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_H CDR1のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号13、14、15、16、17、17および18で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号17の V_H CDR1配列を有する)。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_H CDR2のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号19、20、21、22、23、23および24で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号23で示される V_H CDR2配列を有する)。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_H CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号25、26、27、28、29、75、および30で示される。

【0104】

2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_k CDR1のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号31、32、33、34、35、35および36で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号35で示される V_k CDR1配列を有する)。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_k CDR2のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号37、38、39、40、41、41および42で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号41で示される V_k CDR2配列を有する)。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4の V_k CDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号43、44、45、46、47、47および48で示される(69A7および69A7Yの双方は配列番号47で示される V_k CDR3配列を有する)。CDR領域は、Kabatシステム(K

10

20

30

40

50

abat E. A. ら (1991年) 「Sequences of Proteins of Immunological Interest (第5版)」、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242) を用いて図示される。

【0105】

これらの各抗体がCD70に結合可能でありかつ抗原結合特異性が主にCDR1、CDR2、およびCDR3領域により提供されると仮定すると、V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列とV_K CDR1、CDR2、およびCDR3配列が「混合されて一致する」(すなわち、各抗体がV_H CDR1、CDR2、およびCDR3とV_K CDR1、CDR2、およびCDR3を有する必要があるが、異なる抗体由来のCDRが混合されて一致すること)で、本開示の他の抗CD70結合分子の作製が可能である。かかる「混合されて一致する」抗体のCD70への結合は、上記や実施例に記載の結合アッセイ(例えば、FACS ELISA、Biacore分析)を用いて試験可能である。好ましくは、V_H CDR配列が混合されて一致する場合、特定のV_H配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は構造的に類似のCDR配列と置換される。同様に、V_K CDR配列が混合されて一致する場合、特定のV_K配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、好ましくは構造的に類似のCDR配列と置換される。新規のV_HおよびV_L配列の作製が、1つ以上のV_Hおよび/またはV_L CDR領域配列を2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4のモノクローナル抗体CDR1における本明細書中に開示されるCDR配列由来の構造的に類似の配列と置換することにより可能であることは当業者に容易に理解されるであろう。

10

20

【0106】

したがって、別の態様では、本開示は、

(a) 配列番号13、14、15、16、17、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；

(b) 配列番号19、20、21、22、23、および24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；

(c) 配列番号25、26、27、28、29、30、および75からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；

(d) 配列番号31、32、33、34、35、および36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；

(e) 配列番号37、38、39、40、41、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および

(f) 配列番号43、44、45、46、47、および48からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3；

を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はCD70、好ましくはヒトCD70に対して特異的に結合する。

30

【0107】

好ましい実施形態では、抗体は、

(a) 配列番号13を含む重鎖可変領域のCDR1；

(b) 配列番号19を含む重鎖可変領域のCDR2；

(c) 配列番号25を含む重鎖可変領域のCDR3；

(d) 配列番号31を含む軽鎖可変領域のCDR1；

(e) 配列番号37を含む軽鎖可変領域のCDR2；および

(f) 配列番号43を含む軽鎖可変領域のCDR3

を含む。

40

【0108】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

(a) 配列番号14を含む重鎖可変領域のCDR1；

(b) 配列番号20を含む重鎖可変領域のCDR2；

50

- (c) 配列番号 26 を含む重鎖可変領域の CDR 3 ;
- (d) 配列番号 32 を含む軽鎖可変領域の CDR 1 ;
- (e) 配列番号 38 を含む軽鎖可変領域の CDR 2 ; および
- (f) 配列番号 44 を含む軽鎖可変領域の CDR 3

を含む。

【0109】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号 15 を含む重鎖可変領域の CDR 1 ;
- (b) 配列番号 21 を含む重鎖可変領域の CDR 2 ;
- (c) 配列番号 27 を含む重鎖可変領域の CDR 3 ;
- (d) 配列番号 33 を含む軽鎖可変領域の CDR 1 ;
- (e) 配列番号 39 を含む軽鎖可変領域の CDR 2 ; および
- (f) 配列番号 45 を含む軽鎖可変領域の CDR 3

10

を含む。

【0110】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号 16 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 22 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 28 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 34 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 40 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、 および
- (f) 配列番号 46 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

20

を含む。

【0111】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号 17 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 23 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 29 または 75 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 35 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 41 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、 および
- (f) 配列番号 47 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

30

を含む。

【0112】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号 18 を含む重鎖可変領域 CDR 1、
- (b) 配列番号 24 を含む重鎖可変領域 CDR 2、
- (c) 配列番号 30 を含む重鎖可変領域 CDR 3、
- (d) 配列番号 36 を含む軽鎖可変領域 CDR 1、
- (e) 配列番号 42 を含む軽鎖可変領域 CDR 2、 および
- (f) 配列番号 48 を含む軽鎖可変領域 CDR 3

40

を含む。

【0113】

CDR 1 および / または CDR 2 ドメインから独立した CDR 3 ドメインが単独で抗体の同族抗原に対する結合特異性を決定しうることと、共通の CDR 3 配列に基づく同じ結合特異性を有する複数の抗体が予測通りに産生されうることが、当該技術分野で周知である。例えば、(マウス抗 CD 30 抗体 Ki-4 の重鎖可変ドメイン CDR 3 のみを用いるヒト化抗 CD 30 抗体の産生について記載する) Klimka ら、British J. of Cancer 83 (2) : 252 - 260 頁 (2000 年) ; (親マウス MOC-31 抗 EGP-2 抗体の重鎖 CDR 3 配列のみを用いる組換え上皮糖タンパク質-2 (EGP-2) 抗体について記載する) Beiboer ら、J. Mol. Biol. 296

50

： 833 - 849 頁 (2000 年) ; (マウス抗インテグリン ν_3 抗体 LM609 の重鎖および軽鎖可変 CDR3 ドメインを用いる一群のヒト化抗インテグリン ν_3 抗体においては、各メンバー抗体は、CDR3 ドメイン外部の異なる配列を含み、親マウス抗体と同じエピトープに親マウス抗体と同程度に高いまたはそれより高い親和性で結合可能である点について記載する) Rader ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 : 8910 - 8915 頁 (1998 年) ; (CDR3 ドメインが抗原結合に対して最も有意な寄与をもたらす点を開示する) Barbasa ら、J. Am. Chem. Soc. 116 : 2161 - 2162 頁 (1994 年) ; (ヒト胎盤 DNA に対する 3 つの Fab (SI - 1、SI - 40、および SI - 32) の重鎖 CDR3 配列の抗破傷風トキソイド Fab の重鎖上への移植により既存の重鎖 CDR3 が置換される点を記載し、CDR3 ドメインが単独で結合特異性を与えた点について示している) Barbasa ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 : 2529 - 2533 頁 (1995 年) ; および (単一特異性 IgG 破傷風トキソイドに結合する Fab p313 抗体の重鎖に対する親多重特異性 Fab LNA3 の重鎖 CDR3 のみの転移が親 Fab の結合特異性を保持するのに十分であったという移植試験について記載する) Ditzel ら、J. Immunol. 157 : 739 - 749 頁 (1996 年) を参照のこと。(抗 HER2 モノクローナル抗体の CDR3 に基づくペプチドミメティクスについて記載する) Berezov ら、BIA Journal 8 : Scientific Review 8 (2001 年) ; (抗ホスファチジルセリン抗体の CDR3 ドメインに対応する 12 個のアミノ酸合成ポリペプチドについて記載する) Igarashi ら、J. Biochem (Tokyo) 117 : 452 - 7 頁 (1995 年) ; (抗呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 抗体の重鎖 CDR3 ドメインに由来する単一のペプチドがインビトロでウイルスを中和可能であることを示す) Bourgeois ら、J. Virol 72 : 807 - 10 頁 (1998 年) ; (マウス抗 HIV 抗体の重鎖 CDR3 ドメインに基づくペプチドについて記載する) Levi ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 : 4374 - 8 頁 (1993 年) ; (scFv の結合を Z-DNA 結合抗体の重鎖 CDR3 領域の移植により可能にすることについて記載する) Polymenis および Stoller、J. Immunol. 152 : 5218 - 5329 頁 (1994 年) ; ならびに (重鎖 CDR3 での多様性が通常では同一の IgM 分子における種々のハプテンとタンパク質抗原との識別を可能にするのに十分であることについて記載する) Xu および Davis、Immunity 13 : 37 - 45 頁 (2000 年)。さらに、単一の CDR ドメインによって定義される特許化された抗体について記載する米国特許第 6,951,646 号明細書 ; 米国特許第 6,914,128 号明細書 ; 米国特許第 6,090,382 号明細書 ; 米国特許第 6,818,216 号明細書 ; 米国特許第 6,156,313 号明細書 ; 米国特許第 6,827,925 号明細書 ; 米国特許第 5,833,943 号明細書 ; 米国特許第 5,762,905 号明細書および米国特許第 5,760,185 号明細書を参照のこと。これらの各参考文献はその全体が参照により本明細書中に援用される。

【0114】

したがって、本開示は、ヒトまたは非ヒト動物に由来する抗体由来の 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR3 ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここでモノクローナル抗体は CD70 に特異的に結合可能である。特定の態様の範囲内で、本開示は、非ヒト抗体、例えばマウスまたはラット抗体に由来する 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR3 ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここでモノクローナル抗体は CD70 に特異的に結合可能である。一部の実施形態の範囲内で、非ヒト抗体由来の 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR3 ドメインを含む本発明の抗体は、(a) 結合に対して競合可能であり、(b) 機能特性を保持し、(c) 同じエピトープに結合し、および / または (d) 対応する親非ヒト抗体と類似の結合親和性を有する。

【0115】

他の態様の範囲内で、本開示は、例えば非ヒト動物から得られるヒト抗体などのヒト抗

体由来の1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここでヒト抗体はCD70に特異的に結合可能である。他の態様の範囲内で、本開示は、例えば非ヒト動物から得られるヒト抗体などの第1のヒト抗体由来の1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここで第1のヒト抗体はCD70に特異的に結合可能であり、かつ第1のヒト抗体由来のCDR3ドメインはCD70への結合特異性が欠如したヒト抗体内のCDR3ドメインを置き換えることでCD70に特異的に結合可能な第2のヒト抗体が産生される。一部の実施形態の範囲内で、第1のヒト抗体由来の1つ以上の重鎖および/または軽鎖のCDR3ドメインを含む本発明の抗体は、(a)結合に対して競合可能であり、(b)機能特性を保持し、(c)同じエピトープに結合し、および/または(d)対応する第1の親ヒト抗体と類似の結合親和性を有する。

10

【0116】

特定の生殖細胞系配列を有する抗体

特定の実施形態では、本開示の抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子由来の重鎖可変領域および/または特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。

【0117】

例えば、好ましい実施形態では、本開示は、ヒト $V_H 3-30.3$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はCD70に特異的に結合する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_H 3-33$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_H 4-61$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_H 3-23$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

20

【0118】

別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_K L 6$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_K L 18$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_K L 15$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい実施形態では、本開示は、CD70に特異的に結合する、ヒト $V_K A 27$ 遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

30

【0119】

さらに別の好ましい実施形態では、本開示は、

(a)ヒト $V_H 3-30.3$ 、 $3-33$ 、 $4-61$ 、または $3-23$ 遺伝子(各遺伝子は配列番号61、62、63、および64で示されるアミノ酸配列をコードする)の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、

(b)ヒト $V_K L 6$ 、 $L 18$ 、 $L 15$ 、または $A 27$ 遺伝子(各遺伝子は配列番号65、66、67、および68で示されるアミノ酸配列をコードする)の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、かつ

(c)CD70に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

40

【0120】

50

かかる抗体はまた、上で詳述された機能特性、例えばヒトCD70への高親和性結合、CD70発現細胞による内在化、CD70発現細胞に対するADCCに対する媒介能、および/または細胞毒素に複合される場合におけるインビボでのCD70発現腫瘍細胞の腫瘍成長に対する阻害能のうちの1つ以上を保有しうる。

【0121】

V_H3-30.3およびV_KL6のV_HおよびV_Kを有する抗体の例として、2H5が挙げられる。V_H3-30.3およびV_KL18のV_HおよびV_Kを有する抗体の例として、10B4が挙げられる。V_H3-33およびV_KL15のV_HおよびV_Kを有する抗体の例として、8B5および18E7が挙げられる。V_H4-61およびV_KL6のV_HおよびV_Kを有する抗体の例として、69A7および69A7Yが挙げられる。V_H3-23およびV_KA27のV_HおよびV_Kを有する抗体の例として、1F4が挙げられる。

10

【0122】

かかる抗体はまた、上で詳述された機能特性、例えばヒトCD70への高親和性結合、CD70発現細胞による内在化、腎細胞癌腫瘍細胞系への結合、リンパ腫細胞系への結合、CD70発現細胞に対するADCCに対する媒介能、および/または細胞毒素に複合される場合におけるインビボでのCD70発現腫瘍細胞の腫瘍成長に対する阻害能のうちの1つ以上を保有しうる。

【0123】

本明細書で用いられるヒト抗体は、抗体の可変領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を用いる系から得られる場合、特定の生殖細胞系配列「の産物」であるかまたはそれ「に由来する」重鎖または軽鎖可変領域を含む。かかる系は、目的の抗原とともにヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫する工程または目的の抗原とともにファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリをスクリーニングする工程を含む。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の産物」であるかまたはそれ「に由来する」ヒト抗体が、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、配列においてヒト抗体の配列に対して最も近い（すなわち最大の同一性%がある）ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することにより、かかるものとして同定されうる。特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の産物」であるかまたはそれ「に由来する」ヒト抗体は、例えば自然発生的体細胞突然変異または部位特異的突然変異の意図的導入に起因し、生殖細胞系配列と比べてアミノ酸の差を有しうる。しかし、選択されたヒト抗体は、典型的にはアミノ酸配列においてヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であり、かつ、ヒト抗体が他種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（例えばマウス生殖細胞系配列）と比較される場合にヒトであるものと同定されるアミノ酸残基を有する。特定の場

20

30

40

【0124】

相同抗体

さらに別の実施形態では、本開示の抗体は、本明細書中に記載の好ましい抗体のアミノ酸配列に相同なアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖可変領域を含み、ここで抗体は本開示の抗CD70抗体の所望の機能特性を保持する。

【0125】

例えば、本開示は、

(a) 重鎖可変領域は配列番号1、2、3、4、5、6および73からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み、

50

(b) 軽鎖可変領域は配列番号7、8、9、10、11、および12からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み、

(c) 抗体はヒトCD70に特異的に結合する、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0126】

さらにまたはその他として、抗体は、上で考察された機能特性、例えばヒトCD70への高親和性結合、CD70発現細胞による内在化、腎細胞癌腫瘍細胞系への結合、リンパ腫細胞系への結合、CD70発現細胞に対するADCCに対する媒介能、および/または細胞毒素に複合される場合におけるインビボでのCD70発現腫瘍細胞の腫瘍成長に対する阻害能のうちの一つ以上を保有しうる。

【0127】

様々な実施形態では、抗体は例えばヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体でありうる。

【0128】

他の実施形態では、 V_H および/または V_L アミノ酸配列は、上で示される配列に85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%相同でありうる。上で示される配列の V_H および V_L 領域に対して高い(すなわち80%以上の)相同性を有する V_H および V_L 領域を有する抗体が、配列番号1~12および73をコードする核酸分子の突然変異誘発(例えば、部位特異的またはPCRによる突然変異誘発)と、その後の本明細書中に記載の機能アッセイを用いてのコードされた改変抗体の保持された機能(すなわち上記に示される機能)についての試験により得られうる。

【0129】

本明細書で用いられる2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、2つの配列間の同一性パーセントに相当する。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列で共有される同一位置の数の関数(すなわち同一性% = 同一位置の数 / 位置の全体数 × 100)であり、2つの配列の最適なアラインメントにおいて導入される必要がある。配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、下記の非限定例にて記載のように数学的アルゴリズムを用いて行われうる。

【0130】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、E. Meyers および W. Miller のアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17頁 (1988年)) を用いて決定可能であり、同アルゴリズムは PAM120 重み残基テーブル (weight residue table)、12のギャップ長ペナルティ (Gap length penalty) および4のギャップペナルティを用いて ALIGN プログラム (バージョン2.0) に導入されている。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Needleman および Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453頁 (1970年)) アルゴリズムを用いて決定可能であり、同アルゴリズムは Blossum (Blossum) 62 マトリックスまたは PAM250 マトリックスのいずれかと、16、14、12、10、8、6もしくは4のギャップ重量および1、2、3、4、5もしくは6の長さ重量を用いて GCG ソフトウェアパッケージ (www.gcg.com で入手可能) 内の GAP プログラム中に包含されている。

【0131】

さらにまたはその他として、本開示のタンパク質配列をさらに「クエリー配列」として用い、公的データベースで探索を行い、例えば関連配列を同定することが可能である。かかる探索は、Altschulら、(1990年) J. Mol. Biol. 215: 403-10頁の XBLAST プログラム (バージョン2.0) を用いて実行可能である。BLAST タンパク質の探索を XBLAST プログラム、スコア = 50、ワード長 = 3 を用いて行うことで、本開示の抗体分子に相同なアミノ酸配列が得られうる。比較目的でギャップドアラインメント (gapped alignments) を得るため、Altsch

10

20

30

40

50

hulら、(1997年) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402頁に記載のようにギャップドBLAST(Gapped BLAST)が用いられる。BLASTおよびギャップドBLAST(Gapped BLAST)プログラムを用いる場合、各プログラムのデフォルトパラメータ(例えばXBLASTおよびNBLAST)が有用である。www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。

【0132】

保存的修飾を有する抗体

特定の実施形態では、本開示の抗体は、CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここでこれらのCDR配列のうちの一つ以上は公知の抗CD70抗体に基づく特定のアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、かつここで抗体は本開示の抗CD70抗体の所望の機能特性を保持する。抗原結合を除去することのない特定の保存的配列修飾の作製が可能であることは当該技術分野で理解されている。例えば、(サルモネラ(*Salmonella*))に特異的な抗体のCDR3重鎖ドメインにおける突然変異分析について記載する) Brummelら(1993年) *Biochem* 32:1180-8頁; (抗UA1抗体における突然変異試験について記載する) de Wildtら(1997年) *Prot. Eng.* 10:835-41頁; (HCDR3の中央における変異が親和性の欠如または低下をもたらしたことを示す) Komissarovら(1997年) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870頁; (CDR3領域内での単一のアミノ酸変化により結合活性が失われたことを記載する) Hallら(1992年) *J. Immunol.* 149:1605-12頁; (抗原結合におけるTyr残基の寄与について記載する) KelleyおよびO'Connell(1993年) *Biochem.* 32:6862-35頁; (結合における疎水性の効果について記載する) Adib-Conquyら(1998年) *Int. Immunol.* 10:341-6頁; ならびに(HCDR3アミノ酸変異体について記載する) Beersら(2000年) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43頁を参照のこと。したがって、本開示は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで

(a) 重鎖可変領域のCDR3配列は、配列番号25、26、27、28、29、30、および75のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、

(b) 軽鎖可変領域のCDR3配列は、配列番号43、44、45、46、47、および48のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ

(c) 抗体はヒトCD70に特異的に結合する。

【0133】

さらにまたはその他として、抗体は、上記の機能特性、例えばヒトCD70への高親和性結合、CD70発現細胞による内在化、腎細胞癌腫瘍細胞系への結合、リンパ腫細胞系への結合、CD70発現細胞に対するADCCに対する媒介能、および/または細胞毒素に複合される場合におけるインビボでのCD70発現腫瘍細胞の腫瘍成長に対する阻害能のうちの一つ以上を保有しうる。

【0134】

好ましい実施形態では、重鎖可変領域CDR2配列は、配列番号19、20、21、22、23、および24のアミノ酸配列およびその保存的修飾体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域CDR2配列は、配列番号37、38、39、40、41、および42のアミノ酸配列およびその保存的修飾体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。別の好ましい実施形態では、重鎖可変領域CDR1配列は、配列番号13、14、15、16、17、および18のアミノ酸配列およびその保存的修飾体か

らなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域CDR1配列は、配列番号31、32、33、34、35、および36のアミノ酸配列およびその保存的修飾体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0135】

様々な実施形態では、抗体は、例えばヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体でありうる。

【0136】

本明細書で用いられる「保存的配列修飾 (conservative sequence modifications)」という用語は、アミノ酸配列を有する抗体の結合特性に対して有意に作用または改変することのないアミノ酸修飾を示すように意図されている。かかる保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、当該技術分野で既知の標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCRによる突然変異誘発により本開示の抗体に導入されうる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される場合の置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーについては当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖を有するアミノ酸 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖を有するアミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を含む。したがって、本開示の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基は同じ側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基で置換可能であり、改変抗体は保持された機能 (すなわち上記に示される機能) について本明細書中に記載の機能アッセイを用いて試験可能である。

【0137】

本開示の抗CD70抗体と同じエピトープに結合する抗体

別の実施形態では、本開示は、本開示のCD70モノクローナル抗体 (すなわち、CD70への結合に対して本開示のモノクローナル抗体のいずれかと交差競合する能力を有する抗体) のいずれかにより認識されるようなヒトCD70上のエピトープに結合する抗体を提供する。好ましい実施形態では、交差競合試験における参照抗体は、(配列番号1および7でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体2H5または(配列番号2および8でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体10B4または(配列番号3および9でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体8B5または(配列番号4および10でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体18E7または(配列番号5および11でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体69A7または(配列番号73および11でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体69A7Yまたは(配列番号6および12でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)モノクローナル抗体1F4でありうる。

【0138】

かかる交差競合抗体は、標準CD70結合アッセイにおける2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yまたは1F4と交差競合するその能力に基づいて同定されうる。例えば、標準ELISAアッセイの利用が可能であり、ここでは組換えヒトCD70タンパク質がプレート上に固定化され、抗体のうちの1つが蛍光標識され、かつ非標識抗体における標識抗体の結合から競合する能力が評価される。さらにまたはその他として、BIACore分析を用い、抗体の交差競合能力の評価が可能である。例えば、BIACoreを用いるエピトープ結合実験は、2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yまたは1F4抗体がCD70上の異なるエピトープに結合することを示した。試験抗体の、例えば2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7

10

20

30

40

50

Yまたは1F4のヒトCD70への結合に対する阻害能により、試験抗体がヒトCD70への結合に対して2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yまたは1F4と競合しうることから、(配列番号1および7でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)2H5、(配列番号2および8でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)10B4、(配列番号3および9でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)8B5、(配列番号4および10でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)18E7、(配列番号5および11でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)69A7、(配列番号73および11でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)69A7Y、または(配列番号6および12でそれぞれ示されるV_HおよびV_L配列を有する)1F4により認識される場合と同じヒトCD70上のエピトープに結合することが示される。

10

【0139】

好ましい実施形態では、2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yまたは1F4により認識される場合と同じヒトCD70上のエピトープに結合する抗体はヒトモノクローナル抗体である。かかるヒトモノクローナル抗体は、実施例に記載のように調製され、単離されうる。

【0140】

改変され修飾された抗体

さらに、本開示の抗体を出発原料として本明細書中に開示されるV_Hおよび/またはV_L配列のうちの一つ以上を有する抗体を用いて調製し、修飾抗体を改変することが可能であり、ここで修飾抗体は最初の抗体からの改変された特性を有しうる。抗体は、一方もしくは両方の可変領域(すなわちV_Hおよび/またはV_L)内、例えば一つ以上のCDR領域内および/または一つ以上のフレームワーク領域内での一つ以上の残基の修飾によって改変可能である。さらにまたはその他として、抗体は、例えば定常領域内で残基を修飾し、抗体のエフェクター機能を改変することによって改変可能である。

20

【0141】

特定の実施形態では、CDR移植を用いて抗体の様々な領域を改変することが可能である。抗体は、6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)内に位置するアミノ酸残基全体に支配的な標的抗原と相互作用する。この理由のため、CDR内のアミノ酸配列は、各抗体間でCDR外部の配列よりも多様である。CDR配列が大部分の抗体-抗原相互作用に関与することから、特定の天然抗体の特性を模倣する組換え抗体を、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列上に移植された特定の天然抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターの作成により発現することは可能である(例えば、Riechmann L.ら(1998年)Nature 332:323-327頁; Jones P.ら(1986年)Nature 321:522-525頁; Queen C.ら(1989年)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033頁; Winterに交付された米国特許第5,225,539号明細書ならびにQueenらに交付された米国特許第5,530,101号明細書; 米国特許第5,585,089号明細書; 米国特許第5,693,762号明細書および米国特許第6,180,370号明細書を参照)。

30

40

【0142】

したがって、本開示の別の実施形態は、配列番号13、14、15、16、17、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1配列、配列番号19、20、21、22、23、および24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2配列、ならびに配列番号25、26、27、28、29、75および30からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3配列を含む重鎖可変領域と、配列番号31、32、33、34、35、および36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号37、38、39、40、41、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2、ならびに配列番号43、44、45、46、47、および48からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域と、を含む単離

50

されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。したがって、かかる抗体は、モノクローナル抗体 2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Y、または1F4のV_HおよびV_LCDR配列を有するが、これらの抗体由来の異なるフレームワーク配列を有しうる。

【0143】

かかるフレームワーク配列は、生殖細胞系の抗体遺伝子配列を含む公的なDNAデータベースまたは出版された参考文献から得られうる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子における生殖細胞系DNA配列は、(インターネット上のwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで入手可能な)「Vベース(VBase)」ヒト生殖細胞系配列データベースや、Kabata E.A.ら(1991年)「Sequence of Proteins of Immunological Interest (第5版)」、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson I.M.ら(1992年)「The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with different Hypervariable Loops」J. Mol. Biol. 227: 776-798; ならびにCox J.P.L.ら(1994年)「A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage」Eur. J. Immunol. 24: 827-836頁(これら各々の内容は参照により本明細書中に明示的に援用される)において見出されうる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子における生殖細胞系DNA配列は、Genbankデータベース内に見出されうる。例えば、HCo7 HuMAbマウス内で見出される以下の重鎖生殖細胞系配列は、付属のGenbank登録番号: 1-69(NG_0010109、NT_024637およびBC070333)、3-33(NG_0010109およびNT_024637)ならびに3-7(NG_0010109およびNT_024637)にて入手可能である。別の例として、HCo12 HuMAbマウス内で見出される以下の重鎖生殖細胞系配列は、付属のGenbank登録番号: 1-69(NG_0010109、NT_024637およびBC070333)、5-51(NG_0010109およびNT_024637)、4-34(NG_0010109およびNT_024637)、3-30.3(CAJ556644)ならびに3-23(AJ406678)にて入手可能である。ヒト重鎖および軽鎖生殖細胞系配列のさらに別の供給源は、IMG T(<http://imgt.cines.fr>)から入手可能なヒト免疫グロブリン遺伝子のデータベースである。

【0144】

抗体タンパク質配列は、当業者に周知のギャップドBLAST(Gapped BLAST)と称される配列類似性を探索する方法(Altschulら(1997年)Nucleic Acids Research 25: 3389-3402頁)の1つを用いて集められたタンパク質配列データベースに対して比較される。BLASTは、抗体配列とデータベース配列の間での統計的に有意なアラインメントが整列されたワードの高スコアリングセグメント対(HSP)を有する傾向が高いという点でヒューリスティックアルゴリズムである。スコアが延長またはトリミングにより改善されえないセグメント対はヒットと称される。つまり、Vベース(VBASE)由来のヌクレオチド配列(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)が翻訳され、かつFR1~FR3フレームワーク領域の間の領域および同領域を含む領域が保持される。データベース配列は平均98残基長を有する。タンパク質の全長にわたり正確に一致する二重配列が除去される。オフの低複雑性フィルタを除くデフォルトの標準パラメータおよびBLOSUM62の置換マトリックスを備えたblastpプログラムを用いるタンパク質におけるBLAST探索では、配列一致をもたらす上位5つのヒットがフィルタにかけられる。ヌクレオチド配列は全部で6つのフレームで翻訳され、

データベース配列の一致するセグメント内に停止コドンを含みないフレームはヒットの可能性があると考えられる。次いで、これはBLASTプログラムtblastxを用いて確認され、これにより全部で6つのフレーム内で抗体配列が翻訳され、全部で6つのフレーム内で動的に翻訳されたVベース(VBASE)ヌクレオチド配列に対する翻訳が比較される。IMGT(<http://imgt.cines.fr>)から入手可能なものなどの、他のヒト生殖細胞系配列のデータベースは、上記のVBASEと同様に検索することができる。

【0145】

同一性は、抗体配列と配列の全長にわたるタンパク質データベースとの間の正確なアミノ酸の一致である。正(同一性+置換の一致)は同一ではなく、アミノ酸置換はBLOSUM62置換行列によって導かれる。抗体配列がデータベース配列のうちの2つと同じ同一性で一致する場合、大部分の正を伴うヒットであれば一致する配列ヒットであることが決定されることになる。

10

【0146】

本開示の抗体で用いられる好ましいフレームワーク配列は、本開示の選択される抗体で用いられるフレームワーク配列に構造的に類似するもの、例えば本開示の好ましいモノクローナル抗体で用いられるV_H3-30.3フレームワーク配列(配列番号61)および/またはV_H3-33フレームワーク配列(配列番号62)および/またはV_H4-61フレームワーク配列(配列番号63)および/またはV_H3-23フレームワーク配列(配列番号64)および/またはV_KL6フレームワーク配列(配列番号65)および/またはV_KL18フレームワーク配列(配列番号66)および/またはV_KL15フレームワーク配列(配列番号67)および/またはV_KA27フレームワーク配列(配列番号68)に類似するものである。

20

【0147】

V_H CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにV_K CDR1、CDR2およびCDR3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子内に見出される配列と同一の配列を有するフレームワーク領域上に移植されうるか、またはCDR配列は、生殖細胞系配列と比較して1つ以上の変異を有するフレームワーク領域上に移植されうる。例えば、場合によりフレームワーク領域内の残基を突然変異させ、抗体の抗原への結合能を維持または促進することが有益であることが見出されている(例えば、Queenらに交付された米国特許第5,530,101号明細書;米国特許第5,585,089号明細書;米国特許第5,693,762号明細書および米国特許第6,180,370号明細書を参照)。

30

【0148】

可変領域修飾の別のタイプは、アミノ酸残基をV_Hおよび/またはV_KのCDR1、CDR2および/またはCDR3領域内で変異させ、それにより目的の抗体の1つ以上の結合特性(例えば親和性)を改善するものである。部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発を行い、突然変異を導入可能であり、かつ、目的の抗体の結合または他の機能特性に対する効果が、本明細書中に記載されかつ実施例に提供されるインビトロまたはインビボアッセイにおいて評価されうる。好ましくは、(上で考察の)保存的修飾が導入される。突然変異は、アミノ酸の置換、付加または欠失でありうるが、好ましくは置換である。さらに典型的には、CDR領域内の1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つ以下の残基が改変される。

40

【0149】

したがって、別の実施形態では、本開示は、(a)配列番号13、14、15、16、17、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号13、14、15、16、17、および18と比べて1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR1領域;(b)配列番号19、20、21、22、23、および24からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号19、20、21、22、23、および24と比べて1つ、2つ、3つ、4つ

50

もしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR2領域；(c)配列番号25、26、27、28、29、75および30からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号25、26、27、28、29、75および30と比べて1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_HCDR3領域；(d)配列番号31、32、33、34、35、および36からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号31、32、33、34、35、および36と比べて1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_KCDR1領域；(e)配列番号37、38、39、40、41、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号37、38、39、40、41、および42と比べて1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_KCDR2領域；ならびに(f)配列番号43、44、45、46、47、および48からなる群より選択されるアミノ酸配列あるいは配列番号43、44、45、46、47、および48と比べて1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_KCDR3領域を含む重鎖可変領域を含む単離された抗CD70モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

10

20

30

40

50

【0150】

本開示の改変抗体は、例えば抗体の特性を改善するためにV_Hおよび/またはV_K内のフレームワーク残基に修飾が施されている場合の抗体を含む。典型的には、かかるフレームワーク修飾を施すことで抗体の免疫原性が低下する。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列に「復帰突然変異する(back mutate)」ことである。より詳細には、体細胞突然変異を経ている抗体は、抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を有しうる。かかる残基は、抗体フレームワーク配列を抗体が由来する生殖細胞系配列と比較することにより同定されうる。かかる「復帰突然変異された」抗体はまた、本開示により包含されるように意図されている。例えば、10B4においては、V_Hのアミノ酸残基番号2(FR1内)がイソロイシンである一方、対応するV_H3-30.3生殖細胞系配列内でのこの残基はバリンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異される」可能性がある(例えば10B4のV_HのFR1の残基2はイソロイシンからバリンに「復帰突然変異される」可能性がある)。

【0151】

別の例として、10B4においては、V_Hのアミノ酸残基番号30(FR1内)がグリシンである一方、対応するV_H3-30.3生殖細胞系配列内でのこの残基はセリンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば10B4のV_HのFR1の残基30はグリシンからセリンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【0152】

別の例として、8B5においては、V_Hのアミノ酸残基番号24(FR1内)がトレオニンである一方、対応するV_H3-33生殖細胞系配列内でのこの残基はアラニンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば8B5のV_HのFR1の残基24はトレオニンからアラニンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【0153】

別の例として、8B5においては、V_Hのアミノ酸残基番号77(FR3内)がリジンである一方、対応するV_H3-33生殖細胞系配列内でのこの残基はアスパラギンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば8B5のV_HのFR3の残基11はリジンからアスパラギンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【0154】

別の例として、8B5においては、V_Hのアミノ酸残基番号80(FR3内)がセリンである一方、対応するV_H3-33生殖細胞系配列内でのこの残基はチロシンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば8B5のV_HのF

R 3 の残基 1 4 はセリンからチロシンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【 0 1 5 5 】

別の例として、6 9 A 7 においては、V_H のアミノ酸残基番号 5 0 (F R 2 内) がロイシンである一方、対応する V_H 4 - 6 1 生殖細胞系配列内でのこの残基はイソロイシンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば 6 9 A 7 の V_H の F R 2 の残基 1 3 はロイシンからイソロイシンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【 0 1 5 6 】

別の例として、6 9 A 7 においては、V_H のアミノ酸残基番号 8 5 (F R 3 内) がアルギニンである一方、対応する V_H 4 - 6 1 生殖細胞系配列内でのこの残基はセリンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば 6 9 A 7 の V_H の F R 3 の残基 1 8 はアルギニンからセリンに「復帰突然変異される」可能性がある。

10

【 0 1 5 7 】

別の例として、6 9 A 7 においては、V_H のアミノ酸残基番号 8 9 (F R 3 内) がトレオニンである一方、対応する V_H 4 - 6 1 生殖細胞系配列内でのこの残基はアラニンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば 6 9 A 7 の V_H の F R 3 の残基 2 2 はトレオニンからアラニンに「復帰突然変異される」可能性がある。

【 0 1 5 8 】

別の例として、1 0 B 4 においては、V_L のアミノ酸残基番号 4 6 (F R 2 内) がフェニルアラニンである一方、対応する V_L L 1 8 生殖細胞系配列内でのこの残基はロイシンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば 1 0 B 4 の V_L の F R 2 の残基 1 2 はフェニルアラニンからロイシンに「復帰突然変異される」可能性がある。

20

【 0 1 5 9 】

別の例として、6 9 A 7 においては、V_L のアミノ酸残基番号 4 9 (F R 2 内) がフェニルアラニンである一方、対応する V_L L 6 生殖細胞系配列内でのこの残基はチロシンである。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系配置に復帰させるため、例えば 6 9 A 7 の V_L の F R 2 の残基 1 5 はフェニルアラニンからチロシンに「復帰突然変異される」可能性がある。

30

【 0 1 6 0 】

別のタイプのフレームワーク修飾は、フレームワーク領域内部またはさらに 1 つ以上の C D R 領域内部の 1 つ以上の残基を突然変異させ、T 細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。このアプローチはまた「脱免疫 (d e i m m u n i z a t i o n) 」と称され、C a r r らによる米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 1 5 3 0 4 3 号明細書にさらに詳述されている。

【 0 1 6 1 】

本開示の改変抗体はまた、アミノ酸残基に対して修飾がなされ、抗体上での T 細胞エピトープの相互作用を改変するアミノ酸修飾を通じて免疫原性応答の増大または低下がなされているものを含む (例えば、米国特許第 6 , 8 3 5 , 5 5 0 号明細書 ; 米国特許第 6 , 8 9 7 , 0 4 9 号明細書および米国特許第 6 , 9 3 6 , 2 4 9 号明細書を参照) 。

40

【 0 1 6 2 】

フレームワークまたは C D R 領域内でなされる修飾に加えまたはその他として、本開示の抗体は、F c 領域内で修飾を含み、典型的には抗体の 1 つ以上の機能特性、例えば血清半減期、補体固定、F c 受容体結合性および / または抗原依存性の細胞毒性を変化させるように改変されうる。さらに、本開示の抗体は、化学的に修飾されうる (例えば 1 つ以上の化学的部分が抗体に結合されうる) か、または修飾によりそのグリコシル化が改変されさらに抗体の 1 つ以上の機能特性が改変されうる。これらの各実施形態は下記にさらに詳述されている。F c 領域内の残基の番号付与は K a b a t の E U 指数のものである。

【 0 1 6 3 】

50

一実施形態では、C H 1のヒンジ領域が、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化する、例えば増加または減少するように修飾される。このアプローチは、B o d m e r らによる米国特許第 5 , 6 7 7 , 4 2 5 号明細書にさらに記載されている。C H 1のヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化することで、例えば軽鎖および重鎖の構築が促進されるかあるいは抗体の安定性が増大または低下する。

【 0 1 6 4 】

別の実施形態では、抗体の F c ヒンジ領域の突然変異により抗体の生物学的半減期が減少する。より詳細には、抗体により天然 F c - ヒンジドメイン S p A 結合に対するブドウ球菌 (S t a p h y l o c o c c y l) プロテイン A (S p A) 結合が低下している程度に、1つ以上のアミノ酸変異が F c - ヒンジ断片の C H 2 - C H 3 ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、W a r d らによる米国特許第 6 , 1 6 5 , 7 4 5 号明細書にさらに詳述されている。

10

【 0 1 6 5 】

別の実施形態では、抗体の修飾によりその生物学的半減期が増加する。様々なアプローチが可能である。例えば、W a r d に交付された米国特許第 6 , 2 7 7 , 3 7 5 号明細書に記載のように、1つ以上の以下の変異、すなわち T 2 5 2 L、T 2 5 4 S、T 2 5 6 F が導入可能である。あるいは、P r e s t a らによる米国特許第 5 , 8 6 9 , 0 4 6 号明細書および米国特許第 6 , 1 2 1 , 0 2 2 号明細書に記載のように、生物学的半減期を増加させるため、抗体は I g G の F c 領域の C H 2 ドメインの2つのループから得られるサルベージ (s a l v a g e) 受容体結合エピトープを有するように C H 1 または C L 領域内で改変されうる。

20

【 0 1 6 6 】

さらに他の実施形態では、F c 領域は少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基と置換し、抗体のエフェクター機能を改変することによって改変される。例えば、アミノ酸残基 2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 9 7、3 1 8、3 2 0 および 3 2 2 から選択される1つ以上のアミノ酸が、抗体がエフェクターリガンドに対して改変された親和性を有しても親抗体の抗原への結合能を保持する程度に異なるアミノ酸残基と置換される。親和性が改変される対象のエフェクターリガンドは、例えば F c 受容体または補体の C 1 成分でありうる。このアプローチは、米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 2 1 号明細書および米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 6 0 号明細書 (いずれも W i n t e r らによる) にさらに詳述されている。

30

【 0 1 6 7 】

別の例では、アミノ酸残基 3 2 9、3 3 1 および 3 2 2 から選択される1つ以上のアミノ酸が、抗体が C 1 q 結合を改変しおよび / または補体依存性の細胞障害 (C D C) を低減または根絶している程度に異なるアミノ酸残基と置換されうる。このアプローチは、米国特許第 6 , 1 9 4 , 5 5 1 号明細書 (I d u s o g i e らによる) にさらに詳述されている。

【 0 1 6 8 】

別の例では、アミノ酸位置 2 3 1 および 2 3 9 内の1つ以上のアミノ酸残基が改変されることにより、抗体の補体を固定する能力が改変される。このアプローチは、B o d m e r らによる P C T 公開、国際公開第 9 4 / 2 9 3 5 1 号パンフレットにさらに記載されている。

40

【 0 1 6 9 】

さらに別の例では、以下の位置、すなわち 2 3 8、2 3 9、2 4 8、2 4 9、2 5 2、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 8、2 6 5、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 2、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 3、2 8 5、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 8、3 0 1、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 0 9、3 1 2、3 1 5、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、3 2 7、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 7、3 3 8、3 4 0、3 6 0、3 7 3、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 8、3 8 9、3 9 8、4 1 4、4 1 6、4 1 9、4 3 0、4 3 4、4 3 5、4 3 7、

50

438もしくは439での1つ以上のアミノ酸の修飾によるFc領域の修飾により、抗体の抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を媒介する能力が増大しおよび/または抗体のFc受容体に対する親和性が増大する。このアプローチは、PCT公開、国際公開第00/42072号パンフレット(Prestaによる)にさらに記載されている。さらに、ヒトIgG1上のFcR1、FcRII、FcRIIIおよびFcRnに対する結合部位がマッピングされており、かつ結合が改善された変異体についての記載がなされている(Shields R.L.ら(2001年)J. Biol. Chem. 276:6591-6604頁を参照)。位置256、290、298、333、334および339での特異的変異がFcRIIIに対する結合を改善することが示された。さらに、以下の変異体の組み合わせ、すなわちT256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224AおよびS298A/E333A/K334AがFcRIIIに対する結合を改善することが示された。

10

20

30

40

50

【0170】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体のC末端は、米国仮特許出願第60/957,271号明細書(その全体が参照により本明細書中に援用される)に記載のようにシステイン残基の導入によって修飾される。かかる修飾は、限定はされないが、完全長重鎖配列のC末端またはその近傍での既存のアミノ酸残基の置換ならびに完全長重鎖配列のC末端に対するシステインを有する延長部の導入を含む。好ましい実施形態では、システインを有する延長部は、(N末端からC末端にかけて)アラニン-アラニン-システイン配列を含む。

【0171】

好ましい実施形態では、かかるC末端システイン修飾体の存在は、パートナー分子、例えば治療剤またはマーカー分子との複合における位置を提供する。特に、C末端システインの修飾に起因する反応性チオール基の存在を利用し、下記に詳述されるジスルフィドリンカーを用いたパートナー分子の複合が可能である。この方法での抗体とパートナー分子との複合は、結合の特異的部位全体にわたり制御性を高めることを可能にする。さらに、C末端またはその近傍での結合の部位の導入により、複合が、抗体の機能特性との干渉を低減または除去しかつ簡素化された分析および複合製剤の質の制御を可能にするように最適化されうる。

【0172】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、アグリコシル化(aglycosylated)抗体が作製されうる(すなわち抗体におけるグリコシル化が失われる)。グリコシル化の改変により、例えば抗体の抗原に対する親和性が増大しうる。かかる糖質修飾は、例えば抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位を改変することによりなされうる。例えば、1つ以上のアミノ酸置換がなされうる結果、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去によりその部位でのグリコシル化が失われる。かかるアグリコシル化により、抗原に対する抗体の親和性が増大しうる。かかるアプローチは、米国特許第5,714,350号明細書および米国特許第6,350,861号明細書(Coらに付与)にさらに詳述されている。グリコシル化を改変するためのさらなるアプローチが、Hanaiらに交付された米国特許第7,214,775号明細書、Prestaに交付された米国特許第6,737,056号明細書、Prestaに交付された米国特許出願公開第20070020260号明細書、Dickeyらに交付されたPCT公開の国際公開第2007/084926号パンフレット、Zhuらに交付されたPCT公開の国際公開第2006/089294号パンフレット、およびRavetchらに交付されたPCT公開の国際公開第2007/055916号パンフレットにおいてさらに詳述されており、これら各々はその全体が参照により本明細書中に援用される。

【0173】

さらにまたはその他として、グリコシル化の改変タイプを有する抗体、例えば減量されたフコシル残基を有する低フコシル化(hypofucosylated)抗体または増強されたGlcNac二分構造を有する抗体が作製されうる。かかる改変されたグリコシ

ル化パターンにより、抗体のADCC能力が増大することが示されている。かかる糖質修飾は、例えばグリコシル化機構が改変された宿主細胞内で抗体を発現することにより行われうる。グリコシル化機構が改変された細胞については当該技術分野で記載がなされており、本開示の組換え抗体を発現することによりグリコシル化が、改変抗体が産生される宿主細胞として用いられうる。例えば、細胞系Ms704、Ms705およびMs709は、Ms704、Ms705およびMs709細胞系内で発現される抗体がその糖質上にフコースを含まないように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8（（1、6）フコシルトランスフェラーゼ）を含まない。Ms704、Ms705およびMs709細胞系は、2つの置換ベクターを用いたCHO/DG44細胞内での標的化されたFUT8遺伝子の破壊により作製された（Yamaneらによる米国特許出願公開第20040110704号明細書およびYamane-Ohnukiら（2004年）Biotechnol Bioeng 87:614-22頁を参照）。別の例として、Hanaiらによる欧州特許第1,176,195号明細書は、機能的に破壊されたフコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を有する細胞系について記載している。かかる細胞系内で発現される抗体は、1,6結合に関連した酵素の低減または除去により低フコシル化（hypofucosylation）を示す。Hanaiらは、フコースを抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンに添加するのに低い酵素活性を有するかまたは酵素活性を有することのない細胞系、例えばラット骨髄腫細胞系YB2/0（ATCC CRL 1662）についても記載している。PrestaによるPCT公開、国際公開第03/035835号パンフレットには、フコースをAsn(297)に連結された糖質に結合させる能力が低下した（その宿主細胞内で発現される抗体の低フコシル化ももたらす）変異CHO細胞系、Lec13細胞について記載されている（Shields R.L.ら（2002年）J. Biol. Chem. 277:26733-26740頁も参照）。UmanaらによるPCT公開、国際公開第99/54342号パンフレットには、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ（例えば（1,4）-N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼIII（GnTIII））を、改変された細胞系内で発現される抗体が抗体のADCC活性の増大をもたらすGlcNAc二分構造の増大を示すように発現するように改変された細胞系について記載されている（Umanaら（1999年）Nat. Biotech. 17:176-180頁も参照）。あるいは、抗体のフコース残基はフコシダーゼ酵素を用いて切断されうる。例えば、フコシダーゼのL-フコシダーゼはフコシル残基を抗体から除去する（Tarentino A.L.ら（1975年）Biochem. 14:5516-23頁）。

【0174】

さらにまたはその他として、グリコシル化の改変タイプを有する抗体の作製が可能であり、ここでその改変は抗体のシアル化のレベルに関係する。かかる改変は、Dickeyらに交付されたPCT公開の国際公開第2007/084926号パンフレットおよびRavetchらに交付されたPCT公開の国際公開第2007/055916号パンフレットに記載されており、それら双方はそれら全体が参照により援用される。例えば、アルスロバクター・ウレアファシエンス（*Arthrobacter ureafaciens*）シアリダーゼなどのシアリダーゼとの酵素反応を用いることができる。かかる反応の条件は、一般に米国特許第5,831,077号明細書に記載されており、その全体が参照により本明細書中に援用される。適切な酵素の他の非限定例として、ノイラミニダーゼおよびN-グリコシダーゼF（それぞれSchloemerら、J. Virology、15(4)、882-893頁（1975年）およびLeibigerら、Biochem J、338、529-538頁（1999年）に記載）が挙げられる。脱シアル化抗体が親和性クロマトグラフィーを用いてさらに精製可能である。あるいは、本方法を用い、例えばシアリルトランスフェラーゼ酵素の使用によりシアル化のレベルを上昇させることができる。かかる反応の条件は、一般にBassetら、Scandinavian Journal of Immunology、51(3)、307-311頁（2000年）に記載されている。

【 0 1 7 5 】

本開示で検討される本明細書中の抗体の別の修飾がペグ化 (p e g y l a t i o n) である。抗体をペグ化することで、例えば抗体の生物学的 (例えば血清) 半減期が増加されうる。抗体をペグ化するため、抗体またはその断片は典型的にはポリエチレングリコール (P E G)、例えば P E G の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と、1つ以上の P E G 基が抗体または抗体断片に結合した状態になるという条件下で反応する。好ましくは、ペグ化は、反応性 P E G 分子 (または類似反応性の水 - 可溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われる。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質、例えばモノ (C 1 - C 1 0) アルコキシ - もしくはアリールオキシ - ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール - マレイミドを誘導体化するのに用いられている P E G の形態のいずれかを包含するように意図されている。特定の実施形態では、ペグ化されるべき抗体はアグリコシル化 (a g l y c o s y l a t e d) 抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当該技術分野で既知であり、本開示の抗体に適用可能である。例えば、N i s h i m u r a による欧州特許第 0 1 5 4 3 1 6 号明細書および I s h i k a w a による欧州特許第 0 4 0 1 3 8 4 号明細書を参照のこと。

10

【 0 1 7 6 】

抗体断片および抗体模倣体

本発明は、従来の抗体に限定されることなく、抗体断片および抗体模倣体の使用を通じて実施可能である。下記に詳述のように、多種多様な抗体断片および抗体模倣技術が現在では開発されており、当該技術分野で広く知られている。多数のこれら技術、例えばドメイン抗体、ナノボディ、およびユニボディでは従来の抗体構造の断片またはそれに対する他の修飾が用いられる一方、他の技術、例えば従来の抗体結合を模倣する一方、異なる機序から産生され、それを介して機能する結合構造を用いるアフイボディ、ダルピン、アンチカリン、アビマー、およびパーサボディも存在する。

20

【 0 1 7 7 】

ドメイン抗体 (d A b) は抗体の最小の機能結合単位であり、ヒト抗体の重鎖 (V H) または軽鎖 (V L) のいずれかの可変領域に対応するものである。ドメイン抗体は約 1 3 k D a の分子量を有する。D o m a n t i s は、完全ヒト V H および V L d A b における一連の大規模かつ高度に機能的なライブラリ (各ライブラリ内に 1 0 0 億超の異なる配列) を開発しており、これらのライブラリを用いて治療標的に特異的な d A b を選択する。多数の従来の抗体に対し、ドメイン抗体は細菌、酵母、および哺乳類細胞系内で十分に発現される。ドメイン抗体およびその産生方法のさらなる詳細については、米国特許第 6 , 2 9 1 , 1 5 8 号明細書 ; 米国特許第 6 , 5 8 2 , 9 1 5 号明細書 ; 米国特許第 6 , 5 9 3 , 0 8 1 号明細書 ; 米国特許第 6 , 1 7 2 , 1 9 7 号明細書 ; 米国特許第 6 , 6 9 6 , 2 4 5 号明細書 ; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 9 4 1 号明細書 ; 欧州特許出願第 1 4 3 3 8 4 6 号明細書および欧州特許第 0 3 6 8 6 8 4 号明細書および欧州特許第 0 6 1 6 6 4 0 号明細書 ; 国際公開第 0 5 / 0 3 5 5 7 2 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 1 0 1 7 9 0 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 0 8 1 0 2 6 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 0 5 8 8 2 1 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 0 0 3 0 1 9 号パンフレットおよび国際公開第 0 3 / 0 0 2 6 0 9 号パンフレットの参照により得られうる (これら各々はその全体が参照により本明細書中に援用される) 。

30

40

【 0 1 7 8 】

ナノボディは、天然の重鎖抗体の固有の構造および機能特性を有する抗体由来の治療タンパク質である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン (V H H) および 2 つの定常ドメイン (C H 2 および C H 3) を有する。重要なことには、クローン化され、単離された V H H ドメインは、元の重鎖抗体の完全な抗原結合能を内在する完全に安定的なポリペプチドである。ナノボディは、ヒト抗体の V H ドメインとの高い相同性を有し、かつ活性の任意の低下を伴うことなくさらにヒト化されうる。重要なことには、ナノボディは免疫原性の低い可能性を有し、霊長動物試験でナノボディのリード化合物を用いて確認されて

50

いる。

【0179】

ナノボディでは、従来の抗体の利点を小分子薬物の重要な特徴と組み合わせられる。ナノボディは、従来の抗体と同様、その標的および低い固有の毒性に対し、高い標的特異性、高親和性を示す。しかし、ナノボディは、小分子薬物と同様、酵素を阻害し、受容体のクレフトに容易に接近可能である。さらに、ナノボディは極めて安定的であり、注射以外の手段で投与可能であり（例えば国際公開第04/041867号パンフレットを参照（その全体が参照により本明細書中に援用される）、製造が容易である。ナノボディの他の利点は、小さいサイズに起因するまれであるかまたは隠されたエピトープの認識、タンパク質標的の空洞または活性部位へのその固有の三次元構造に起因する高い親和性および選択性による結合性、薬物形式の柔軟性、半減期の調整ならびに薬物発見の容易性および速度を含む。

10

【0180】

ナノボディは、単一の遺伝子によりコードされ、ほぼすべての原核生物および真核生物宿主、例えば大腸菌（*E. coli*）（例えば米国特許第6,765,087号明細書を参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））、かび（例えばコウジカビ属（*Aspergillus*）またはトリコデルマ（*Trichoderma*））ならびに酵母（例えば、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）、クリベロマイセス（*Kluyveromyces*）、ハンゼヌラ（*Hansenula*）またはピキア（*Pichia*））（例えば米国特許第6,838,254号明細書を参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））において効率的に産生される。産生プロセスは拡張可能であり、数キログラム量のナノボディが産生されている。ナノボディは、従来の抗体と比べて優れた安定性を示すことから、貯蔵寿命が長く即使用可能な溶液として調合可能である。

20

【0181】

ナノクローン（*Nanoclone*）法（例えば国際公開第06/079372号パンフレットを参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））は、B細胞の自動化された高スループットな選択に基づき所望の標的に対するナノボディを産生するための独自の方法であり、場合により本発明との関連で用いられうる。

【0182】

ユニボディは別の抗体断片技術であるが、この技術はIgG4抗体のヒンジ領域の除去に基づくものである。ヒンジ領域の欠失により、従来のIgG4抗体に対して本質的に半分のサイズでありかつIgG4抗体の二価結合領域ではなく一価結合領域を有する分子が生成される。IgG4抗体が不活性であることから免疫系と相互作用することがないことも周知であり、これは免疫応答が望ましくない場合の疾患の治療において有利な場合があり、この利点はユニボディ上に受け継がれる。例えば、ユニボディは、その結合対象の細胞を死滅させることなく阻害または静めるように機能しうる。さらに、癌細胞に結合するユニボディは、それらを刺激して増殖させることはない。さらに、ユニボディが従来のIgG4抗体の約半分のサイズであることから、それは大きい固形腫瘍全体により適切な分布を示すとともに有利な有効性を発揮する可能性がある。ユニボディは、全IgG4抗体と同様の速度で身体から除去され、その抗原に対して全抗体と同様の親和性で結合可能である。ユニボディのさらなる詳細は、特許出願国際公開第2007/059782号パンフレット（その全体が参照により本明細書中に援用される）の参照により得られうる。

30

40

【0183】

アフィボディ（*Affibody*）分子は、スタフィロコッカ（*staphylococcal*）プロテインAのIgG結合ドメインのうちの1つに由来する、58-アミノ酸残基のタンパク質ドメインに基づく親和性タンパク質の新しいクラスを表す。この3つのヘリックスバンドル（*helix bundle*）ドメインはコンビナトリアルファージミドライブラリの作成物における足場として用いられおり、それから所望の分子を標的にするアフィボディ変異体がファージディスプレイ技術を用いて選択されうる（*Nor*

50

d K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S., Uhlen M., Nygren P. A., 「Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain」、Nat Biotechnol 1997年; 15: 772 - 777頁、Ronmark J., Gronlund H., Uhlen M., Nygren P. A., 「Human immunoglobulin A (IgA) - specific ligands from combinatorial engineering of protein A」、Eur J Biochem 2002年; 269: 2647 - 2655頁)。

アフィボディ分子におけるその低い分子量 (6 kDa) とともに単純で強固な構造により、それが例えば検出試薬のような多種多様な用途に適するようになり (Ronmark J., Hansson M., Nygren T. ら, 「Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli」、J Immunol Methods 2002年; 261: 199 - 211頁)、かつ受容体相互作用が阻害される (Sandstorm K., Xu Z., Forsberg G., Nygren P. A., 「Inhibition of the CD28 - CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering」、Protein Eng 2003年; 16: 691 - 700頁)。

アフィボディおよびそれを産生する方法のさらなる詳細が、米国特許第5,831,012号明細書により得られうる (その全体が参照により本明細書中に援用される)。

【0184】

標識されたアフィボディは、多数のアイソフォームを判定するためのイメージング用途においても有用でありうる。

【0185】

ダルピン (設計されたアンキリンリピートタンパク質) は、非抗体ポリペプチドの結合能を用いるように開発された抗体模倣 DRP (設計されたリピートタンパク質) 技術の一例である。アンキリンまたはロイシンリッチのリピートタンパク質などのリピートタンパク質は、偏在する結合分子であり、抗体と異なり細胞内および細胞外に生じる。それら固有のモジュール構造は、構造単位の反復 (リピート) を特徴とし、共に蓄積され、可変でかつモジュール式の標的に結合する表面を示す伸長されたリピートドメインが形成される。このモジュール性に基づき、非常に多様化された結合特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが生成されうる。この方法は、可変の表面残基およびリピートドメインへのランダムアセンブリを示す自家和合性リピートに共通の設計を含む。

【0186】

ダルピンは、細菌発現系内で極めて高収量に産生可能であり、既知の最も安定なタンパク質に属する。ヒト受容体、サイトカイン、キナーゼ、ヒトプロテアーゼ、ウイルスおよび膜タンパク質を含む広範囲の標的タンパク質に対して極めて特異的な高親和性のダルピンが選択されている。1桁のナノモル~ピコモルの範囲内の親和性を有するダルピンが得られうる。

【0187】

ダルピンは、ELISA、サンドイッチELISA、フローサイトメトリー分析 (FACS)、免疫組織化学 (IHC)、チップ用途、親和性精製またはウエスタンブロッティングを含む広範囲の用途で用いられている。ダルピンは、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP) に融合された細胞内マーカータンパク質としての細胞内区画内で活性が高いことも判明した。ダルピンは、pM範囲内のIC50でウイルスの侵入を阻害するのにさらに用いられた。ダルピンは、タンパク質-タンパク質相互作用の遮断に望ましいだけでなく酵素の阻害に望ましい。プロテアーゼ、キナーゼおよびトランスポーターの阻害に奏功して

おり、ほとんどの場合、アロステリック阻害様式である。腫瘍に対する極めて迅速で特異的な濃縮および極めて好ましい腫瘍対血液比により、インビボでの診断的または治療的アプローチに十分に適合するダルピンが作製される。

【0188】

ダルピンおよび他のDRP技術に関するさらなる情報が、米国特許出願公開第2004/0132028号明細書および国際特許出願公開、国際公開第02/20565号パンフレットに見出されうる（それら双方はそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0189】

アンチカリンはさらなる抗体模倣技術であるが、この場合、結合特異性は、ヒト組織内および体液中で自然にかつ豊富に発現される低分子量タンパク質のファミリーであるリポカリンに由来する。リポカリンは、進化することで、化学的感受性があるかまたは不可溶性の化合物の生理的輸送および保存に関連したインビボでの機能の範囲を果たしている。リポカリンは、タンパク質の一端で4つのループを支持する高度に保存されたβ-バレルを含む強固な固有の構造を有する。これらのループは結合ポケットに対する入口(entrance)を形成し、分子のこの部分における高次構造上の差は各リポカリン間の結合特異性におけるばらつきを示している。

【0190】

保存されたシートフレームワークにより支持される超可変ループの全体構造から免疫グロブリンが連想されるが、リポカリンはサイズの観点で抗体とはかなり異なり、単一の免疫グロブリンドメインよりもわずかに大きい160-180個のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖からなる。

【0191】

リポカリンはクローン化され、アンチカリンの作製のため、そのループには改変がなされる。構造的に多様なアンチカリンのライブラリが生成されており、アンチカリンの提示は、結合機能の選択およびスクリーニング、それに続く、原核系または真核系におけるさらなる分析のための可溶性タンパク質の発現および産生を可能にする。試験によると、仮想的に任意のヒト標的タンパク質に特異的なアンチカリンの開発が可能で、その単離が可能であり、ナノモルのまたはより高い範囲での結合親和性が得られうることを示すことに奏功している。

【0192】

アンチカリンは、二重標的化された(dual targeting)タンパク質、いわゆるデュオカリンとしても形式化されうる。デュオカリンは、標準の作製プロセスを用いて1つの容易に生成される単量体タンパク質内の2つの別々の治療標的に結合する一方、その2つの結合ドメインの構造的な方向性にかかわらず標的の特異性および親和性を保持する。

【0193】

単一の分子を通じての複数の標的の調節は、2つ以上の病原因子を含むことで知られる疾患において特に有利である。さらに、デュオカリンなどの二価または多価の結合形式は、疾患における細胞表面分子の標的化において有意な可能性を有し、シグナル伝達経路に対してアゴニスト作用を媒介するか、または細胞表面受容体の結合およびクラスタリングを介して内在化効果の増大を誘発する。さらに、デュオカリンの固有の高い安定性は単量体アンチカリンに匹敵し、デュオカリンに対して柔軟な製剤および送達の可能性をもたらす。

【0194】

アンチカリンに関するさらなる情報が、米国特許第7,250,297号明細書および国際特許出願公開番号、国際公開第99/16873号パンフレットに見出されうる（それら双方はそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0195】

本発明との関連で有用な別の抗体模倣技術がアビマーである。アビマーは、インビトロ

10

20

30

40

50

でのエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイによりヒト細胞外受容体ドメインの大きいファミリーから進化したものであり、結合および阻害特性を備えた多重ドメインタンパク質を生成する。複数の独立した結合ドメインの連結により結合活性がもたらされることが示されており、結果として従来の単一のエピトープ結合タンパク質に対して親和性および特異性が改善される。他の有望な利点として、大腸菌 (*Escherichia coli*) 内の多重標的に特異的な分子の単純かつ効率的な産生、プロテアーゼに対する改善された熱安定性および耐性が挙げられる。ナノメートル以下の親和性を有するアビマーが種々の標的に対して得られている。

【0196】

アビマーに関するさらなる情報が、米国特許出願公開第2006/0286603号明細書、米国特許出願公開第2006/0234299号明細書、米国特許出願公開第2006/0223114号明細書、米国特許出願公開第2006/0177831号明細書、米国特許出願公開第2006/0008844号明細書、米国特許出願公開第2005/0221384号明細書、米国特許出願公開第2005/0164301号明細書、米国特許出願公開第2005/0089932号明細書、米国特許出願公開第2005/0053973号明細書、米国特許出願公開第2005/0048512号明細書、米国特許出願公開第2004/0175756号明細書に見出されうる（それらすべてはそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0197】

パーサポディは、本発明との関連で利用可能な別の抗体模倣技術である。パーサポディは、15%を超えるシステインを有する3~5kDaの小さいタンパク質であり、高いジスルフィド密度の足場を形成し、典型的なタンパク質が有する疎水性コアの代わりとなる。疎水性コアを含む多数の疎水性アミノ酸の少数のジスルフィドとの置換により、より小さくより親水性が高く（低下した凝集および非特異的結合）、プロテアーゼおよび熱に対してより耐性があり、かつMHC提示の大部分に寄与する残基が疎水性であることからより低いT細胞エピトープの密度を有するタンパク質が生成される。これらの特性の4つすべてが免疫原性に作用することで周知であり、それらは共に免疫原性の大幅な低下の原因になると予想される。

【0198】

パーサポディについての着想は、ヒル、ヘビ、クモ、サソリ、カタツムリ、およびアネモネにより生成される天然の注射可能な生物医薬品から得られるものであり、予想外に低い免疫原性を示すことが知られている。選択された天然タンパク質ファミリーから、サイズの設計およびスクリーニングにより、疎水性、タンパク質分解の抗原プロセッシング、およびエピトープ密度が注射可能な天然タンパク質における平均を大幅に下回るレベルまで最小化される。

【0199】

パーサポディの構造を仮定すると、これらの抗体模倣体は多価、多重特異性、半減期機構の多様性、組織標的化モジュールおよび抗体Fc領域の非存在を含む多目的形式を提供する。さらに、パーサポディは、高収量で大腸菌 (*E. coli*) 内で作製され、かつ、パーサポディはその親水性および小サイズ故に可溶性が高く、高濃度に調合されうる。パーサポディは、特に熱安定的であり（それは沸騰可能であり）、長い貯蔵寿命をもたらす。

【0200】

パーサポディに関するさらなる情報が、米国特許出願公開第2007/0191272号明細書に見出されうる（その全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0201】

上で提供された抗体断片および抗体模倣技術の詳細な説明は、本明細書との関連で用いられうるあらゆる技術の包括的リストであるように意図されていない。例えば、また限定を目的としない場合、他のポリペプチドに基づく技術、例えば*Quira*、*Nature Biotechnology*、25(8)921-929頁(2007年)（その全体が

10

20

30

40

50

参照により本明細書中に援用される)で概説された相補性決定領域の融合、ならびに核酸に基づく技術、例えば米国特許第5,789,157号明細書、米国特許第5,864,026号明細書、米国特許第5,712,375号明細書、米国特許第5,763,566号明細書、米国特許第6,013,443号明細書、米国特許第6,376,474号明細書、米国特許第6,613,526号明細書、米国特許第6,114,120号明細書、米国特許第6,261,774号明細書、および米国特許第6,387,620号明細書(これらのすべては参照により本明細書中に援用される)に記載のRNAアプタマー技術を含む種々のさらなる技術が本発明との関連で利用可能である。

【0202】

抗体の物理的特性

本開示の抗体は、抗CD70抗体の様々な物理的特性によりさらに特徴づけられうる。様々なアッセイを用い、これらの物理的特性に基づいて抗体の異なるクラスの検出および/または識別が可能である。

【0203】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかにおいて1つ以上のグリコシル化部位を有しうる。可変領域内に1つ以上のグリコシル化部位が存在する結果、抗原結合の改変により抗体の免疫原性または抗体のpKの変化が増大しうる(Marshallら(1972年)Ann Rev Biochem 41:673-702頁; Gala F.A.およびMorrisson S.L.(2004年)J Immunol 172:5489-94頁; Wallickら(1988年)J Exp Med 168:1099-109頁; Spiro R.G.(2002年)Glycobiology 12:43R-56R; Parekhら(1985年)Nature 316:452-7頁; Mimuraら(2000年)Mol Immunol 37:697-706頁)。グリコシル化はN-X-S/T配列を有するモチーフで生じることが知られている。可変領域のグリコシル化はグライコプロット(GlycoPlot)アッセイを用いて試験可能であり、同アッセイでは、抗体の切断によりFabが産生され、次いで過ヨウ素酸酸化およびシッフ塩基形成を測定するアッセイを用いてグリコシル化が試験される。あるいは、可変領域のグリコシル化はディオネクス(Dionex)光クロマトグラフィー(ディオネクス-LC(Dionex-LC))を用いて試験可能であり、そこでは糖類がFabから切断されて単糖類にされ、各糖類の含量が分析される。いくつかの例では、可変領域のグリコシル化を有することのない抗CD70抗体を有することが好ましい。これは、可変領域内にグリコシル化モチーフを有することのない抗体を選択するかまたはグリコシル化モチーフ内の残基を当該技術分野で周知の標準技術を用いて突然変異させることにより実現されうる。

【0204】

好ましい実施形態では、本開示の抗体はアスパラギン異性部位を有することがない。脱アミドまたはイソアスパラギン酸効果が各々、N-GまたはD-G配列上で生じうる。脱アミドまたはイソアスパラギン酸効果の結果、主鎖ではなく側鎖のカルボキシ末端から離れてキック構造を生成することにより抗体の安定性を低下させるイソアスパラギン酸が生成される。イソアスパラギン酸の生成は異性体定量分析(iso-quant assay)を用いて測定可能であり、そこでは逆相HPLCを用いてイソアスパラギン酸についての試験が行われる。

【0205】

各抗体は特有の等電点(pI)を有することになるが、一般に抗体は6~9.5のpH範囲に収まることになる。IgG1抗体におけるpIは典型的には7~9.5のpH範囲内に収まり、かつIgG4抗体におけるpIは典型的には6~8のpH範囲内に収まる。抗体はこの範囲外のpIを有する場合がある。効果は一般に未知であるが、正常な範囲外のpIを有する抗体がインビボ条件下である程度のアンフォールディングおよび不安定性を有しうるということが推定される。等電点はキャピラリー等電点電気泳動アッセイを用いて試験可能であり、それはpH勾配を生成し、そこでは精度向上のためにレーザー集光が用い

10

20

30

40

50

られうる (Janiniら (2002年) Electrophoresis 23:1605-11頁; Maら (2001年) Chromatographia 53:S75-89頁; Huntら (1998年) J Chromatogr A 800:355-67頁)。いくつかの例では、正常な範囲内に収まる pI 値を有する抗 CD70 抗体を有することが好ましい。これは正常な範囲内の pI を有する抗体を選択するかまたは帯電した表面残基を当該技術分野で周知の標準の技術を用いて突然変異することによりなされうる。

【0206】

各抗体は、熱安定性を示す融解温度を有することになる (Krishnamurthy R. および Manning M. C. (2002年) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71頁)。より高い熱安定性は、インピボで全体的により高い抗体安定性を示す。抗体の融解点は、示差走査熱量測定などの技術を用いて測定される (Chenら (2003年) Pharm Res 20:1952-60頁; Ghirlandolaら (1999年) Immunol Lett 68:47-52頁)。 T_{M1} は抗体の初期のアンフォールディングの温度を示す。 T_{M2} は抗体の完全なアンフォールディングの温度を示す。一般に、本開示の抗体の T_{M1} が 60 より高く、好ましくは 65 より高く、さらにより好ましくは 70 より高いことが好ましい。あるいは、抗体の熱安定性は円二色性を用いて測定される。(Murrayら (2002年) J. Chromatogr Sci 40:343-9頁)。

10

【0207】

好ましい実施形態では、急速に分解することのない抗体が選択される。抗 CD70 抗体の断片化は、当該技術分野で十分に理解されているようにキャピラリー電気泳動 (CE) および MALDI-MS を用いて測定される (Alexander A. J. および Hughes D. E. (1995年) Anal Chem 67:3626-32頁)。

20

【0208】

別の好ましい実施形態では、最小の凝集効果を有する抗体が選択される。凝集が、望ましくない免疫応答および/または改変されるかもしくは好ましくない薬物動態学的特性の誘因となりうる。一般に、抗体では、25%以下、好ましくは20%以下、さらにより好ましくは15%以下、さらにより好ましくは10%以下およびさらにより好ましくは5%以下の凝集が許容される。凝集は、単量体、二量体、三量体または多量体を同定するためのサイズ排除カラム (SEC) 高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) および光散乱を含む、当該技術分野で周知のいくつかの技術により測定される。

30

【0209】

抗体を改変する方法

上で考察のように、本明細書中に開示される V_H および V_K 配列を有する抗 CD70 抗体を用い、新しい抗 CD70 抗体の作製が V_H および/または V_K 配列またはそれに結合された定常領域の修飾により可能である。したがって、本開示の別の態様では、本開示の抗 CD70 抗体、例えば 2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Y または 1F4 の構造的特徴を用い、本開示の抗体の少なくとも1つの機能特性、例えばヒト CD70 への結合を保持する構造的に関連性がある抗 CD70 抗体が作製される。上で考察のように、例えば、2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Y もしくは 1F4 の1つ以上の CDR 領域またはその変異体を既知のフレームワーク領域および/または他の CDR と組換え的に結合させ、組換え操作されたさらなる本開示の抗 CD70 抗体の作製が可能である。修飾の他のタイプとして、前セクションに記載のタイプが挙げられる。改変方法における出発原料は、本明細書中に提供される1つ以上の V_H および/もしくは V_K 配列またはそれらの1つ以上の CDR 領域である。改変抗体を作製するのに、本明細書中に提供される1つ以上の V_H および/もしくは V_K 配列またはそれらの1つ以上の CDR 領域を有する抗体を実際に調製する (すなわちタンパク質として発現させる) 必要はない。それに対し、配列内に含まれる情報を出発原料として用い、元の配列に由来する「第二世代」配列が作製され、次いで「第二世代」配列が調製され、タンパク質

40

50

として発現される。

【0210】

したがって、別の実施形態では、本開示は、抗CD70抗体を調製するための方法であって、

(a) (i) 配列番号13、14、15、16、17、および18からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号19、20、21、22、23、および24からなる群より選択されるCDR2配列および/または配列番号25、26、27、28、29、75、および30からなる群より選択されるCDR3配列を含む重鎖可変領域抗体配列；および/または(ii) 配列番号31、32、33、34、35、および36からなる群より選択されるCDR1配列、配列番号37、38、39、40、41、および42からなる群より選択されるCDR2配列および/または配列番号43、44、45、46、47、および48からなる群より選択されるCDR3配列を含む軽鎖可変領域抗体配列を提供する工程と、

(b) 重鎖可変領域抗体配列内および/または軽鎖可変領域抗体配列内で少なくとも1つのアミノ酸残基を改変し、少なくとも1つの改変抗体配列を作製する工程と、

(c) タンパク質として改変抗体配列を発現する工程と、
を含む方法を提供する。

【0211】

標準の分子生物学技術を用い、改変抗体配列の調製および発現が可能である。

【0212】

好ましくは、改変抗体配列によりコードされる抗体は、本明細書中に記載の抗CD70抗体の機能特性のうちの1つ、一部または全部を保持するものであり、ここでの機能特性は、限定はされないが、

(a) ヒトCD70に 1×10^{-7} M以下の K_D で結合する特性、および

(b) 腎細胞癌腫瘍細胞系に結合する特性、

(c) リンパ腫細胞系、例えばB細胞腫瘍細胞系に結合する特性、

(d) CD70発現細胞により内在化される特性、

(e) CD70発現細胞に対して抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を示す特性、および

(f) 細胞毒素に複合される場合、インビボでCD70発現細胞の成長を阻害する特性を含む。

【0213】

改変抗体の機能特性は、当該技術分野で使用可能でありおよび/または本明細書中に記載の標準アッセイ、例えば実施例で示されるアッセイ(例えば、フローサイトメトリー、結合アッセイ)を用いて評価可能である。

【0214】

本開示の抗体を改変する方法の特定の実施形態では、変異が、抗CD70抗体のコード配列の全部もしくは一部に沿ってランダムまたは選択的に導入可能であり、かつ、得られる修飾された抗CD70抗体における結合活性および/または本明細書中に記載の他の機能特性についてスクリーニング可能である。突然変異方法については当該技術分野で記載がなされている。例えば、ShortによるPCT公開、国際公開第02/092780号パンフレットでは、抗体変異を飽和突然変異誘発、合成的ライゲーションアセンブリー(synthetic ligation assembly)またはそれらの組み合わせを用いて作製しスクリーニングするための方法が記載されている。あるいは、LazarらによるPCT公開、国際公開第03/074679号パンフレットでは、コンピュータによるスクリーニング方法を用いて抗体の生理化学的特性を最適化する方法が記載されている。

【0215】

本開示の抗体をコードする核酸分子

本開示の別の態様は、本開示の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞内

10

20

30

40

50

に、細胞溶解液中にまたは部分精製形態もしくは実質的に純粋な形態で存在しうる。核酸は、当該技術分野で周知のアルカリ/SDS処理、CsClバンドニング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動およびその他を含む標準技術により、他の細胞成分または他の汚染物質、例えば他の細胞核酸もしくはタンパク質から除去精製される場合、「単離される」かまたは「実質的に純粋な状態にされる」。F. Ausubelら編(1987年)「Current Protocol in Molecular Biology」、ニューヨーク(New York)のGreene Publishing and Wiley Interscienceを参照のこと。本開示の核酸が例えばDNAまたはRNAでありうるとともに、イントロン配列を有するかまたは有しない場合がある。好ましい実施形態では核酸はcDNA分子である。

10

【0216】

本開示の核酸は、標準の分子生物学技術を用いて得られうる。ハイブリドーマ(例えばさらに下記のヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから調製されるハイブリドーマ)により発現される抗体においては、ハイブリドーマにより作製される抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAが標準のPCR増幅またはcDNAクローニング技術により得られうる。(例えばファージディスプレイ技術を用いる)免疫グロブリン遺伝子ライブラリから得られる抗体については、かかる抗体をコードする核酸が遺伝子ライブラリから回収されうる。

【0217】

本開示の好ましい核酸分子は、2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yまたは1F4モノクローナル抗体のV_HおよびV_L配列をコードするものである。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4のV_H配列をコードするDNA配列は、それぞれ配列番号49、50、51、52、53、74および54で示される。2H5、10B4、8B5、18E7、69A7、69A7Yおよび1F4のV_L配列をコードするDNA配列は、それぞれ配列番号55、56、57、58、59、59および60で示される(69A7および69A7Yは配列番号59で示される場合と同じV_L配列をコードするDNA配列を有する)。

20

【0218】

一旦V_HおよびV_LセグメントをコードするDNA断片が得られると、これらのDNA断片を標準の組換えDNA技術によりさらに操作することで、例えば可変領域遺伝子が完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子またはscFv遺伝子に変換されうる。これらの操作では、V_LもしくはV_HをコードするDNA断片が別のタンパク質、例えば抗体の定常領域またはフレキシブルリンカー(flexible linker)をコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。これに関連して用いられる「作動可能に連結される」という用語は、2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように、2つのDNA断片が連結されることを意味するように意図されている。

30

【0219】

V_H領域をコードする単離されたDNAは、V_HをコードするDNAを、重鎖定常領域(CH1、CH2、およびCH3)をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより完全長重鎖遺伝子に変換されうる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で既知であり(例えばKabata E. A.ら(1991年)「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照)、これらの領域を包含するDNA断片が標準のPCR増幅により得られうる。重鎖定常領域は、IgG1、IgQ1、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域でありうるが、最も好ましくはIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子については、V_HをコードするDNAは重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結されうる。

40

50

【0220】

V_L領域をコードする単離されたDNAは、V_LをコードするDNAを、軽鎖定常領域C_Lをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより完全長軽鎖遺伝子（およびFab軽鎖遺伝子）に変換されうる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で既知であり（例えばKabata E. A.ら（1991年）「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照）、これらの領域を包含するDNA断片は標準のPCR増幅により得られうる。好ましい実施形態では、軽鎖定常領域はカッパまたはラムダ定常領域でありうる。

10

【0221】

scFv遺伝子を作製するのに、V_HおよびV_LをコードするDNA断片がフレキシブルリンカー、例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする別の断片に作動可能に連結されることで、V_HおよびV_L配列はフレキシブルリンカーで連結されたV_LおよびV_H領域を有する隣接した一本鎖タンパク質として発現されうる（例えば、Birdら（1988年）Science 242: 423-426頁；Houstonら（1988年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883頁；およびMcCaffertyら（1990年）、Nature 348: 552-554頁を参照）。

20

【0222】

本開示のモノクローナル抗体の産生

本開示のモノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体の方法、例えばKohlerおよびMilstein（1975年）Nature 256: 495頁の標準の体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む種々の技術により産生可能である。原理上、体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、モノクローナル抗体を産生するための他の技術、例えばBリンパ球のウイルス性または発癌性の形質転換が用いられうる。

【0223】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ生成は極めて十分に確立された方法である。融合のために免疫された脾細胞を単離するための免疫プロトコルおよび技術は当該技術分野で既知である。融合相手（例えばマウス骨髄腫細胞）および融合方法についても既知である。

30

【0224】

本開示のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製される非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製されうる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的の非ヒトハイブリドーマから得られ、標準の分子生物学技術を用いて非マウス（例えばヒト）免疫グロブリン配列を有するように改変されうる。例えば、キメラ抗体を作製するため、マウス可変領域は当該技術分野で既知の方法を用いてヒト定常領域に連結されうる（例えばCabillyらに交付された米国特許第4,816,567号明細書）。ヒト化抗体を作製するため、マウスCDR領域は当該技術分野で既知の方法を用いてヒトフレームワークに挿入されうる（例えば、Winterに交付された米国特許第5,225,539号明細書ならびにQueenらに交付された米国特許第5,530,101号明細書；米国特許第5,585,089号明細書；米国特許第5,693,762号明細書および米国特許第6,180,370号明細書を参照）。

40

【0225】

好ましい実施形態では、本開示の抗体はヒトモノクローナル抗体である。CD70に特異的ながかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックまたはトランスクロモゾームマウスを用いて産生されうる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモゾームマウスは、本明細書中で各々HuMAb Mouse（登録商標）およびKMMouse（登録商標）と称されるマウスを含み、本明細書中で総称して「ヒトIgマウス」と称される。

50

【0226】

HuMabMouse (登録商標) (Medarex, Inc.) は、内因性 μ および鎖遺伝子座を不活性化する標的化された変異とともに未転位のヒト重鎖(μ および)ならびに軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を有する(例えば、Lonbergら 1994年) Nature 368(6474): 856-859頁を参照)。したがって、マウスは、マウスIgMまたはの発現の低下を示し、免疫に応答し、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランス遺伝子がクラススイッチおよび体細胞突然変異を受け、高親和性のヒトIgGモノクローナル抗体が産生される(Lonberg N.ら(1994年)上記; Lonberg N.(1994年)「Handbook of Experimental Pharmacology」113: 49-101頁にレビュー; Lonberg N.およびHuszar D.(1995年) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93頁; ならびにHarding F.およびLonberg N.(1995年) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546頁)。HuMabMouse(登録商標)の調製および使用ならびにかかるマウスにより保有されるゲノム修飾については、Taylor L.ら(1992年) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295頁; Chen J.ら(1993年) International Immunology 5: 647-656頁; Tuailonら(1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724頁; Choiら(1993年) Nature Genetics 4: 117-123頁; Chen J.ら(1993年) EMBO J. 12: 821-830頁; Tuailonら(1994年) J. Immunol. 152: 2912-2920頁; Taylor L.ら(1994年) International Immunology 6: 579-591頁; ならびにFishwild D.ら(1996年) Nature Biotechnology 14: 845-851頁にさらに記載されている(これらすべての内容はそれら全体が参照により本明細書中に具体的に援用される)。さらに、米国特許第5,545,806号明細書; 米国特許第5,569,825号明細書; 米国特許第5,625,126号明細書; 米国特許第5,633,425号明細書; 米国特許第5,789,650号明細書; 米国特許第5,877,397号明細書; 米国特許第5,661,016号明細書; 米国特許第5,814,318号明細書; 米国特許第5,874,299号明細書; および米国特許第5,770,429号明細書(すべてはLonbergおよびKayに交付)、Suraniらに交付された米国特許第5,545,807号明細書; PCT公開、国際公開第92/03918号パンフレット、国際公開第93/12227号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第97/13852号パンフレット、国際公開第98/24884号パンフレットおよび国際公開第99/45962号パンフレット(すべてはLonbergおよびKayに交付)、ならびにKormanらに交付されたPCT公開、国際公開第01/14424号パンフレットを参照のこと。例えばBruggemannによるPCT公開の国際公開第00/26373号パンフレットに記載のヒト軽鎖遺伝子を有するトランスジェニックマウスも用いられうる。例えば、ヒト軽鎖トランス遺伝子を有するマウスを、ヒト重鎖トランス遺伝子(例えばHC07)を有し、場合によりヒト軽鎖トランス遺伝子(例えばKC05)も有するマウスと交配させ、ヒト重鎖および軽鎖トランス遺伝子の双方を有するマウスの作製が可能である(例えば実施例1を参照)。

【0227】

別の実施形態では、本開示のヒト抗体は、トランス遺伝子およびトランスクロモソーム上でヒト免疫グロブリン配列を保有するマウス、例えばヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランスクロモソームを保有するマウスを用いて産生されうる。このマウスは、本明細書中で「KMMouse(登録商標)」と称され、Ishidaらに交付されたPCT公開、国際公開第02/43478号パンフレットに詳述されている。

【0228】

10

20

30

40

50

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する他のトランスジェニック動物系は当該技術分野で使用可能であり、その使用により、本開示の抗CD70抗体が産生されうる。例えば、ゼノマウス(Xenomouse)(Abgenix, Inc.)として称される他のトランスジェニック系の使用が可能であり、かかるマウスは、例えばKucherlapatiらに交付された米国特許第5,939,598号明細書;米国特許第6,075,181号明細書;米国特許第6,114,598号明細書;米国特許第6,150,584号明細書および米国特許第6,162,963号明細書に記載されている。

【0229】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する他のトランスクロモゾーム動物系は当該技術分野で使用可能であり、その使用により、本開示の抗CD70抗体の産生が可能である。例えば、「TCマウス」と称される、ヒト重鎖トランスクロモゾームとヒト軽鎖トランスクロモゾームとの双方を保有するマウスの使用が可能であり、かかるマウスについてはTomizukaら(2000年)Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:722-727頁に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖トランスクロモゾームを保有するウシについての記載が当該技術分野でなされており(例えば、Kuroiwaら(2002年)Nature Biotechnology 20:889-894頁およびPCT出願の国際公開第2002/092812号パンフレット)、その使用により、本開示の抗CD70抗体の産生が可能である。

【0230】

本開示のヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を用いても調製可能である。ヒト抗体を単離するためのかかるファージディスプレイ法は、当該技術分野で確立されたものである。例えば、Ladnerらに交付された米国特許第5,223,409号明細書;米国特許第5,403,484号明細書;および米国特許第5,571,698号明細書;Dowerらに交付された米国特許第5,427,908号明細書および米国特許第5,580,717号明細書;McCaffertyらに交付された米国特許第5,969,108号明細書および米国特許第6,172,197号明細書;ならびにGriffithsらに交付された米国特許第5,885,793号明細書;米国特許第6,521,404号明細書;米国特許第6,544,731号明細書;米国特許第6,555,313号明細書;米国特許第6,582,915号明細書および米国特許第6,593,081号明細書を参照のこと。

【0231】

本開示のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト抗体反応が免疫時に生成されうるようにヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを用いて調製されうる。かかるマウスは、例えばWilsonらに交付された米国特許第5,476,996号明細書および米国特許第5,698,767号明細書に記載されている。

【0232】

別の実施形態では、ヒト抗CD70抗体が、Buechlerらによる米国特許第6,794,132号明細書に記載のようにヒトIgマウスとファージディスプレイ技術を併用して調製される。より詳細には、本方法は最初に、(上記のHuMabマウスまたはKMマウスなどの)ヒトIgマウスにおけるマウスの1つ以上のCD70抗原での免疫による抗CD70抗体応答の生成と、その後のマウスのリンパ細胞由来のヒト抗体鎖をコードする核酸の単離およびこれらの核酸のディスプレイベクター(例えばファージ)への導入によるディスプレイパッケージのライブラリの提供を含む。したがって、各ライブラリメンバーはヒト抗体鎖をコードする核酸を含み、各抗体鎖がディスプレイパッケージから提示される。次いで、ライブラリを、CD70タンパク質を用いてスクリーニングし、CD70に特異的に結合するライブラリメンバーが単離される。次いで、選択されたライブラリメンバーの核酸挿入物が単離され、標準の方法により配列決定され、選択されたCD70結合剤の軽鎖および重鎖可変配列が決定される。可変領域は、標準の組換えDNA技術、例えば可変領域のヒト重鎖および軽鎖定常領域をV_H領域がC_H領域に動作可能に連結

10

20

30

40

50

されかつV_L領域がC_L領域に動作可能に連結されるように保有する発現ベクターへのクローニングにより、完全長抗体鎖に変換されうる。

【0233】

ヒトIgマウスの免疫

ヒトIgマウスを用いて本開示のヒト抗体が産生される場合、かかるマウスは、L o n b e r g N . ら (1 9 9 4 年) N a t u r e 3 6 8 (6 4 7 4) : 8 5 6 - 8 5 9 頁 ; F i s h w i l d D . ら (1 9 9 6 年) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 4 : 8 4 5 - 8 5 1 頁 ; ならびにPCT公開の国際公開第98/24884号パンフレットおよび国際公開第01/14424号パンフレットに記載のように、CD70発現細胞系、CD70抗原の精製もしくは濃縮調製物および/または組換えCD70もしくはは 10
CD70融合タンパク質で免疫されうる。好ましくは、マウスは1回目の注入時に6~16週齢となる。例えば、CD70抗原の精製または組換え調製物(5~50μg)を用い、ヒトIgマウスの腹腔内および/または皮下への免疫が可能である。

【0234】

CD70に結合する完全ヒトモノクローナル抗体を産生するための詳細な方法が下記の実施例1に記載されている。様々な抗原を用いる試験を重ねることで、トランスジェニックマウスが、最初に完全フロイントアジュバント中の抗原で腹腔内(IP)に免疫され、それに続き、不完全フロイントアジュバント中の抗原で隔週、最大で全6回IP免疫される時、応答することが示されている。しかし、フロイント以外のアジュバント(例えば、R I B I アジュバント)についても有効であることが見出されている。さらに、アジュバントの非存在下では全細胞における免疫原性が高いことが見出されている。免疫応答は、後眼窩(r e t r o o r b i t a l)の出血により得られる血漿試料を用いる免疫プロトコルを通して監視可能である。血漿はE L I S Aでスクリーニング可能であり(後述するように)、十分な力価の抗CD70ヒト免疫グロブリンを有するマウスが融合において用いられうる。マウスは、屠殺および脾臓摘出の例えば3日前、抗原で静脈内に追加免疫されうる。免疫ごとに2~3の融合がなされる必要がありうることが想定される。典型的にはマウス6~24匹が各抗原に対して免疫される。通常、H C o 7 および H C o 1 2 株の双方が用いられる。H C o 7 および H C o 1 2 マウス株の生成はそれぞれ、米国特許第5, 7 7 0 , 4 2 9 号明細書およびPCT公開の国際公開第01/09187号パンフレットの 20
実施例2に記載されている。さらに、H C o 7 および H C o 1 2 トランス遺伝子は共に2つの異なるヒト重鎖トランス遺伝子(H C o 7 / H C o 1 2)を有する単一のマウスに育種されうる。その他としてまたはさらに、K M M o u s e (登録商標)株がPCT公開の国際公開第02/43478号パンフレットに記載のように用いられうる。 30

【0235】

本開示のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

本開示のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するため、免疫されたマウス由来の脾細胞および/またはリンパ節細胞が単離され、適切な不死化細胞系、例えばマウス骨髄腫細胞系に融合されうる。生成されたハイブリドーマでは、抗原特異的な抗体の産生についてスクリーニング可能である。例えば、免疫されたマウス由来の脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液が、50%PEGとともにP3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL1580)の数の1/6に融合されうる。あるいは、免疫マウス由来の脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液は、C y t o P u l s e 大型チャンバ細胞融合エレクトロポレーター(C y t o P u l s e S c i e n c e s , I n c . (G l e n B u r n i e , M a r y l a n d))を用いる、電場に基づく電気融合法を用いて融合されうる。細胞は、平底マイクロタイタープレート内に約2×10⁵でプレティング後、20%胎仔クローン血清、18%「653」馴化培地、5%オリゲン(o r i g e n) (I G E N)、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5mMのヘペス、0.055mMの2-メルカプトエタノール、50単位/mlのペニシリン、50mg/mlのストレプトマイシン、50mg/mlのゲンタマイシンおよび1×ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(H A T)培地(S i g m a ; H A Tは融合の 40
50

24時間後に添加される)を含有する選択培地内で1週間インキュベートされる。約2週間後、細胞はHATがHTと交換された培地内で培養されうる。次いで、各ウェルにおけるヒトモノクローナルIgMおよびIgG抗体についてはELISAによりスクリーニング可能である。一旦多数のハイブリドーマの成長が生じると、培地は通常10~14日後に観察されうる。抗体を分泌するハイブリドーマは、再プレーティングされ、再びスクリーニングされ、依然としてヒトIgG陽性である場合、モノクローナル抗体は限界希釈により少なくとも2回サブクロニングされうる。次いで、特徴づけのため、安定なサブクローンをインピットで培養することで、組織培地内に少量の抗体が産生されうる。

【0236】

ヒトモノクローナル抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマはモノクローナル抗体の精製用の2リットルのスピナーラスコ内で成長されうる。親和性クロマトグラフィー前、上清がプロテインA-セファロース(Pharmacia(Piscataway, N.J.))を用いて濾過され、濃縮される。溶出されたIgGをゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーで検査することで純度が保証されうる。緩衝溶液はPBSに交換可能であり、濃度は1.43の減衰係数を用い、OD280により判定可能である。モノクローナル抗体は、一定量に分割され、-80で保存されうる。

【0237】

本開示のモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの生成

本開示の抗体は、例えば当該技術分野で周知のように組換えDNA技術と遺伝子形質移入方法を併用し、宿主細胞のトランスフェクトーマ内でも産生されうる(例えば、Morrisson, S. (1985年) Science 229:1202頁)。

【0238】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現するため、部分長または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAが標準の分子生物学技術(例えば目的の抗体を発現するハイブリドーマを用いるPCR増幅またはcDNAクローニング)により得られ、DNAは、遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように発現ベクターに挿入されうる。これに関連し、「作動可能に連結される」という用語は、抗体遺伝子が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図された機能を果たすようにベクターにライゲートされることを意味するように意図されている。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合可能であるように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は別々のベクターに挿入されうるかまたは、より典型的には両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準の方法(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上での相補的制限部位のライゲーションまたは制限部位が全く存在しない場合での平滑末端ライゲーション)により発現ベクターに挿入される。本明細書中に記載の抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用い、それらを、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターに、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに作動可能に連結されかつV_Kセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結されるように挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製可能である。さらにまたはその他として、組換え発現ベクターは、抗体鎖の宿主細胞からの分泌を促進するシグナルペプチドをコードしうる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームに連結されるようにベクターにクローン化されうる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチド(すなわち非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)でありうる。

【0239】

抗体鎖遺伝子に加え、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞内で抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有する。「調節配列」という用語は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御因子(例えばポリアデニル化シグナル)を含むように意図されている。かかる調節配列は、例えばGoeddel(「Gene Expression Technology」Methods in

10

20

30

40

50

Enzymology 185、Academic Press (San Diego、CA) (1990年)に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計が形質転換対象の宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの要素に依存しうることが当業者により理解されるであろう。哺乳類宿主細胞の発現における好ましい調節配列は、哺乳類細胞内で高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルス因子、例えばサイトメガロウイルス (CMV)、サルウイルス40 (SV40)、アデノウイルス (例えばアデノウイルスメジャー後期プロモーター (AdMLP)) およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーを含む。あるいは、非ウイルス調節配列、例えばユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターが用いられる。さらに、異なる供給源由来の配列からなる調節因子、例えばSRプロモーター系は、ヒトT細胞白血病ウイルスタイプ1のSV40初期プロモーターおよび長い末端リピートに由来する配列を有するものである (Takebe, Y.ら (1988年)、Mol. Cell. Biol. 8: 466 - 472頁)。

10

20

30

40

50

【0240】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加え、本開示の組換え発現ベクターは、追加配列、例えば宿主細胞内でのベクターの複製 (例えば複製の起点) を調節する配列および選択可能マーカー遺伝子を保有しうる。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する (例えば、米国特許第4,399,216号明細書、米国特許第4,634,665号明細書および米国特許第5,179,017号明細書 (いずれもAxelらによる) を参照)。例えば典型的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞上で薬物、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートに耐性を与える。好ましい選択可能マーカー遺伝子は、(メトトレキセートの選択/増幅の場合にdhfr-宿主細胞内で用いられる) ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子および (G418の選択用の) ネオ遺伝子を含む。

【0241】

軽鎖および重鎖の発現においては、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターは、標準技術により宿主細胞に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、外因性DNAの原核または真核宿主細胞への導入のための一般に用いられる多種多様な技術、例えば、エレクトロポレーション、カルシウム-リン酸塩の沈降、DEAE-デキストランによる形質移入などを包含するように意図されている。原核または真核宿主細胞のいずれかにおいて本開示の抗体を発現することは理論的に可能であるが、真核細胞内および最も好ましくは哺乳類宿主細胞内での抗体の発現が、かかる真核細胞および特に哺乳類細胞が適切に折り畳まれ免疫学的に活性な抗体を構築し分泌する可能性が原核細胞よりも高いことから最も好ましい。原核生物での抗体遺伝子の発現は、高収量の活性抗体の産生にとって無効であることが報告されている (Boss, M. A. および Wood, C. R. (1985年)、Immunology Today 6: 12 - 13頁)。

【0242】

本開示の組換え抗体を発現するための好ましい哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (例えばR. J. KaufmanおよびP. A. Sharp (1982年) Mol. Biol. 159: 601 - 621頁に記載のように、DHFR選択可能マーカーとともに用いられる、UrlaubおよびChasin (1980年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77: 4216 - 4220頁に記載のdhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。特に、NSO骨髄腫細胞の場合の使用においては、別の好ましい発現系は、国際公開第87/04462号パンフレット、国際公開第89/01036号パンフレットおよび欧州特許第338,841号明細書に開示されるGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞内での抗体の発現またはより好ましくは抗体の宿主細胞が成長される培地への分泌を実現するのに十分な期間、宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、標準のタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。

【0243】

抗体の抗原への結合の特徴づけ

本開示の抗体のCD70への結合については、例えばフローサイトメトリーにより試験可能である。つまり、CD70発現細胞は組織培養フラスコおよび調製された単一の細胞懸濁液から新たに採取される。CD70を発現する細胞懸濁液は、直接にまたはPBS中の1%パラホルムアルデヒドでの固定後に一次抗体で染色される。約100万個の細胞は、0.5%BSAおよび50~200 μ g/mlの一次抗体を含有するPBS中に再懸濁され、氷上で30分間インキュベートされる。細胞は0.1%BSA、0.01%NaN₃を含有するPBSで2回洗浄され、1:100に希釈されFITCと複合されたヤギ-抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA)100 μ l中に再懸濁され、氷上でさらに30分間インキュベートされる。細胞は2回再洗浄され、洗浄用緩衝液0.5ml中に再懸濁され、FACSCaliburフローサイトメーター(Becton-Dickinson、San Jose、CA)上で蛍光染色について分析される。

10

【0244】

あるいは、本開示の抗体のCD70への結合については標準ELISAにより試験可能である。つまり、マイクロタイタープレートは、PBS中0.25 μ g/mlでの精製CD70でコートされ、次いでPBS中の5%ウシ血清アルブミンでブロッキングされる。抗体の希釈物(例えばCD70免疫マウス由来の血漿の希釈物)は各ウェルに添加され、37 $^{\circ}$ Cで1~2時間インキュベートされる。プレートは、PBS/Tweenで洗浄され、次いでアルカリホスファターゼに複合された二次試薬(例えばヒト抗体においてはヤギ-抗ヒトIgG Fcに特異的なポリクローナル試薬)とともに37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートされる。洗浄後、プレートをpNPP基質(1mg/ml)で発色させ、OD405~650で分析される。好ましくは、融合においては最高の力価を示したマウスが用いられることになる。

20

【0245】

上記のELISAアッセイを用い、CD70免疫原との陽性反応性を示すハイブリドーマについてのスクリーニングも可能である。CD70に高い結合活性で結合するハイブリドーマはサブクローン化され、さらに特徴づけられる。-140 $^{\circ}$ Cで保存された5~10バイアルの細胞バンクの作製および抗体精製のため、(ELISAにより)親細胞の反応性を保持する各ハイブリドーマから1つのクローンが選択されうる。

30

【0246】

抗CD70抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマを2リットルのスピナーフラスコ内で成長させ、モノクローナル抗体の精製を行ってもよい。上清を、プロテインA-セファロース(Pharmacia(Piscataway、NJ))を用いる親和性クロマトグラフィー前に濾過し、濃縮してもよい。溶出されたIgGをゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーにより検査し、純度を保証してもよい。緩衝溶液をPBSに交換し、濃度を、1.43消衰係数を用いるOD₂₈₀によって決定してもよい。モノクローナル抗体を一定量に分割し、-80 $^{\circ}$ Cで保存してもよい。

40

【0247】

選択された抗CD70モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するか否かを判定するため、各抗体が市販の試薬(Pierce(Rockford、IL))を用いてビオチン化されうる。未標識のモノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を用いる競合試験が、上記のようなCD70でコートされるELISAプレートを用いて実施可能である。ビオチン化mAbの結合がストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブで検出可能である。あるいは、下記の実施例でさらに記載されるように、競合試験は放射性標識抗体を用いて実施可能であり、非標識競合抗体はスクッチャード分析で検出可能である。

【0248】

精製抗体アイソタイプを判定するため、アイソタイプELISAを特定のアイソタイプ

50

の抗体に対して特異的な試薬を用いて行ってもよい。例えば、ヒトモノクローナル抗体アイソタイプを判定するため、マイクロタイタープレートのウェルを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒト免疫グロブリンで4で一晚コートしてもよい。1% BSAでブロック後、プレートを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と周囲温度で1~2時間反応させる。次いで、ウェルをヒトIgG1またはヒトIgMのいずれかに特異的なアルカリホスファターゼと複合されたプローブと反応させてもよい。プレートを発色させ、上記のように分析する。

【0249】

抗CD70ヒトIgGでは、ウエスタンブロッティングにより、CD70抗原との反応性についてさらに試験してもよい。つまり、CD70に対し、調製し、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ってもよい。電気泳動後、分離された抗原はニトロセルロース膜に移され、10%ウシ胎仔血清でブロックされ、試験対象のモノクローナル抗体でプローブされる。ヒトIgGの結合性を、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基質タブレット(Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo.))を用いて発色させてもよい。

10

【0250】

本開示の抗体の結合特異性はまた、例えばフローサイトメトリーにより抗体のCD70タンパク質を発現する細胞への結合を監視することにより測定可能である。CD70タンパク質を天然に発現する細胞または細胞系、例えば786-O、A498、ACHN、Caki-1、および/またはCaki-2細胞(実施例4および5でさらに記載)の使用が可能であるか、あるいは、CD70が細胞の表面上に発現されるように、細胞系、例えばCHO細胞系に対するCD70をコードする発現ベクターの形質移入が可能である。タグに対する抗体を用いて検出するため、形質移入されたタンパク質は、タグ、例えばmycタグまたはhisタグを好ましくはN末端に含みうる。本開示の抗体のCD70タンパク質への結合については、形質移入細胞を抗体とともにインキュベートし、結合された抗体を検出することにより測定可能である。形質移入されたタンパク質上のタグへの抗体の結合は、陽性対照として用いられうる。

20

【0251】

二重特異性分子

別の態様では、本開示は、本開示の抗CD70抗体またはその断片を含む二重特異性分子を特徴とする。本開示の抗体またはその抗原結合部分が別の機能分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えば別の抗体または受容体のリガンド)に誘導体化または連結され、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子が生成されうる。本開示の抗体が実際に2つ以上の他の機能分子に誘導体化または連結され、3つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子が生成される可能性があり、かかる多重特異性分子は本明細書で用いられる「二重特異性分子」という用語に包含されるようにも意図されている。本開示の二重特異性分子を作製するため、本開示の抗体は、二重特異性分子が生成されるように、1つ以上の他の結合分子、例えば別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣体(binding mimetic)に(例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合またはその他により)機能的に連結されうる。

30

40

【0252】

したがって、本開示は、CD70に対する少なくとも1つの第1の結合特異性および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。本開示の特定の実施形態では、第2の標的エピトープはFc受容体、例えばヒトFcRI(CD64)またはヒトFc受容体(CD89)である。したがって、本開示は、FcRまたはFcRを発現するエフェクター細胞(例えば、単球、マクロファージまたは多形核球細胞(PMN))とCD70を発現する標的細胞の双方に結合可能な二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子は、エフェクター細胞に対するCD70発現細胞を標的にし、かつ、Fc受容体媒介性のエフェクター細胞活性、例えばCD70発現細胞の食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、サイトカイン放出あるいはスーパーオキシ

50

ドアニオンの生成を引き起こす。

【0253】

二重特異性分子が多重特異性である場合の本開示の実施形態では、同分子は、抗Fc結合特異性および抗CD70結合特異性に加え、第3の結合特異性をさらに含む。一実施形態では、第3の結合特異性は、抗促進因子(anti-enhancement factor)(EF)部分、例えば細胞毒性活性に關与する表面タンパク質に結合し、それにより標的細胞に対する免疫応答を高める分子である。「抗促進因子部分」は、所与の分子、例えば抗原または受容体に結合し、それによりFc受容体または標的細胞抗原における結合決定因子の効果の促進をもたらす抗体、機能抗体断片またはリガンドでありうる。「抗促進因子部分」はFc受容体または標的細胞抗原に結合しうる。あるいは、抗促進因子部分は、第1および第2の結合特異性の結合対象である実体とは異なる実体に結合しうる。例えば、抗促進因子部分は、(例えば標的細胞に対する免疫応答の増大をもたらすCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1または他の免疫細胞を介して)細胞毒性T細胞に結合しうる。

10

【0254】

一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、結合特異性として、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb、または一本鎖Fvを含む、少なくとも1つの抗体またはその抗体断片を含む。Ladnerらに交付された米国特許第4,946,778号明細書(その全体は参照により明示的に援用される)に記載のように、抗体は、Fvまたは一本鎖コンストラクトなどの軽鎖または重鎖二量体またはその任意の最小断片でもありうる。

20

【0255】

一実施形態では、Fc受容体に対する結合特異性はモノクローナル抗体により提供され、その結合はヒト免疫グロブリンG(IgG)により遮断されることはない。本明細書で用いられる「IgG受容体」という用語は、染色体1上に位置する8つの鎖遺伝子のいずれかを示す。これらの遺伝子は、3つのFc受容体クラス：FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)にグループ化された全部で12の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードする。好ましい一実施形態では、Fc受容体はヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは72kDaの分子であり、単量体IgGに対して高い親和性を示す(10⁸~10⁹M⁻¹)。

30

【0256】

特定の好ましい抗Fcモノクローナル抗体の産生および特徴づけについては、Fangerらによって、PCT公開、国際公開第88/00052号パンフレットおよび米国特許第4,954,617号明細書において記載されており、それらの教示内容は参照により本明細書中に十分に援用される。これらの抗体は受容体のFc結合部位から離れた部位でFcRI、FcRIIまたはFcRIIIのエピトープに結合することから、それらの結合がIgGの生理的レベルにより実質的に遮断されることはない。本開示で有用な特異的な抗FcRI抗体は、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62およびmAb197である。mAb32を産生するハイブリドーマは、American Type Culture Collection、ATCC登録番号HB9469から入手可能である。他の実施形態では、抗Fc受容体抗体はモノクローナル抗体22のヒト化形態である(H22)。H22抗体の産生および特徴づけについては、Graziano, R.F.ら(1995年)J. Immunol 155(10):4996-5002頁およびPCT公開、国際公開第94/10332号パンフレットに記載されている。H22抗体産生細胞系は、HA022CL1の指定の下でAmerican Type Culture Collectionに寄託されたものであり、登録番号CRL1177を有する。

40

【0257】

さらに他の好ましい実施形態では、Fc受容体に対する結合特異性はヒトIgA受容体、例えばFc受容体(FcRI(CD89))に結合する抗体により提供され、そ

50

の結合は好ましくはヒト免疫グロブリンA (IgA) により遮断されることはない。「IgA受容体」という用語は、染色体19上に位置する1つの遺伝子の遺伝子産物 (FcRI) を含むように意図されている。この遺伝子は、55~110kDaの数種の交互にスプライスされた膜貫通アイソフォームをコードすることが知られている。FcRI (CD89) は、単球/マクロファージ、好酸性および好中性顆粒球上に構成的に発現されるが、非エフェクター細胞集団上に発現されることはない。FcRIは、IgA1およびIgA2の双方に対して中程度の親和性 (約 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) を有し、G-CSFまたはGM-CSFなどのサイトカインへの暴露時に増加する (Morton, H. C. ら (1996年)、Critical Reviews in Immunology 16: 423-440頁)。A3、A59、A62およびA77として同定された4つのFcRIに特異的なモノクローナル抗体は、IgAリガンド結合ドメイン外部のFcRIに結合するものであり、記載がなされている (Monteiro, R. C. ら (1992年)、J. Immunol. 148: 1764頁)。

【0258】

FcRIおよびFcRIは、(1)主に免疫エフェクター細胞、例えば単球、PMN、マクロファージおよび樹状細胞の上で発現され、(2)高レベルで発現され (例えば1細胞当たり5,000-100,000)、(3)細胞毒性活性のメディエーター (例えばADCC、食作用) であり、かつ(4)それらに対して標的とされる、自己抗原を含む抗原の抗原提示の促進を媒介することから、本開示の二重特異性分子において用いられる要因となる好ましい誘発受容体である。

【0259】

ヒトモノクローナル抗体が好ましい一方、本開示の二重特異性分子において用いられる他の抗体がマウス、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体である。

【0260】

本開示の二重特異性分子は、構成要素の結合特異性、例えば抗FcRおよび抗CD70結合特異性を当該技術分野で既知の方法を用いて複合することにより調製されうる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性は、別々にもたらされ、次いで互いに複合されうる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、種々のカップリング剤または架橋剤が共有結合に用いられうる。架橋剤の例として、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート (SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB)、o-フェニレンジマレイミド (oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) が挙げられる (例えば、Karpovskiy ら (1984年) J. Exp. Med. 160: 1686頁; Liu M. A. ら (1985年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648頁を参照)。他の方法として、Paulus (1985年) Behring Ins. Mitt. No. 78: 118-132頁; Brennan ら (1985年) Science 229: 81-83頁およびGlennie ら (1987年) J. Immunol. 139: 2367-2375頁に記載の方法が挙げられる。好ましい複合剤はSATAおよびスルホ-SMCCであり、いずれもPierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手可能である。

【0261】

結合特異性が抗体である場合、それらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して複合されうる。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、複合に先立ち、奇数、好ましくは1つのスルフヒドリル残基を有するように修飾される。

【0262】

あるいは、両方の結合特異性は同じベクター内にコードされ、かつ同じ宿主細胞内で発現され、構築されうる。この方法は、二重特異性分子がmAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂ またはリガンド x Fab 融合タンパク質である場合に特に有用

10

20

30

40

50

である。本開示の二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体および結合決定因子を含む一本鎖分子、または2つの結合決定因子を含む一本鎖二重特異性分子でありうる。二重特異性分子は、少なくとも2つの一本鎖分子を含みうる。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば米国特許第5,260,203号明細書；米国特許第5,455,030号明細書；米国特許第4,881,175号明細書；米国特許第5,132,405号明細書；米国特許第5,091,513号明細書；米国特許第5,476,786号明細書；米国特許第5,013,653号明細書；米国特許第5,258,498号明細書；および米国特許第5,482,858号明細書に記載されており、これら全部は参照により本明細書中に明示的に援用される。

【0263】

二重特異性分子のその特異的な標的に対する結合は、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、バイオアッセイ (例えば成長阻害) またはウエスタンブロットアッセイによって確認されうる。これらの各アッセイでは、一般に、特別な目的のタンパク質 - 抗体複合体の存在が目的の複合体に対して特異的な標識試薬 (例えば抗体) の使用により検出される。例えば、FcR - 抗体複合体は、例えば、抗体 - FcR複合体を認識しかつそれに対して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を用いて検出されうる。あるいは、複合体は種々の他のイムノアッセイのいずれかを用いて検出されうる。例えば、抗体は放射活性物質で標識され、ラジオイムノアッセイ (RIA) で用いられうる (例えば、Weintraub B., 「Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques」、The Endocrine Society、1986年3月 (参照により本明細書中に援用される) を参照)。放射性同位体は、ガンマカウンタまたはシンチレーションカウンタの使用などの手段あるいはオートラジオグラフィーにより検出されうる。

【0264】

リンカー

本発明は、抗体が化学リンカーを介してパートナーに連結された抗体 - パートナー複合体を提供する。一部の実施形態では、リンカーはペプチジルリンカーであり、本明細書中で $(L^4)_p - F - (L^1)_m$ として表される。他のリンカーは、ヒドラジンおよびジスルフィドリンカーを含み、それぞれ本明細書中で $(L^4)_p - H - (L^1)_m$ または $(L^4)_p - J - (L^1)_m$ として表される。本発明は、パートナーに結合されているようなリンカーに加え、本質的に任意の分子種への結合に適する切断可能なリンカーアームも提供する。本発明のリンカーアームの態様は、本明細書中でその治療部分への結合を参照することにより例示される。しかし、リンカーが限定はされないが診断剤、分析剤、生体分子、標的化剤、検出可能な標識などを含む多様な種に結合可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。

【0265】

抗体 - パートナー複合体におけるペプチジルおよび他のリンカーの使用については、米国仮特許出願第60/295,196号明細書；米国仮特許出願第60/295,259号明細書；米国仮特許出願第60/295,342号明細書；米国仮特許出願第60/304,908号明細書；米国仮特許出願第60/572,667号明細書；米国仮特許出願第60/661,174号明細書；米国仮特許出願第60/669,871号明細書；米国仮特許出願第60/720,499号明細書；米国仮特許出願第60/730,804号明細書；および米国仮特許出願第60/735,657号明細書および米国特許出願第10/160,972号明細書；米国特許出願第10/161,234号明細書；米国特許出願第11/134,685号明細書；米国特許出願第11/134,826号明細書、米国特許出願第11/398,854号明細書および米国特許第6,989,452号明細書、ならびにPCT特許出願のPCT/US2006/37793号明細書において記載され、これら全部は参照により本明細書中に援用される。

10

20

30

40

50

【0266】

さらなるリンカーが、米国特許第6,214,345号明細書(Bristol-Myers Squibb)、米国特許出願公開第2003/0096743号明細書および米国特許出願公開第2003/0130189号明細書(いずれもSeattle Geneticsに付与)、de Grootら、J. Med. Chem. 42、5277頁(1999年); de Grootら、J. Org. Chem. 43、3093頁(2000年); de Grootら、J. Med. Chem. 66、8815頁、(2001年); 国際公開第02/083180号パンフレット(Syntarga); Carlら、J. Med. Chem. Lett. 24、479頁、(1981年); Dubowchikら、Bioorg & Med. Chem. Lett. 8、3347頁(1998年); および米国仮特許出願第60/891,028号明細書(2007年2月21日出願)において記載されている。

10

【0267】

一態様では、本発明は、治療剤およびマーカに対する標的化基への結合に有用なリンカーに関する。別の態様では、本発明は、化合物に安定性をもたらすか、そのインビボでの毒性を低減するか、またはそれ以外ではその薬動学、バイオアベイラビリティおよび/または薬力学に好ましい作用をもたらすといったリンカーを提供する。かかる実施形態では、一旦薬剤がその作用部位に送達されると、リンカーが切断され活性薬剤が放出されることが一般に好ましい。したがって、本発明の一実施形態では、本発明のリンカーは、一旦治療剤またはマーカから除去されると(活性化される間など)リンカーの存在の痕跡が全く残らないようにトレスレスである。

20

【0268】

本発明の別の実施形態では、リンカーは、治療作用またはマーカ活性の部位など、標的細胞内またはその近傍の部位でのその切断される能力により特徴づけられる。かかる切断は事実上酵素的でありうる。この特徴は、治療剤またはマーカの全身活性化の低減や、毒性および全身性副作用の低減に役立つ。酵素的切断にとって好ましい切断可能な基は、ペプチド結合、エステル結合、およびジスルフィド結合を含む。他の実施形態では、リンカーはpHに感受性があり、pHの変化を通じて切断される。

【0269】

本発明の重要な態様は、リンカーの切断速度を制御する能力である。速やかに切断されるリンカーが望ましい場合が多い。しかし、一部の実施形態では、より緩やかに切断されるリンカーが好ましい場合がある。例えば、徐放製剤または速やかな放出成分と緩やかな放出成分の双方を有する製剤では、より緩やかに切断されるリンカーを提供することが有用でありうる。国際公開第02/096910号パンフレットは、ヒドラジンリンカーを有する数種の特異的リガンド-薬剤複合体を提供する。しかし、リンカー組成物を要求される環化速度に応じて「調節する(tune)」見込みはなく、リガンドを記載の特定の化合物よりも緩やかな速度で薬剤から切断することが多数の薬剤-リンカー複合体にとって好ましい。それに対し、本発明のヒドラジンリンカーが環化速度の非常に高速から非常に低速までの範囲を備えることにより、所望の環化速度に基づく特定のヒドラジンリンカーの選択が可能になる。

30

40

【0270】

例えば、切断時に単一の5員環を生成するヒドラジンリンカーの場合、非常に高速な環化が得られうる。細胞毒性物質の細胞への標的化送達にとって好ましい環化速度は、切断時にジェミナル(geminal)位置に2つのメチル基を有するリンカーから得られる2つの5員環または単一の6員環のいずれかを生成するヒドラジンリンカーを用いて得られる。gem-ジメチル効果により、ジェミナル位置に2つのメチル基を有しない単一の6員環の場合と比べて環化反応の速度が加速されることが示されている。これは同環内に解放されている株から得られる。しかし時として、置換基は反応速度を高めるのではなく低下させうる。遅延の理由が立体障害に帰着されることが多い。例えば、gemジメチル置換により、ジェミナル炭素がCH₂である場合よりも極めて迅速な環化反応が生じう

50

る。

【0271】

しかし、一部の実施形態ではより緩やかに切断されるリンカーが好ましい場合があることに着目することが重要である。例えば、徐放製剤または速やかな放出および緩やかな放出成分の双方を有する製剤では、より緩やかに切断されるリンカーを提供することが有用でありうる。特定の実施形態では、低速の環化が、切断時にgem-ジメチル置換基を有しない単一の6員環、または単一の7員環を生成するヒドラジンリンカーを用いてなされる。

【0272】

リンカーはまた、治療剤またはマーカーを循環中での分解に対して安定化させるのに役立つ。この特徴は、かかる安定化の結果、結合された治療剤またはマーカーの循環半減期が延長されることから有意な効果をもたらす。リンカーはまた、結合された治療剤またはマーカーの活性を複合体が循環中に比較的良性であるように弱めるのに役立ち、かつ、所望の作用部位での活性化後に望ましい効果を有し、例えば毒性を示す。治療剤複合体においては、リンカーのこの特徴は同剤の治療指数を改善するのに役立つ。

10

【0273】

安定化基は、好ましくは、治療剤またはマーカーのクリアランスおよび代謝を血液中または非標的組織内に存在しうる酵素により制限するように選択され、さらに同剤またはマーカーの細胞への輸送を制限するように選択される。安定化基は、同剤またはマーカーの分解を遮断するのに役立ち、また同剤またはマーカーの他の物理的特性をもたらすように作用しうる。安定化基はまた、同剤またはマーカーの安定性を製剤または非製剤形態のいずれかで保存される間に改善しうる。

20

【0274】

望ましくは、安定化基は、治療剤またはマーカーのヒト血液中、37℃で2時間の保存により試験される場合に同剤またはマーカーを分解から保護するのに役立つ、かつ所与のアッセイ条件下でヒト血液中に存在する酵素により、20%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%未満およびさらにより好ましくは2%未満の同剤またはマーカーの切断をもたらす場合、治療剤またはマーカーの安定化に有用である。

【0275】

本発明は、これらのリンカーを有する複合体にも関する。より詳細には、本発明は疾患の治療、特に癌化学療法に用いられうるプロドラッグの使用に関する。詳細には、本明細書中に記載のリンカーの使用により、類似構造のプロドラッグと比べて、活性の高い特異性、低下した毒性、および血中での改善された安定性を示すプロドラッグが提供される。

30

【0276】

本明細書中に記載の本発明のリンカーは、パートナー分子内部の種々の位置に存在しうる。

【0277】

したがって、インビボ、例えば血流中で、かかる基が欠如した構築物の速度よりも高い速度で切断されることになる、種々の基のいずれかをその鎖の一部として有しうるリンカーが提供される。リンカーアームと治療剤および診断剤との複合体も提供される。リンカーは、治療剤のプロドラッグ類似体を形成しかつ治療剤または診断剤を標的化剤、検出可能な標識、または固体支持体に可逆的に連結するのに有用である。リンカーは、細胞毒素を含む複合体に組み込まれうる。

40

【0278】

抗体へのプロドラッグの結合から、従来 of 細胞毒性薬剤の抗体複合体よりもさらに優れた安全性の利点を得られうる。腫瘍細胞内および血漿を含むいくつかの正常組織内の双方で、プロドラッグの活性化がエステラーゼにより得られうる。ヒトにおける関連のエステラーゼ活性のレベルは、ラットおよび非ヒト霊長類で観察されるレベルに酷似するがマウスで観察されるレベルより低いことが示されている。プロドラッグの活性化はまた、グルクロニダーゼによる切断により得られうる。

50

【0279】

切断可能なペプチド、ヒドラジン、またはジスルフィド基に加え、1つ以上の自己犠牲リンカー (self-immolative linker) 基^{L¹}が場合により細胞毒素と標的化剤の間に導入される。これらのリンカー基はまた、スペーサー基として記述され、少なくとも2つの反応官能基を有しうる。典型的には、スペーサー基の一方の化学官能基が治療剤の化学官能基、例えば細胞毒素に結合する間、スペーサー基の他方の化学官能基は標的化剤または切断可能なリンカーの化学官能基に結合するように用いられる。スペーサー基の化学官能基の例として、ヒドロキシ基、メルカプト基、カルボニル基、カルボキシ基、アミノ基、ケトン基、およびメルカプト基が挙げられる。

【0280】

L¹で表される自己犠牲リンカーは、一般に置換もしくは未置換アルキル基、置換もしくは未置換アリール基、置換もしくは未置換ヘテロアリール基または置換もしくは未置換ヘテロアルキル基である。一実施形態では、アルキルまたはアリール基は1~20個の炭素原子を含みうる。それらはまた、ポリエチレングリコール部分を含みうる。

10

【0281】

典型的なスペーサー基として、例えば、6-アミノヘキサノール、6-メルカプトヘキサノール、10-ヒドロキシデカン酸、グリシンおよび他のアミノ酸、1,6-ヘキサンジオール、 α -アラニン、2-アミノエタノール、システアミン(2-アミノエタンチオール)、5-アミノペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、3-マレイミド安息香酸、フタリド、 β -置換フタリド、カルボニル基、アミナルエステル、核酸、ペプチドなどが挙げられる。

20

【0282】

スペーサーは、さらなる分子量および化学官能基を細胞毒素-標的化剤複合体に導入するのに役立つ。一般に、さらなる分子量および官能基は複合体の血清半減期および他の特性に作用することになる。したがって、スペーサー基の注意深い選択を通じ、ある範囲の血清半減期を有する細胞毒素複合体が生成されうる。

【0283】

薬剤部分の直近に位置するスペーサーは、(L¹)_m(式中、mは0、1、2、3、4、5、および6から選択される整数である)としても示される。複数のL¹スペーサーが存在する場合、同一のまたは異なるスペーサーのいずれかが用いられうる。L¹は任意の自己犠牲的な基でありうる。

30

【0284】

L⁴は好ましくは複合体に同部分を有するリンカーを用いて溶解度の増大または凝集性の低下をもたらすかまたは複合体の加水分解速度を変化させるリンカー部分である。L⁴リンカーは自己犠牲的である必要がない。一実施形態では、L⁴部分は、置換アルキル、未置換アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアルキル、または未置換ヘテロアルキルであり、これらのいずれかが直鎖状、分岐鎖状、または環状でありうる。置換基は、例えば、低級(C₁~C₆)アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノでありうる。特定の実施形態では、L⁴は非環状部分を含む。別の実施形態では、L⁴は任意の正または負に帯電したアミノ酸重合体、例えばポリリジンまたはポリアルギニンを含む。L⁴はポリエチレングリコール部分などの重合体を含みうる。さらに、L⁴リンカーは、例えば重合体成分と小さい化学的成分の双方を含みうる。

40

【0285】

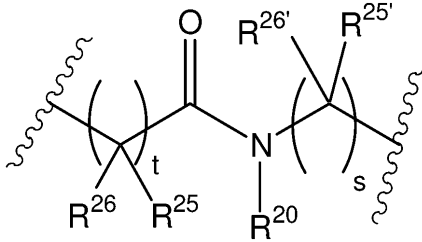
好ましい実施形態では、L⁴はポリエチレングリコール(PEG)部分を含む。L⁴のPEG部分は1~50単位の長さでありうる。好ましくは、PEGは1~12の繰り返し単位、より好ましくは3~12の繰り返し単位、より好ましくは2~6の繰り返し単位、またはさらにより好ましくは3~5の繰り返し単位および最も好ましくは4の繰り返し単位を有することになる。L⁴は、単にPEG部分からなりうるか、あるいはさらなる置換もしくは未置換のアルキルまたはヘテロアルキルも有しうる。PEGとL⁴部分の一部と

50

して結合し、複合体の水溶性を高めることは有用である。さらに、PEG部分は薬剤と抗体との複合の間に生じうる凝集の程度を低下させる。

【0286】

一部の実施形態では、 L^4 は、 $(AA^1)_c$ のN末端に直接結合される、



10

を含む。 R^{20} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} 、および $R^{26'}$ の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから独立して選択され、かつsおよびtは独立して1~6の整数である。好ましくは、 R^{20} 、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ は疎水性である。一部の実施形態では、 R^{20} はHまたはアルキル（好ましくは未置換低級アルキル）である。一部の実施形態では、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ は、独立してHまたはアルキル（好ましくは未置換 $C_1 \sim C_4$ アルキル）である。一部の実施形態では、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ はすべてがHである。一部の実施形態では、tは1でありかつsは1または2である。

20

【0287】

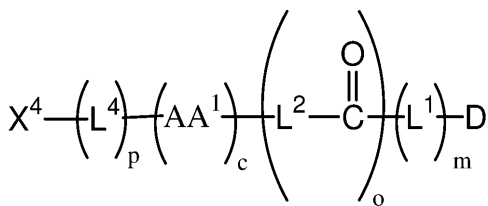
ペプチドリinker (F)

上で考察のように、本発明のペプチジルリンカーは、一般式： $(L^4)_p - F - (L^1)_m$ （式中、Fはペプチジル部分を含むリンカー部分を表す）により表されうる。一実施形態では、F部分は任意の追加の自己犠牲リンカー L^2 およびカルボニル基を含む。別の実施形態では、F部分はアミノ基および任意のスペーサー基 L^3 を含む。

【0288】

したがって、一実施形態では、ペプチジルリンカーを含む複合体は、下記式(a)

30



の構造を含む。

【0289】

この実施形態では、 L^1 は上記のような自己犠牲リンカーであり、かつ、 L^4 は上記のように好ましくは溶解度の増大または凝集特性の低下をもたらすかあるいは加水分解速度を変化させる部分である。 L^2 は自己犠牲リンカーを表す。さらに、mは0、1、2、3、4、5、もしくは6であり、かつoおよびpは独立して0もしくは1である。 AA^1 は1種以上の天然アミノ酸および/または非天然アミノ酸を表し、cは1~20の整数である。一部の実施形態では、cは2~5の範囲内であるかまたは2もしくは3である。

40

【0290】

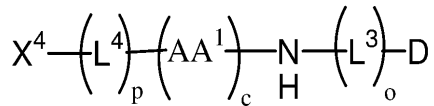
上記式(a)の本発明のペプチドリinkerにおいては、 AA^1 は、そのアミノ末端で、 L^4 に直接連結されるか、または L^4 が不在の場合には X^4 基（すなわち、標的化剤、検出可能な標識、保護反応官能基または非保護反応官能基）に直接連結される。一部の実施形態では、 L^4 が存在する場合、 L^4 は $(AA^1)_c$ のN末端に直接結合されたカルボン酸アシル基を含まない。したがって、これらの実施形態では、米国特許第6,214,3

50

45号明細書に記載のペプチドリinkerにおいて必要であるように、 L^4 または X^4 のいずれかと AA^1 の間に直接カルボン酸アシル単位が必ずしも存在する必要がない。

【0291】

別の実施形態では、ペプチジルリinkerを含む複合体は、式(b)：



の構造を含む。

【0292】

この実施形態では、 L^4 は上記のように、好ましくは溶解度の増大または凝集特性の低下をもたらすかあるいは加水分解速度を変化させる部分であり、 L^3 は第一級もしくは第二級アミンまたはカルボキシル官能基を含むスペーサー基であり、かつ L^3 のアミンがDの懸垂カルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、または L^3 のカルボキシル基がDの懸垂アミン官能基とアミド結合を形成し、かつoおよびpは独立して0または1である。 AA^1 は1種以上の天然アミノ酸および/または非天然アミノ酸を表し、cは1~20の整数である。この実施形態では、 L^1 は存在しない(すなわち一般式中でmは0である)。

10

【0293】

上記式(b)の本発明のペプチドリinkerにおいては、 AA^1 は、そのアミノ末端で、 L^4 に直接連結されるか、または L^4 が不在の場合には X^4 基(すなわち、標的化剤、検出可能な標識、保護反応官能基または非保護反応官能基)に直接連結される。一部の実施形態では、 L^4 が存在する場合、 L^4 は $(AA^1)_c$ のN末端に直接結合されたカルボン酸アシル基を含まない。したがって、これらの実施形態では、米国特許第6,214,345号明細書に記載のペプチドリinkerにおいて必要であるように、 L^4 または X^4 のいずれかと AA^1 の間に直接カルボン酸アシル単位が必ずしも存在する必要がない。

20

【0294】

自己犠牲リinker L^2

自己犠牲リinker L^2 は、2つの距離が離れた化学的部分を共に通常は安定なトリパーテート(tripartate)分子に共有結合可能な二機能の化学的部分であり、それにより酵素切断を用いてトリパーテート分子から前記距離が離れた化学的部分のうちの一方が放たれ、前記酵素切断後、分子の残りから自発的切断が生じ、前記距離が離れた化学的部分の他方が放たれる。本発明によると、自己犠牲スペーサーは、その一方の末端でペプチド部分に共有結合されかつその他方の末端で薬剤部分(その誘導化が薬理学的活性を阻害する)の化学反応性がある部位に共有結合されることで、距離が離れ、ペプチド部分および薬剤部分を共に標的酵素の不在で安定でかつ薬理学的に不活性であるトリパーテート分子に共有結合させるが、それはスペーサー部分およびペプチド部分に共有結合することによりトリパーテート分子からのペプチド部分の放出に作用する結合でかかる標的酵素により酵素的に切断可能である。次いで、かかる酵素切断は、スペーサー部分の自己犠牲的特徴を活性化し、スペーサー部分を薬剤部分に共有結合させることにより薬理活性形態での薬剤の放出に作用する結合の自発切断を開始させることになる。

30

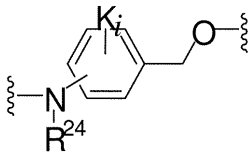
40

【0295】

自己犠牲リinker L^2 は任意の自己犠牲的な基でありうる。好ましくは、 L^2 は、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換および未置換アリール、ならびに置換および未置換ヘテロアリールである。

【0296】

1つの特に好ましい自己犠牲スペーサー L^2 は、式(c)：



で表されうる。

【0297】

アミノベンジル基の芳香環は1つ以上の「K」基で置換されうる。「K」基は、通常では環構造の一部である4つの非置換炭素のうちの1つに結合される水素を置き換える芳香環上の置換基である。「K」基は単一の原子、例えばハロゲンでありうるか、または多重原子群、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、およびシアノでありうる。各Kは、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR^{2 1}R^{2 2}、NR^{2 1}COR^{2 2}、OCOR^{2 1}R^{2 2}、OCOR^{2 1}、およびOR^{2 1}（式中、R^{2 1}およびR^{2 2}は独立してH、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキルおよび未置換ヘテロシクロアルキルからなる群より選択される）からなる群より独立して選択される。典型的なK置換基は、限定はされないが、F、Cl、Br、I、NO₂、OH、OCH₃、NHCOCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCF₃およびメチルを含む。「K_i」においては、iは0、1、2、3、もしくは4の整数である。好ましい一実施形態では、iは0である。

10

20

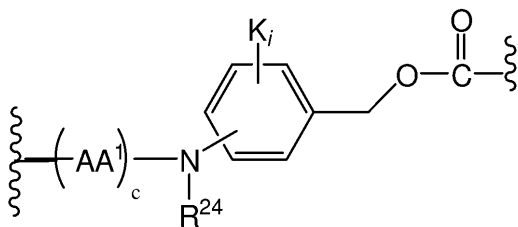
【0298】

上記の構造のエーテル酸素原子はカルボニル基に結合される。NR^{2 4}官能基から芳香環への系統は、アミンの官能基が5個の炭素（いずれも環を形成し、-CH₂-O-基で置換されない）のいずれかに結合されうることを示す。好ましくは、XのNR^{2 4}官能基は-CH₂-O-基に対するパラ配位で芳香環に共有結合される。R^{2 4}は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より選択されるメンバーである。特定の実施形態では、R^{2 4}は水素である。

30

【0299】

一実施形態では、本発明は、上記の式(a)のペプチドリinkerを提供し、ここでFは構造：



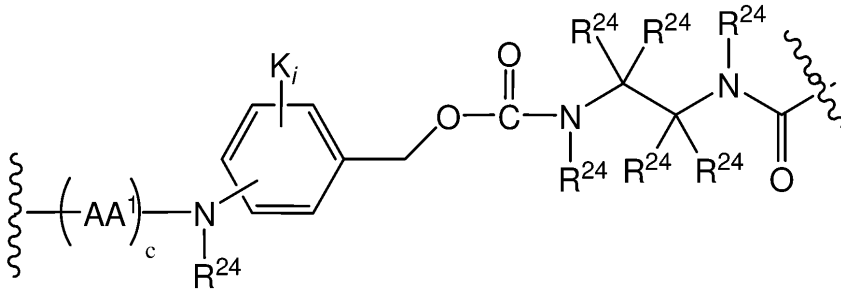
を含み、ここでR^{2 4}は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より選択される)を提供する。各Kは、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR^{2 1}R^{2 2}、NR^{2 1}COR^{2 2}、OCOR^{2 1}R^{2 2}、OCOR^{2 1}、およびOR^{2 1}（式中、R^{2 1}およびR^{2 2}は独立してH、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキルからなる群より選択される）からなる群より独立して選択されるメンバーであり、かつiは0、1、2、3、もしくは4の整数である。

40

【0300】

50

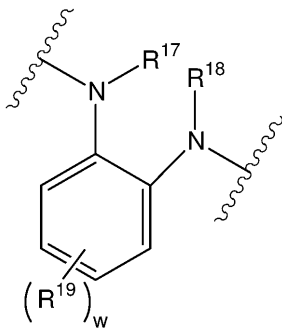
別の実施形態では、上記式 (a) のペプチドリンカーは、構造 :



を含む - F - (L ¹) _m - を含み、ここで各 R ²⁴ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーである。 10

【 0 3 0 1 】

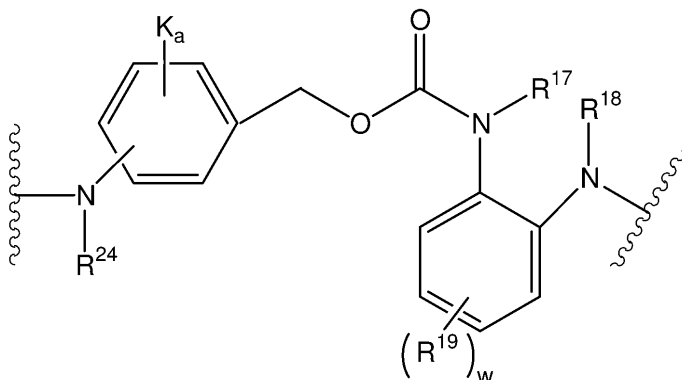
一部の実施形態では、自己犠牲スペーサー L ¹ または L ² は、



を含み、ここで R ¹⁷、R ¹⁸、および R ¹⁹ の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換のヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換アリールから独立して選択され、かつ w は 0 ~ 4 の整数である。一部の実施形態では、R ¹⁷ および R ¹⁸ は独立して H またはアルキル (好ましくは未置換 C ₁ ~ C ₄ アルキル) である。好ましくは、R ¹⁷ および R ¹⁸ は C ₁ ~ C ₄ アルキル、例えばメチルまたはエチルである。一部の実施形態では、w は 0 である。任意の特定の理論に拘束されたくないが、この特定の自己犠牲スペーサーが比較的速やかに環化することが実験的に見出されている。 30

【 0 3 0 2 】

一部の実施形態では、L ¹ または L ² は、



を含む。

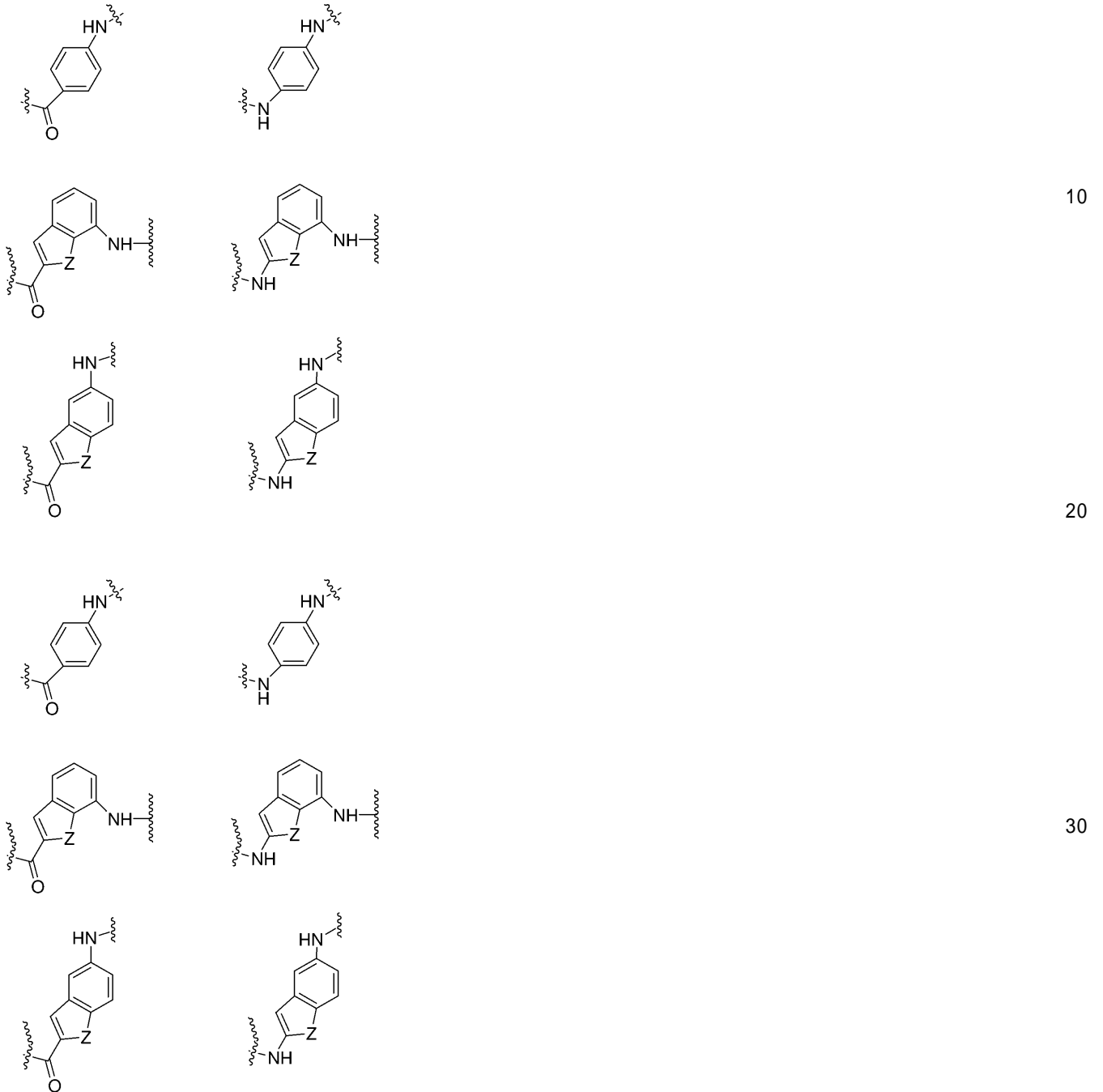
【 0 3 0 3 】

スペーサー基 L ³

スペーサー基 L ³ は第一級もしくは第二級アミンまたはカルボキシル官能基を含むように特徴づけられ、かつ、L ³ 基のアミンが D の懸垂カルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、または L ³ のカルボキシルが D の懸垂アミン官能基とアミド結合を形成する。L ³ は、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、または置換もしくは未置換ヘテ 50

ロシクロアルキルからなる群より選択されうる。好ましい実施形態では、 L^3 は芳香族性基を含む。より好ましくは、 L^3 は安息香酸基、アニリン基またはインドール基を含む。

- L^3 - NH - スペースーとして機能しうる構造の非限定例として、



10

20

30

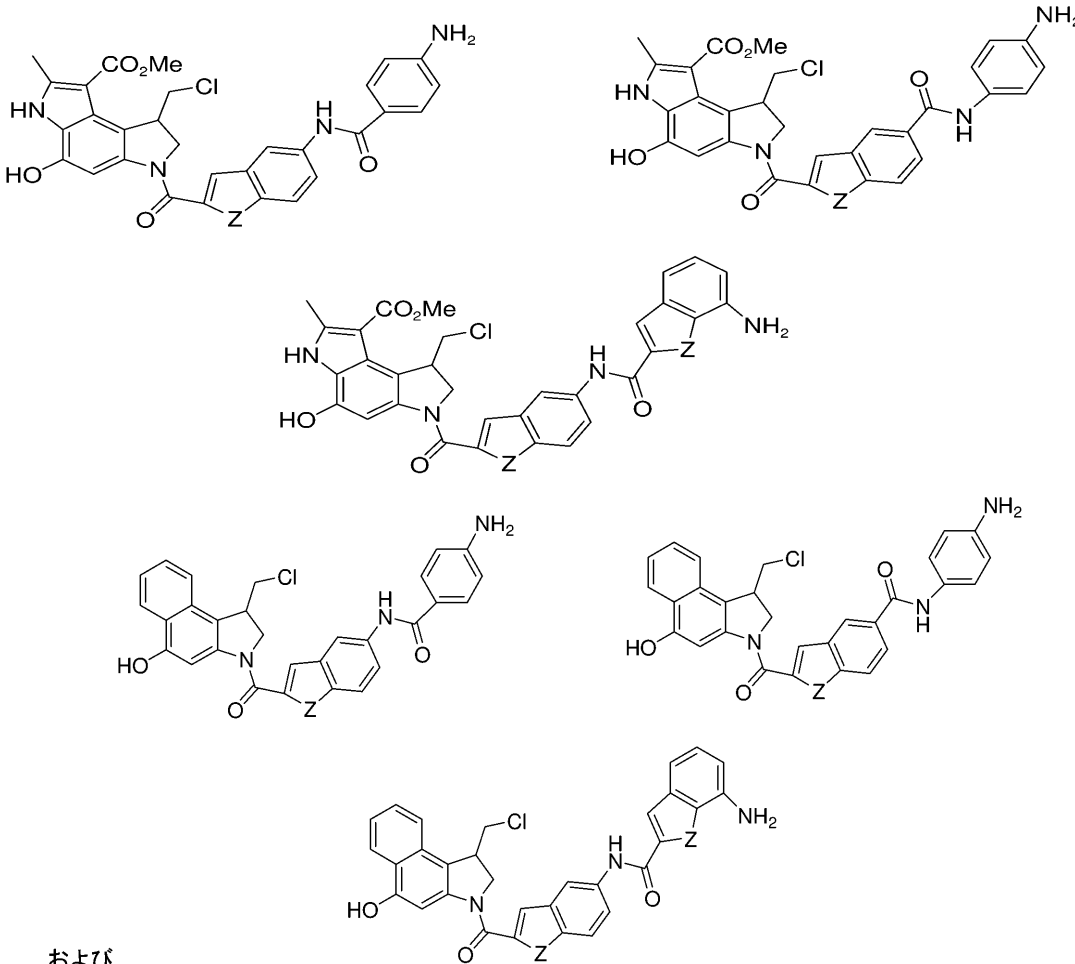
40

といった構造が挙げられ、ここでZはO、SおよびNR^{2 3}から選択されるメンバーであり、かつR^{2 3}は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。

【0304】

L^3 を有する本発明のリンカーの切断時、 L^3 部分は薬剤Dに結合されたままである。したがって、 L^3 部分はDに結合されたその存在がDの活性を有意に変化させないように選択される。別の実施形態では、薬剤D自体の一部が L^3 スペースーとして機能する。例えば、一実施形態では、薬剤Dは薬剤の一部が L^3 スペースーとして機能するデュオカルマイシン誘導体である。かかる実施形態の非限定例として、NH₂ - (L^3) - Dが

50



10

20

および

からなる群より選択される構造を有する場合は挙げられ、ここでZはO、SおよびNR²₃から選択されるメンバーであり、R²₃は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり、かつ各構造上のNH₂基は(AA¹)_cと反応して-(AA¹)_c-NH-を形成する。

30

【0305】

ペプチド配列AA¹

AA¹基は、単一のアミノ酸またはアミド結合により結合された複数のアミノ酸を表す。アミノ酸は天然アミノ酸および/または非天然アミノ酸でありうる。

【0306】

ペプチド配列(AA¹)_cは、機能的に、単一のアミノ酸(c=1の場合)またはアミド結合により互いに結合された複数のアミノ酸のアミド化残基である。本発明のペプチドは、生体系における目的の位置で酵素によるペプチドの酵素触媒化切断を誘導するように選択される。例えば、標的化剤を用いて細胞に標的化されるがその細胞により内在化されない複合体においては、例えばペプチドが細胞外で切断されるように近隣での死滅に向かう細胞の細胞内容物の放出により、細胞外マトリックス内に存在しうる1種以上のプロテアーゼにより切断されるペプチドが選択される。ペプチド内部のアミノ酸の数は1~20個の範囲でありうるが、より好ましくは(AA¹)_cを含む、1~8個のアミノ酸、1~6個のアミノ酸または1、2、3もしくは4個のアミノ酸が存在することになる。特異的酵素により切断されやすいペプチド配列または酵素のクラスは当該技術分野で周知である。

40

【0307】

血清、肝臓、腸管などにおける酵素により切断される多数のペプチド配列は、当該技術分野で既知である。本発明の典型的なペプチド配列は、プロテアーゼにより切断されるペプチド配列を含む。プロテアーゼ感受性配列の使用についてなされる考察の中心は、図示

50

の簡素化を意図したものであり、本発明の範囲を限定することに役立つものではない。

【0308】

ペプチドを切断する酵素がプロテアーゼである場合、リンカーは一般にプロテアーゼに対する切断認識配列を有するペプチドを含む。プロテアーゼに対する切断認識配列は、タンパク質分解切断の間にプロテアーゼにより認識される特定の amino 酸配列である。多数のプロテアーゼ切断部位が当該技術分野で既知であり、これらおよび他の切断部位は、リンカー部分内に含まれる。例えば、Matayoshiら、Science 247: 954頁(1990年); Dunnら、Meth. Enzymol. 241: 254頁(1994年); Seidahら、Meth. Enzymol. 244: 175頁(1994年); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615頁(1994年); Weberら、Meth. Enzymol. 244: 595頁(1994年); Smithら、Meth. Enzymol. 244: 412頁(1994年); Bouvierら、Meth. Enzymol. 248: 614頁(1995年)、Hardyら、in Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease、Mastersら編、190-198頁(1994年)を参照のこと。

10

【0309】

ペプチド配列(AA¹)_cの amino 酸は、腫瘍関連プロテアーゼなどの特定の分子による選択的酵素切断に対するその適合性に基づいて選択される。用いられる amino 酸は天然または非天然 amino 酸でありうる。それらはLまたはD配置でありうる。一実施形態では、少なくとも3種の異なる amino 酸が用いられる。別の実施形態では、2種の amino 酸のみが用いられる。

20

【0310】

好ましい実施形態では、ペプチド配列(AA¹)_cはリソソームプロテアーゼにより切断されるその能力に基づいて選択され、その非限定例としてカテプシンB、C、D、H、LおよびSが挙げられる。好ましくは、ペプチド配列(AA¹)_cはインビトロでカテプシンBにより切断可能であり、それは当該技術分野で既知のインビトロでのプロテアーゼ切断アッセイを用いて試験される。

【0311】

別の実施形態では、ペプチド配列(AA¹)_cは、腫瘍関連プロテアーゼ、例えば腫瘍細胞近傍で細胞外に見出されるプロテアーゼにより切断されるその能力に基づいて選択され、その非限定例として、チメット(thimet)オリゴペプチダーゼ(TOP)およびCD10が挙げられる。ペプチドのTOPまたはCD10により切断される能力は、当該技術分野で既知のインビトロでのプロテアーゼ切断アッセイを用いて試験される。

30

【0312】

本発明の複合体での使用に適するペプチド配列の適例として、限定はされないが、Val-Cit、Cit-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-トシル-Arg、Phe-N⁹-ニトロ-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号77)、-Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号78)、Gly-Phe-Leu-Gly(配列番号79)、Val-Ala、Leu-Leu-Gly-Leu(配列番号91)、Leu-Asn-Ala、ならびにLys-Leu-Valが挙げられる。好ましいペプチド配列はVal-CitおよびVal-Lysである。

40

【0313】

別の実施形態では、薬剤部分の直近に位置する amino 酸は、Ala、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群より選択される。さ

50

らに別の実施形態では、薬剤部分の直近に位置するアミノ酸は、Ala、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群より選択される。

【0314】

プロテアーゼは癌転移に関与している。プロテアーゼウロキナーゼの合成の増大が、多数の癌内での転移能の増強と相関していた。ウロキナーゼは細胞外空間内に偏在するプラスミノゲンからプラスミンを活性化し、その活性化により転移性腫瘍細胞の浸潤を媒介する細胞外マトリックス内でタンパク質の分解が引き起こされうる。プラスミンはまたコラゲナーゼを活性化する故、毛細管およびリンパ系の周囲の基底膜内でのコラーゲンの分解を促進可能であり、それにより腫瘍細胞の標的組織への浸潤が可能になる(Danoら、Adv. Cancer Res., 44:139頁(1985年))。したがって、ウロキナーゼにより切断されるペプチド配列のリンカーとしての使用は本発明の範囲内に含まれる。

10

【0315】

本発明は、トリプターゼによる切断に感受性があるペプチド配列の使用についても提供する。ヒトマスト細胞は、I、II、およびIIIと称される少なくとも4種の異なるトリプターゼを発現する。これらの酵素は血漿プロテアーゼ阻害剤により制御されることがなく、インビトロで数種の生理的基質を切断するだけである。セリンプロテアーゼのトリプターゼファミリーは、マスト細胞を含む種々のアレルギー性および炎症性疾患に関与しており、その理由はこれらの障害を有する患者由来の体液中で見出されるトリプターゼレベルの上昇にある。しかし、疾患の病態生理におけるトリプターゼの正確な役割はいまだに明らかにされていない。トリプターゼの生物学的機能および対応する生理学的結果の範囲は、それらの基質特異性により実質的に画定される。

20

【0316】

トリプターゼは、腫瘍転移および浸潤に関連したプロテアーゼのチモーゲン形態であるプロウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)の強力な活性化因子である。細胞溢出および移動において細胞外マトリックスの破壊をまねくプラスミノゲンカスケードの活性化は、Pro-Arg-Phe-LysのP4~P1配列(配列番号80)のプロウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子のトリプターゼ活性化の機能でありうる(Stackら、Journal of Biological Chemistry 269(13):9416-9419頁(1994年))。血管透過性の調節に関する神経ペプチドVIP(血管作動性腸管ペプチド)もまた主にThr-Arg-Leu-Arg(配列番号81)配列でトリプターゼにより切断される(Tamら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3:27-32頁(1990年))。Gタンパク質共役受容体PAR-2をSer-Lys-Gly-Arg(配列番号82)配列でトリプターゼにより切断し活性化することで、線維芽細胞の増殖が促進されうる一方、トロンピン活性化受容体PAR-1がPro-Asn-Asp-Lys(配列番号83)配列でトリプターゼにより不活性化される(Molinoら、Journal of Biological Chemistry 272(7):4043-4049頁(1997年))。総合すれば、このエビデンスは、トリプターゼにおける疾患の結果としての組織リモデリングでの中心的役割を示唆する。これはいくつかのマスト細胞媒介性の障害において観察される重大な変化に合致する。慢性喘息および他の長期の呼吸器疾患の1つの特徴は、その生理的標的のトリプターゼ活性化の結果でありうる下層組織の線維化および肥厚である。同様に、血管新生が種々の癌におけるマスト細胞密度、トリプターゼ活性および予後不良に関連することを一連の報告が示している(Coussensら、Gene and Development 13(11):1382-97頁(1999年)); Takamiら、Cancer 88(12):2686-92頁(2000年); Toth-Jakaticsら、Human Pathology 31(8):955-960頁(2000年); Ribattiら、International Journal of Cancer 85(2):171-5頁(2000年))。

30

40

50

【0317】

特定のプロテアーゼが選択されたペプチド配列を切断するか否かを評価するための方法は当該技術分野で既知である。例えば、7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)蛍光発生ペプチド基質の使用は、プロテアーゼ特異性を測定するための十分に確立された方法である(Zimmerman M.ら(1977年)Analytical Biochemistry 78:47-51頁)。アニリド結合の特異的切断により蛍光発生AMC脱離基が遊離し、各基質における切断速度の簡易な測定が可能になる。より最近では、AMCペプチド基質ライブラリのアレイ(Lee D.ら(1999年)Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1667-72頁)および位置走査ライブラリ(Rano T.A.ら(1997年)Chemistry and Biology 4:149-55頁)を用い、単一の実験での広範囲の基質のサンプリングによるプロテアーゼのN末端特異性の迅速なプロファイリングが行われている。したがって、当業者は、過度の実験に依存することなく、ペプチド配列のアレイを評価し、本発明におけるその有用性を判定することが容易にできる。

10

【0318】

本発明の抗体-パートナー複合体は、場合により2種以上のリンカーを有しうる。これらのリンカーは同じかまたは異なる場合がある。例えば、ペプチジルリンカーを用いて薬剤のリガンドへの連結が可能であり、第2のペプチジルリンカーにより診断剤の複合体への結合が可能である。追加のリンカーにおける他の使用として、分析剤、生体分子、標的化剤、および検出可能な標識の抗体-パートナー複合体への連結が含まれる。

20

【0319】

また、例えば本発明の化合物の二量体、三量体、四量体およびより高級な相同体またはそれらの反応類似体などの種を含む多価種である本発明の化合物は、本発明の範囲内に含まれる。多価種は、本発明の単一種または2種以上の種から構築可能である。例えば、二量体構築物は「ホモ二量体」または「ヘテロ二量体」でありうる。さらに、本発明の化合物またはその反応類似体がオリゴマーまたはポリマーフレームワーク(例えばポリリジン、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプンなど)に結合された多価構築物は本発明の範囲内に含まれる。フレームワークは、好ましくは多官能性である(すなわち本発明の化合物に結合するための一連の反応部位を有する)。さらに、フレームワークは、本発明の単一種または本発明の2種以上の種で誘導体化されうる。

30

【0320】

さらに、本発明は、類似官能基でない類似化合物よりも高い水溶性を有する化合物が得られる官能化された化合物を含む。したがって、本明細書中に示される置換基のいずれかが水溶性を高めている類似基と置換されうる。例えば、水酸基をジオールまたは第4級アミン、ヒドロキシアミンもしくは類似の水溶性がより高い部分を有するアミンと置換することは本発明の範囲内に含まれる。好ましい実施形態では、さらなる水溶性が、本明細書中に示される化合物のイオンチャネルに対する活性にとって本質的でない部位での、親化合物の水溶性を高める部分との置換により与えられる。有機化合物の水溶性を高める方法は当該技術分野で既知である。かかる方法は、限定はされないが、常に帯電した部分、例えば第4級アンモニウムまたは生理学的関連pHで帯電した基、例えばカルボン酸、アミンで有機核を官能化する工程を含む。他の方法は、有機核にヒドロキシルまたはアミンを有する基、例えばアルコール、ポリオール、ポリエーテルなどを付加する工程を含む。代表例は、限定はされないが、ポリリジン、ポリエチレンジアミン、ポリ(エチレングリコール)およびポリ(プロピレングリコール)を含む。これらの化合物に適する官能化の化学反応および戦略は当該技術分野で既知である。例えば、Dunn R.L.ら編、「POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series 第469巻」、ワシントンD.C.(Washington, D.C.)のAmerican Chemical Society、1991年を参照のこと。

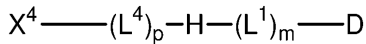
40

【0321】

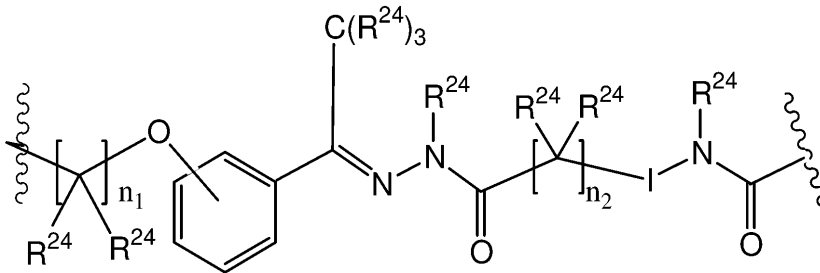
50

ヒドラジンリンカー（H）

第2の実施形態では、本発明の複合体はヒドラジン自己犠牲リンカーを含み、ここで複合体は構造：

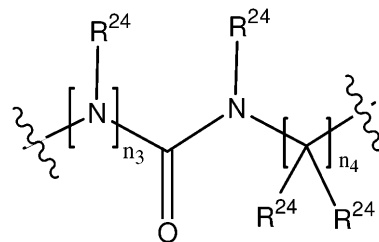


を有し、ここで、D、 L^1 、 L^4 、および X^4 は上で定義された通りであり、かつ本明細書中にさらに記載され、かつHは構造



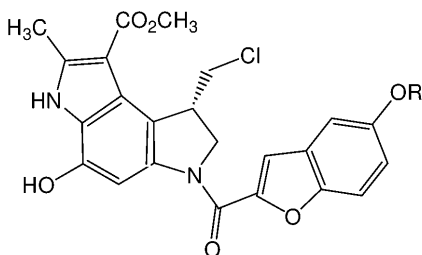
10

を含むリンカーであり、ここで、 n_1 は1~10の整数であり、 n_2 は0、1、もしくは2であり、各 R^{24} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーであり、かつIは結合（すなわち骨格の炭素と隣接窒素の間の結合）かまたは



20

のいずれかであり、ここで、 n_3 が0である場合、 n_2 が0でないという条件で n_3 は0もしくは1であり、かつ n_4 は1、2、もしくは3であり、ここでIが結合である場合、 n_1 は3でありかつ n_2 は1であり、Dは



30

である可能性がなく、ここで、RはMeまたは $CH_2-CH_2-NMe_2$ である。

【0322】

一実施形態では、フェニル環上での置換はパラ置換である。好ましい実施形態では、 n_1 は2、3、もしくは4であるかまたは n_1 は3である。好ましい実施形態では、 n_2 は1である。好ましい実施形態では、Iは結合（すなわち骨格の炭素と隣接窒素の間の結合）である。一態様では、ヒドラジンリンカーHは、例えば n_3 が0かつ n_4 が2である場合、切断時に6員の自己犠牲リンカーを形成しうる。別の態様では、ヒドラジンリンカーHは切断時に2つの5員の自己犠牲リンカーを形成しうる。さらに他の態様では、切断時、Hは5員の自己犠牲リンカーを形成するか、Hは7員の自己犠牲リンカーを形成するか、またはHは5員の自己犠牲リンカーおよび6員の自己犠牲リンカーを形成する。切断の速度は、切断時に形成される環の大きさに影響される。したがって、望まれる切断の速度に依存して切断時に形成されるべき適切な大きさの環が選択されうる。

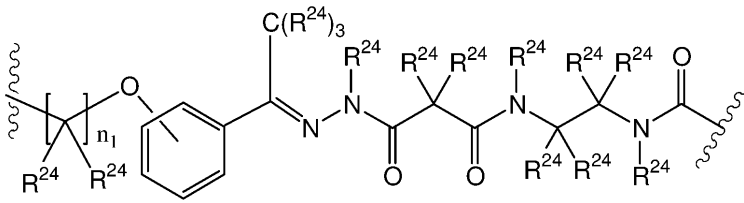
40

【0323】

5員のヒドラジンリンカー

50

一実施形態では、ヒドラジンリンカーは5員のヒドラジンリンカーを含み、ここでHは構造



を含む。

【0324】

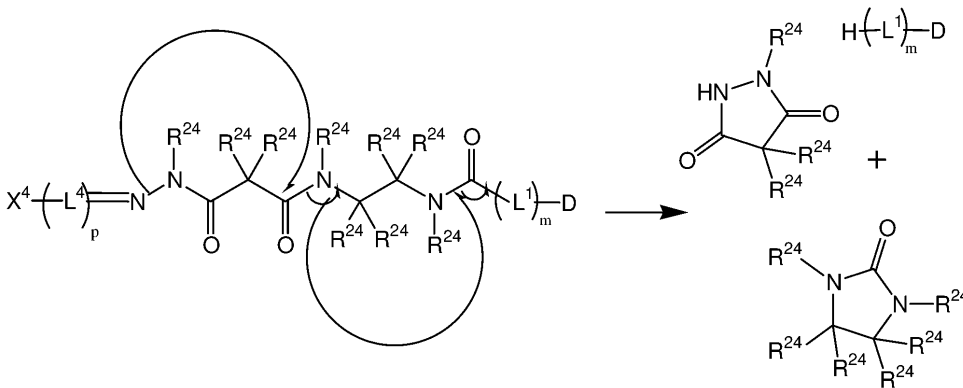
好ましい実施形態では、 n_1 は2、3、もしくは4である。別の好ましい実施形態では、 n_1 は3である。

【0325】

上記の構造では、各 R^{24} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーである。一実施形態では、各 R^{24} はHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。別の実施形態では、各 R^{24} は独立してHまたは $C_1 \sim C_3$ アルキル、より好ましくはHまたは CH_3 である。別の実施形態では、少なくとも1つの R^{24} はメチル基である。別の実施形態では、各 R^{24} はHである。各 R^{24} は、化合物の立体効果を調整しかつ溶解度を変化させるように選択される。

【0326】

5員のヒドラジンリンカーは、薬剤をリンカーから分離する1つ以上の環化反応を受け、例えば



で記述されうる。

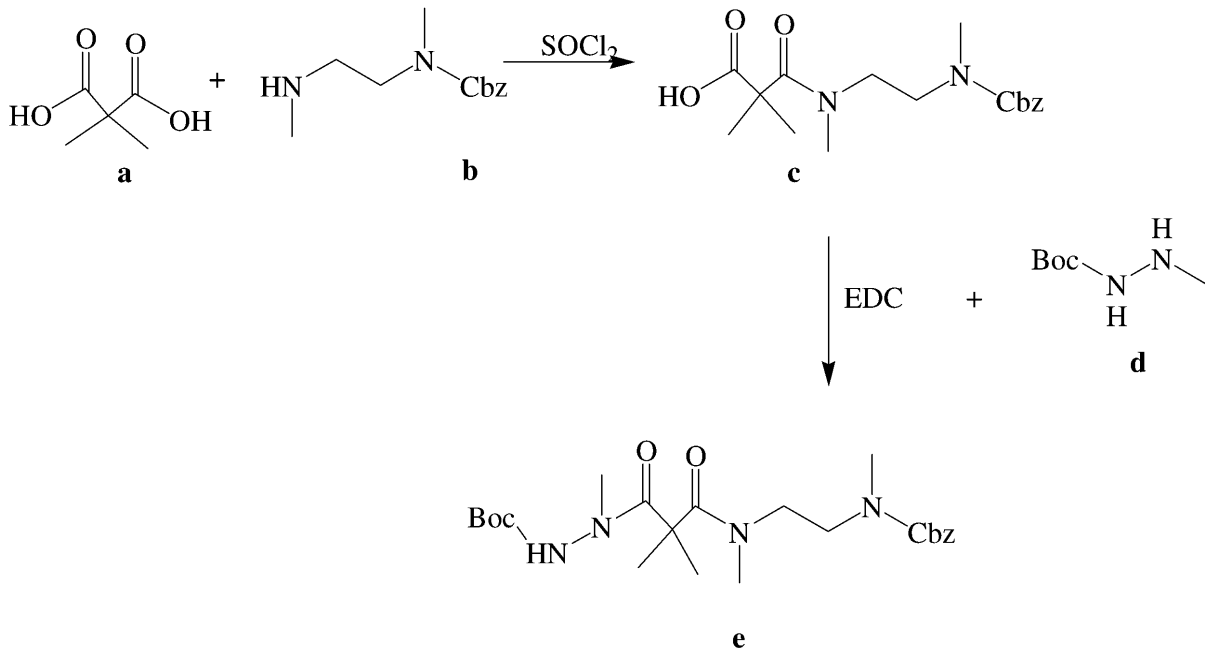
【0327】

本発明の5員のリンカーを調製するための典型的な合成経路は、

10

20

30



10

である。

【0328】

20

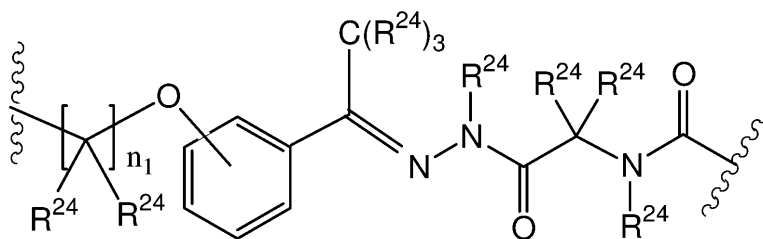
Cbzで保護されたDMDA bは塩化チオニルを含有する溶液中の2,2-ジメチル-マロン酸aと反応し、Cbz-DMDA-2,2-ジメチルマロン酸cが形成される。化合物cはEDCの存在下でBoc-N-メチルヒドラジンdと反応し、DMDA-2,2-ジメチルマロニック(dimethylmalonic)-Boc-N-メチルヒドラジンeが形成される。

【0329】

6員のヒドラジンリンカー

別の実施形態では、ヒドラジンリンカーは6員のヒドラジンリンカーを含み、ここでHは構造：

30

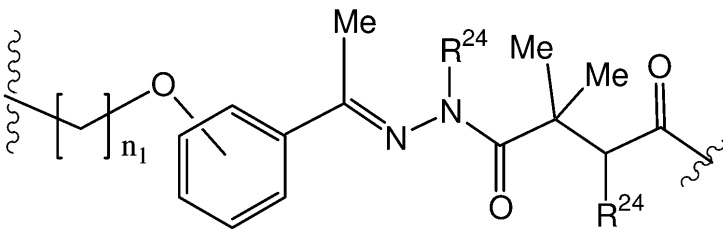


を含む。

【0330】

40

好ましい実施形態では、 n_1 は3である。上記構造では、各 R^{24} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーである。一実施形態では、各 R^{24} は独立してHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。別の実施形態では、各 R^{24} は独立してHまたは $C_1 \sim C_3$ アルキル、より好ましくはHまたは CH_3 である。別の実施形態では、少なくとも1つの R^{24} はメチル基である。別の実施形態では、各 R^{24} はHである。各 R^{24} は、化合物の立体効果を調整しかつ溶解度を変化させるように選択される。好ましい実施形態では、Hは構造：



を含む。

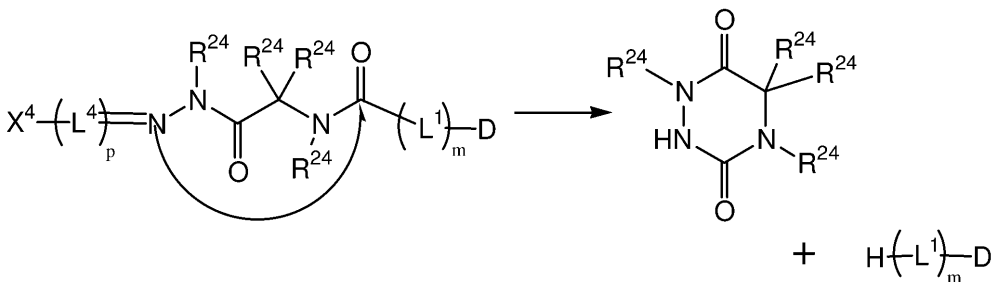
【0331】

一実施形態では、Hはジェミナルジメチル置換を含む。上記構造の一実施形態では、各R²⁴は独立してHまたは置換もしくは未置換アルキルである。

10

【0332】

6員のヒドラジンリンカーは薬剤をリンカーから分離する環化反応を受けることになり、

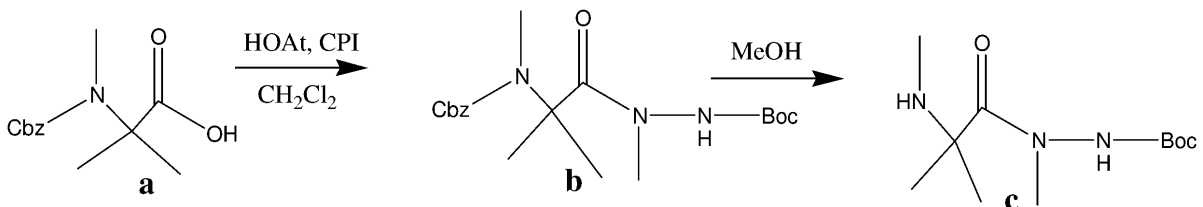


20

のように記述されうる。

【0333】

本発明の6員のリンカーを調製するための典型的な合成経路は、



30

である。

【0334】

ジクロロメタンを含有する溶液中のCbzで保護されたジメチルアラニンaはHOAtおよびCPIと反応し、Cbzで保護されたジメチルアラニンヒドラジンbが形成された。ヒドラジンbはメタノールの作用により脱保護され、化合物cが形成される。

【0335】

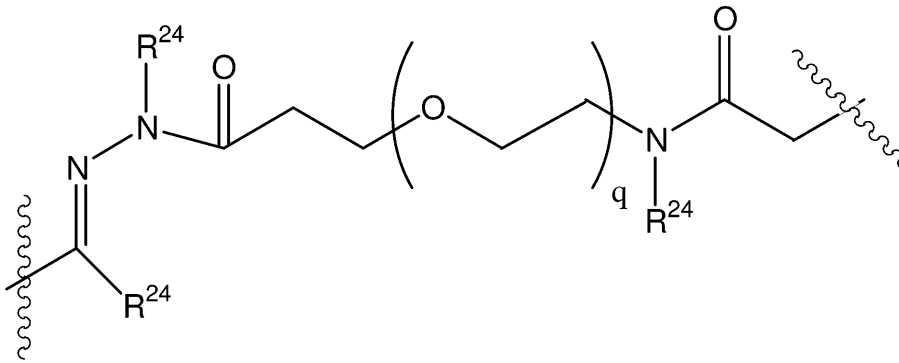
他のヒドラジンリンカー

本発明が7員を有するリンカーを含む点が検討される。このリンカーであれば5員または6員のリンカーと同程度に速やかに環化しない可能性が高いことになるが、これは一部の抗体-パートナー複合体にとって好ましい場合がある。同様に、ヒドラジンリンカーは2つの6員環を含むか、またはヒドラジンリンカーは1つの6員および1つの5員の環化生成物を有しうる。5員および7員のリンカーならびに6員および7員のリンカーについても検討される。

40

【0336】

別のヒドラジン構造Hは、式



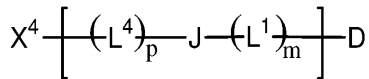
10

を有し、ここで、 q は0、1、2、3、4、5、もしくは6であり、かつ各 R^{24} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーである。このヒドラジン構造は5員環、6員環、または7員環も形成し、追加成分の添加によって複数の環が形成される可能性がある。

【0337】

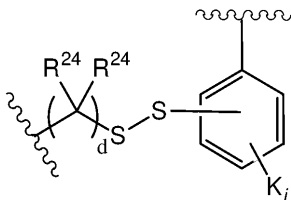
ジスルフィドリンカー（J）

さらに別の実施形態では、リンカーは酵素的に切断可能なジスルフィド基を含む。一実施形態では、本発明は、式（d）：



20

による構造を有する細胞毒性抗体 - パートナー化合物を提供し、ここで、 D 、 L^1 、 L^4 、および X^4 は上で定義された通りであり、かつ本明細書中にさらに記載され、かつJは構造：



30

を有する基を含むジスルフィドリンカーであり、ここで、各 R^{24} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および未置換ヘテロアルキルからなる群より独立して選択されるメンバーであり；各 K_i は、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{21}R^{22}$ 、 $NR^{21}COR^{22}$ 、 $OCOR^{21}R^{22}$ 、 $OCOR^{21}$ 、および OR^{21} （式中、 R^{21} および R^{22} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキルおよび未置換ヘテロシクロアルキルからなる群より独立して選択される）からなる群より独立して選択されるメンバーであり； i は0、1、2、3、もしくは4の整数であり；ならびに d は0、1、2、3、4、5、もしくは6の整数である。

40

【0338】

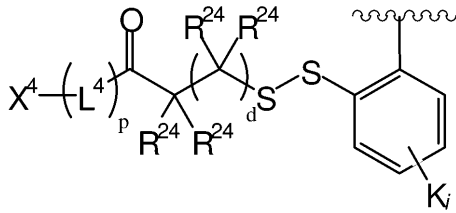
ジスルフィドリンカーの芳香環は1つ以上の「 K 」基と置換されうる。「 K 」基は、通常では環構造の一部である4つの非置換炭素のうちの1つに結合される水素を置換する芳香環上の置換基である。「 K 」基は、単一原子、例えばハロゲンでありうるか、または多原子基、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、およびシアノでありうる。典型的な K 置換基は、限定はされないが、F、Cl、Br、I、 NO_2 、OH、 OCH_3 、 $NHCOCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $NHCOCF_3$ およびメチルを独立して含む。「 K_i 」においては、 i は0、1、2、3、もしくは

50

は4の整数である。特定の実施形態では、 i は0である。

【0339】

好ましい実施形態では、リンカーは、式：



の、酵素的に切断可能なジスルフィド基を含む。

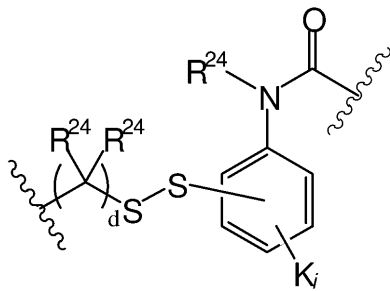
10

【0340】

この実施形態では、 L^4 、 X^4 、 p 、および R^{24} の属性は上で定義された通りであり、かつ d は0、1、2、3、4、5、もしくは6である。特定の実施形態では、 d は1または2である。

【0341】

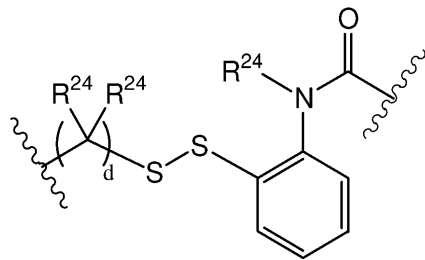
より特異的なジスルフィドリンカーは下記の式で示される。



20

【0342】

この実施形態の具体例は以下の通りである。



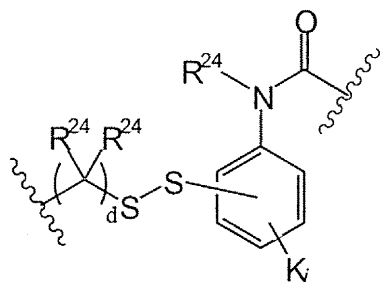
30

【0343】

好ましくは、 d は1もしくは2である。

【0344】

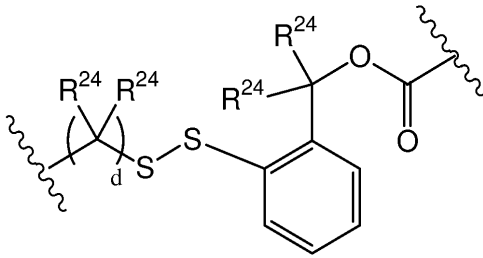
別のジスルフィドリンカーは下記の式で示される。



40

【0345】

この実施形態の具体例は以下の通りである。



【0346】

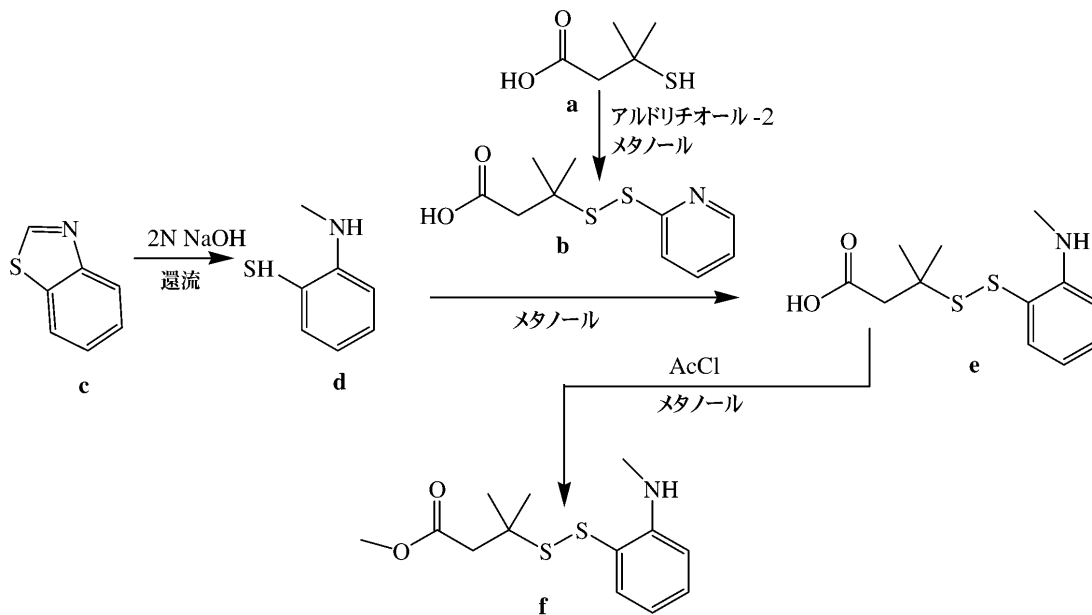
好ましくは、dは1または2である。

【0347】

様々な実施形態では、ジスルフィドはアミンに対してオルトである。別の特定の実施形態では、aは0である。好ましい実施形態では、 R^{24} はHおよび CH_3 から独立して選択される。

【0348】

本発明のジスルフィドリンカーを調製するための典型的な合成経路は以下の通りである。



【0349】

3-メルカプトプロピオン酸aの溶液はアルドリチオール-2と反応し、3-メチルベンゾチアゾリウムヨードbが形成される。3-メチルベンゾチアゾリウムヨードcは水酸化ナトリウムと反応し、化合物dが形成される。メタノールを含有する化合物dの溶液はさらに化合物bと反応し、化合物eが形成される。化合物eは塩化アセチルおよびメタノールの作用により脱保護され、化合物fが形成される。

【0350】

数種の細胞毒素、リンカーおよび治療剤を抗体に複合させるための他の方法についてのさらなる考察として、Gangwarらに交付され、「Cytotoxic Compounds And Conjugates」という表題のPCT公開の国際公開第2007/059404号パンフレット、Saito G.ら(2003年)Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215頁; Trail P.A.ら(2003年)Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337頁; Payne G.(2003年)Cancer Cell 3:207-212頁; Allen T.M.(2002年)Nat. Rev. Cancer 2:750-763頁; Pastan I.およびKreitman R.J.(2002年)Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091頁; Senter P.D.およびSpringer C.J.(2001年)Adv. Drug Deliv. R

10

20

30

40

50

ev. 53: 247-264頁(これら各々はそれら全体が参照により本明細書中に援用される)も参照のこと。

【0351】

パートナー分子

本発明は、パートナー分子、例えば細胞毒素、薬剤(例えば免疫抑制剤)または放射性毒素に複合された抗体を特徴とする。かかる複合体は、本明細書中で「免疫複合体」とも称される。1種以上の細胞毒素を含有する免疫複合体は「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞毒性物質は、細胞に対して有害な(例えば死滅させる)任意の作用物質を含む。

【0352】

本発明のパートナー分子の例として、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらの類似体または相同体が挙げられる。パートナー分子の例として、例えば、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシスジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(元はダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(元はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン)も挙げられる。

【0353】

本発明の抗体に複合可能なパートナー分子の他の好ましい例として、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシンおよびアウリスタチン、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体複合体の例は市販されている(Mylotag(登録商標); American Home Products)。

【0354】

パートナー分子の好ましい例として、CC-1065およびデュオカルマイシンが挙げられる。CC-1065は、Upjohn Companyにより1981年にストレプトマイセス・ゼレンシス(*Streptomyces zelensis*)から最初に単離され(Hankarら、*J. Antibiot.* 31: 1211頁(1978年); Martinら、*J. Antibiot.* 33: 902頁(1980年); Martinら、*J. Antibiot.* 34: 1119頁(1981年))、インビトロおよび実験動物の双方で強力な抗腫瘍および抗菌活性を有することが見出された(Liraら、*Cancer Res.* 42: 999頁(1982年))。CC-1065は、好ましくは5'-d(A/GNTTA)-3'および5'-d(AAAAA)-3'の配列を有するマイナーグループ内の二本鎖B-DNAに結合し(Swensonら、*Cancer Res.* 42: 2821頁(1982年))、3'-アデニンのN3位を分子内に存在するそのCPIの左側ユニットによりアルキル化する(Hurleyら、*Science* 226: 843頁(1984年))。CC-1065は、その強力かつ広範な抗腫瘍活性に反し、実験動物において遅発性死亡を引き起こすことからヒトでは使用できない。

【0355】

CC-1065およびデュオカルマイシンの多数の類似体および誘導体は当該技術分野で既知である。多数の化合物の構造、合成および特性の研究についてのレビューがなされている。例えば、Bogerら、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35

10

20

30

40

50

: 1438頁(1996年)およびBogerら、Chem. Rev. 97:787頁(1997年)を参照のこと。

【0356】

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.のあるグループが多数のCC-1065誘導体を調製している。例えば、米国特許第5,101,038号明細書;米国特許第5,641,780号明細書;米国特許第5,187,186号明細書;米国特許第5,070,092号明細書;米国特許第5,703,080号明細書;米国特許第5,070,092号明細書;米国特許第5,641,780号明細書;米国特許第5,101,038号明細書および米国特許第5,084,468号明細書、ならびにPCT出願の国際公開第96/10405号パンフレットおよび欧州特許出願公開第0537575A1号明細書を参照のこと。

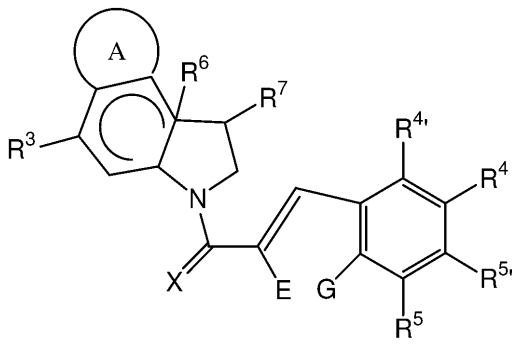
10

【0357】

Upjohn Company (Pharmacia Upjohn)はまた、CC-1065の誘導体の調製に積極的に取り組んでいる。例えば、米国特許第5,739,350号明細書;米国特許第4,978,757号明細書、米国特許第5,332,837号明細書および米国特許第4,912,227号明細書を参照のこと。

【0358】

本発明の特に好ましい態様は、式(e)：



20

による構造を有する細胞毒性化合物を提供し、ここで環系Aは、置換もしくは未置換アリール置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーである。典型的な環系はフェニルおよびピロールを含む。

30

【0359】

記号EおよびGは、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、ヘテロ原子、単結合から独立して選択されるか、またはEおよびGは、場合により結合し、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系が形成される。

【0360】

記号Xは、O、SおよびNR^{2 3}から選択されるメンバーを表す。R^{2 3}は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーである。

【0361】

記号R³は、(=O)、SR^{1 1}、NHR^{1 1}およびOR^{1 1}から選択されるメンバーを表し、ここでR^{1 1}は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホン酸塩、アシル、C(O)R^{1 2}R^{1 3}、C(O)OR^{1 2}、C(O)NR^{1 2}R^{1 3}、P(O)(OR^{1 2})₂、C(O)CHR^{1 2}R^{1 3}、SR^{1 2}またはSiR^{1 2}R^{1 3}R^{1 4}である。記号R^{1 2}、R^{1 3}、およびR^{1 4}は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換アリールを独立して表し、ここでR^{1 2}およびR^{1 3}は、それらの結合対象である窒素または炭素原子とともに場合により結合し、4~6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成される。R^{1 2}、R^{1 3}、またはR^{1 4}のうちの1つ以上は

40

50

、その構造内部に切断可能な基を含みうる。

【0362】

R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NC(O)R^{15}$ 、 $OC(O)NR^{15}$ 、 R^{16} 、 $OC(O)OR^{15}$ 、 $C(O)R^{15}$ 、 SR^{15} 、 OR^{15} 、 $CR^{15} = NR^{16}$ 、および $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ (式中、 n は 1 ~ 20 の整数である) から独立して選択されるメンバーであるか、または R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ の任意の隣接対は、それらの結合対象の炭素原子とともに結合し、4 ~ 6 員を有する置換もしくは未置換シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル環系が形成される。 R^{15} および R^{16} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルおよび置換もしくは未置換ペプチジルを独立して表し、ここで R^{15} および R^{16} は、それらの結合対象の窒素原子とともに場合により結合し、4 ~ 6 員を有し、場合により 2 つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成される。1 つの典型的な構造がアニリンである。

10

【0363】

R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} および R^{16} は、場合によりそれらの構造内部に 1 つ以上の切断可能な基、例えば切断可能なリンカーまたは切断可能な基質を有する。典型的な切断可能な基は、限定はされないが、ペプチド、アミノ酸、ヒドラジン、ジスルフィド、およびセファロスポリン誘導体を含む。

20

【0364】

一部の実施形態では、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} および R^{16} の少なくとも 1 つを用い、本明細書中に記載のように、薬剤が本発明のリンカーまたは酵素切断可能な基質、例えば L^1 (存在する場合) または F、H、J、もしくは X^2 、または J に結合される。

【0365】

さらなる典型的な実施形態では、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} および R^{16} の少なくとも 1 つは化合物への複合に適する反応基を担持する。さらなる典型的な実施形態では、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} および R^{16} は、H、置換アルキルおよび置換ヘテロアルキルから独立して選択され、かつアルキルまたはヘテロアルキル部分の遊離末端に反応官能基を有する。 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} および R^{16} のうちの 1 つ以上は、別種、例えば標的化剤、検出可能な標識、固体支持体などに複合されうる。

30

【0366】

R^6 は、存在するかまたは存在しない単結合である。 R^6 が存在する場合、 R^6 および R^7 は結合し、シクロプロピル環が形成される。 R^7 は $CH_2 - X^1$ もしくは $-CH_2 -$ である。 R^7 が $-CH_2 -$ である場合、それはシクロプロパン環の成分である。記号 X^1 は、ハロゲン、例えば Cl、Br もしくは F などの脱離基を表す。 R^6 および R^7 の結合は、化学価の原理に反しないように解釈される。

40

【0367】

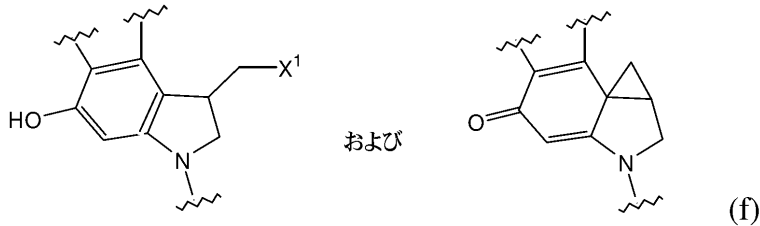
X^1 は任意の脱離基でありうる。有用な脱離基は、限定はされないが、ハロゲン、アジド、スルホン酸エステル (例えばアルキルスルホニル、アリールスルホニル)、オキシニウムイオン、アルキル過塩素酸塩、アンモニオアルカンスルホン酸エステル、アルキルフルオロスルホン酸塩およびフッ素化物 (例えばトリフレート、ノナフレート、トレシレート) などを含む。脱離基として有用な特定のハロゲンは、F、Cl および Br である。特定の一連の反応条件に適するこれらおよび他の脱離基の選択は当業者の能力の範囲内である (例えば、March J.、*Advanced Organic Chemistry*、第 2 版、John Wiley and Sons、1992 年; Sandler SR、Karo W、*Organic Functional Group Pr*

50

eparations」、第2版、Academic Press, Inc., 1983年; およびWade LG、「Compendium of Organic Synthetic Methods」、John Wiley and Sons、1980年を参照)。

【0368】

6員環内部の曲線は、環が1以上の不飽和度を有し、それは芳香族性でありうることを示す。したがって、下記などの環構造およびそれに関連する構造が、式(f)：

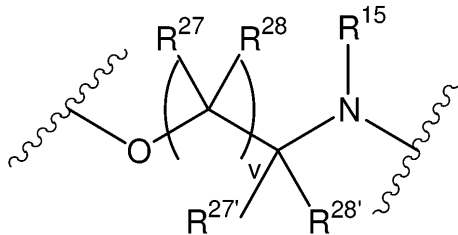


10

の範囲内に含まれる。

【0369】

一部の実施形態では、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、および $R^{5'}$ の少なくとも1つは前記薬剤を L^1 (存在する場合) またはF、H、J、もしくは X^2 に結合させ、かつ



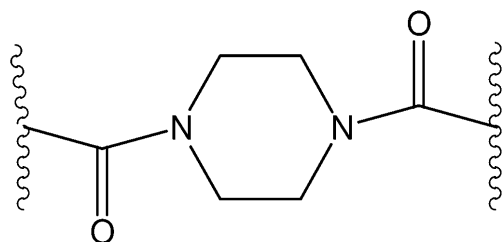
20

を含み、ここで、 v は1~6の整数であり; かつ R^{27} 、 $R^{27'}$ 、 R^{28} 、および $R^{28'}$ の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから独立して選択される。一部の実施形態では、 R^{27} 、 $R^{27'}$ 、 R^{28} 、および $R^{28'}$ はすべてHである。一部の実施形態では、 v は1~3の整数(好ましくは1)である。この単位を用い、アリール置換基を薬剤から分離することで、多剤耐性のための基質である化合物の生成に対する抵抗または回避がなされうる。

30

【0370】

一実施形態では、 R^{11} は、自己環化することなく、薬剤を L^1 (存在する場合) またはF、H、J、もしくは X^2 に結合させる部分 X^5 を含む。部分 X^5 は、好ましくは酵素を用いて切断可能であり、切断される場合、活性薬剤を提供する。例として、 R^{11} は構造(右側が薬剤の残りに結合した状態)：



40

を有しうる。

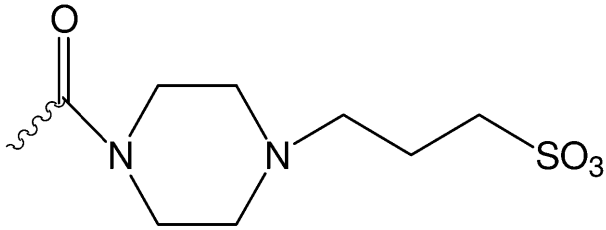
【0371】

典型的な実施形態では、式(e)の環系Aは、置換もしくは未置換フェニル環である。環系Aは、本明細書中の定義セクションで示される1つ以上のアリール置換基で置換されうる。一部の実施形態では、フェニル環は、CNまたはメトキシ部分で置換される。

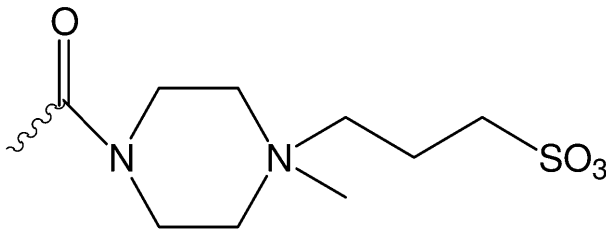
【0372】

50

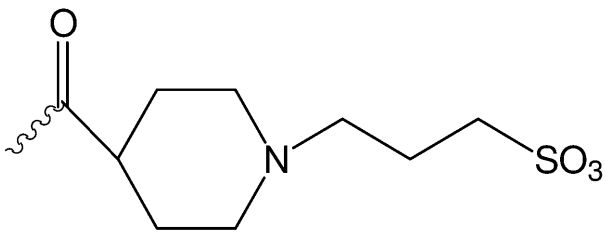
一部の実施形態では、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、および $R^{5'}$ の少なくとも1つは前記薬剤を L^1 （存在する場合）またはF、H、J、もしくは X^2 に結合させ、かつ R^3 は $SR^{1'}$ 、 $NHR^{1'}$ および $OR^{1'}$ から選択される。 $R^{1'}$ は、 $SO(OH)_2$ 、 $-PO(OH)_2$ 、 $-AA_n$ 、 $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ 、 $-C(O)OPhNH(AA)_m$ 、



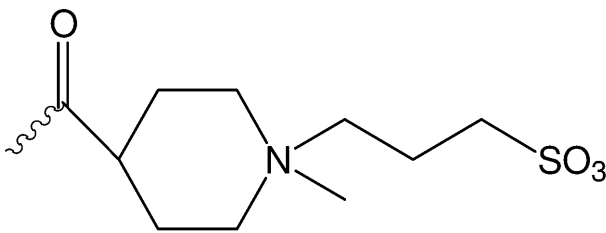
10



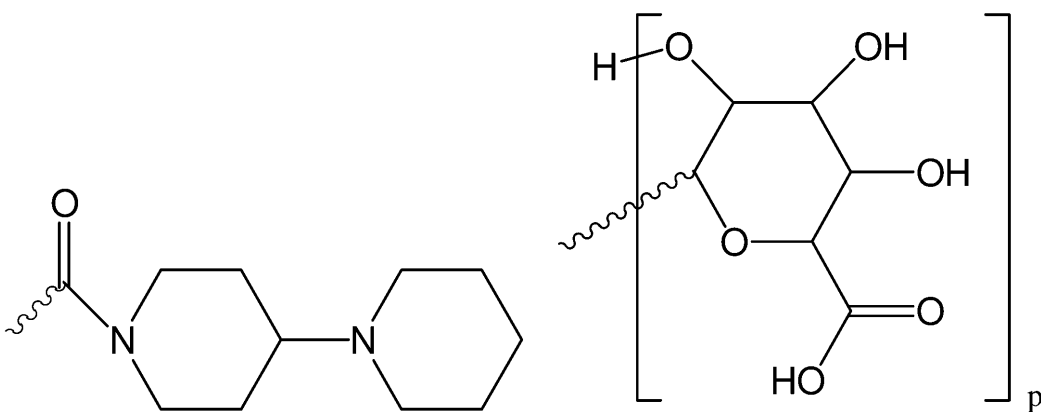
20



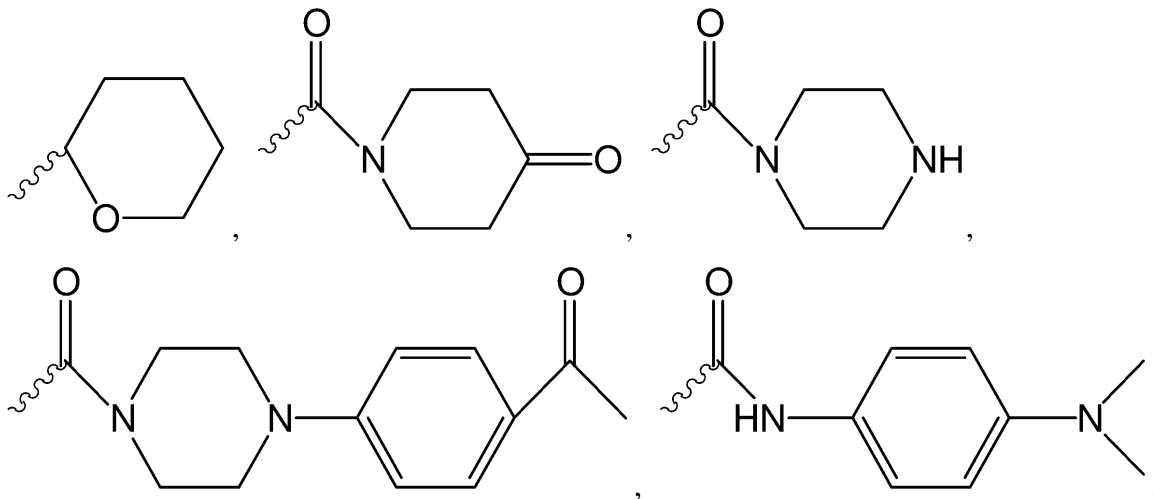
30



40



または任意の他の糖もしくは糖の組み合わせ、



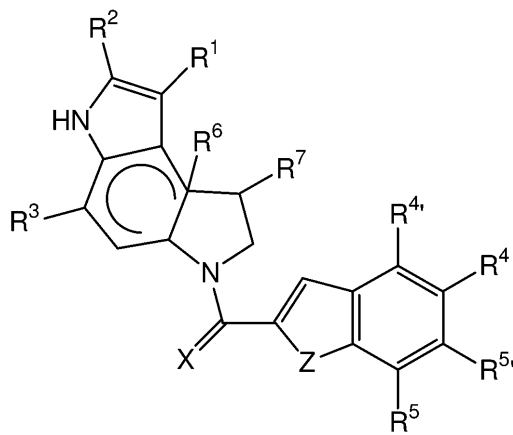
10

20

およびその薬学的に許容できる塩から選択され、ここで n は 1 ~ 10 の範囲内の任意の整数であり、 m は 1 ~ 4 の範囲内の任意の整数であり、 p は 1 ~ 6 の範囲内の任意の整数であり、かつ AA は任意の天然または非天然アミノ酸である。一部の実施形態では、 AA_n または AA_m はペプチドリンカー (F) における上記と同じアミノ酸配列から選択され、場合により R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、もしくは $R^{5'}$ のリンカー部分で用いられるアミノ酸配列と同じである。少なくとも一部の実施形態では、 R^3 はインピボで切断可能であることで活性薬剤化合物がもたらされる。少なくとも一部の実施形態では、 R^3 はインピボでの化合物の溶解度を増大させる。一部の実施形態では、血中での活性薬剤の濃度の低下速度は R^3 の切断速度よりも実質的に速いことで活性薬剤がもたらされる。これは、活性薬剤の毒性がプロドラッグ形態の毒性よりも実質的に高い場合、特に有用でありうる。他の実施形態では、活性薬剤をもたらしするための R^3 の切断の速度は血中での活性薬剤の濃度の低下の速度よりも速い。

【0373】

別の典型的な実施形態では、本発明は、式 (g) :



(g)

30

40

による構造を有する化合物を提供する。

【0374】

この実施形態では、置換基 R^3 、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 R^7 および X の属性は式 (a) における上記と実質的に同じであるとともに、特定の実施形態において好ましい。記号 Z は、 O 、 S および $NR^{2,3}$ から独立して選択されるメンバーである。記号 $R^{2,3}$ は、 H 、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーを表す。各 $R^{2,3}$ は独立して選択される。記号 R^1 は、 H 、置換もしくは未置換低級アルキル、または $C(O)R^8$ もしくは CO_2R^8 を表す。 R^8 は、置換アルキル、未置換アルキル、 NR^9R^{10} 、 NR^9NHR^{10} および OR^9 から選択されるメンバーである。 R^9 および R^{10} は、 H 、置換もしくは未置換アルキル

50

および置換もしくは未置換ヘテロアルキルから独立して選択される。R²はHまたは置換もしくは未置換低級アルキルである。R²が置換アルキルである場合、それはパーフルオロアルキル、例えばCF₃以外であることが一般に好ましい。一実施形態では、R²は置換アルキルであり、ここでは置換基はハロゲンではない。別の実施形態では、R²は未置換アルキルである。

【0375】

一実施形態では、R¹はエステル部分、例えばCO₂CH₃である。一実施形態では、R²は低級アルキル基であり、それは置換もしくは未置換でありうる。ここで好ましい低級アルキル基はCH₃である。一部の好ましい実施形態では、R¹はCO₂CH₃でありかつR²はCH₃である。

10

【0376】

一実施形態では、R⁴、R^{4'}、R⁵、およびR^{5'}は、H、ハロゲン、NH₂、OMe、O(CH₂)₂N(R²⁹)₂およびNO₂から独立して選択されるメンバーである。各R²⁹は、独立してHまたは低級アルキル(例えばメチル)である。

【0377】

一実施形態では、薬剤は、脱離基X¹がハロゲン、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、およびアジドから選択されるメンバーであるように選択される。一実施形態では、X¹はF、Cl、またはBrである。

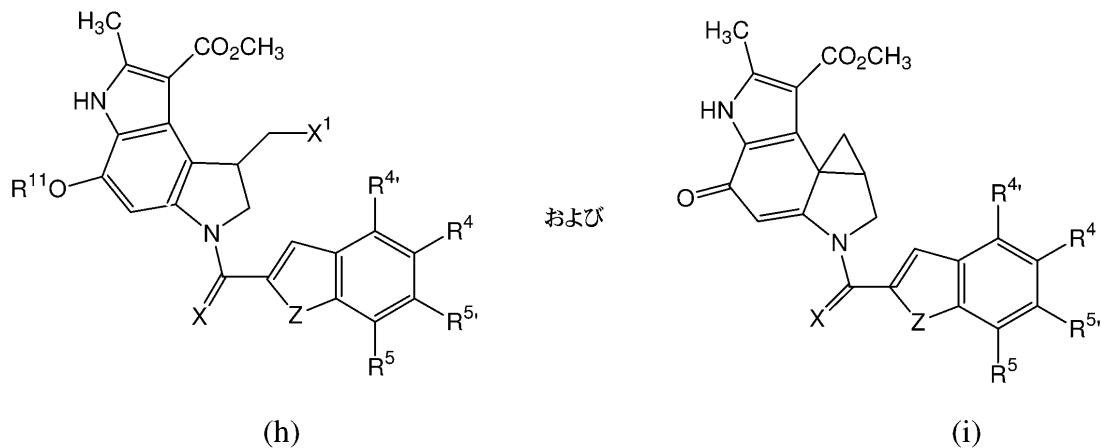
【0378】

一実施形態では、ZはOまたはNHである。一実施形態では、XはOである。

20

【0379】

さらに別の典型的な実施形態では、本発明は、式(h)または(i)：



30

による構造を有する化合物を提供する。

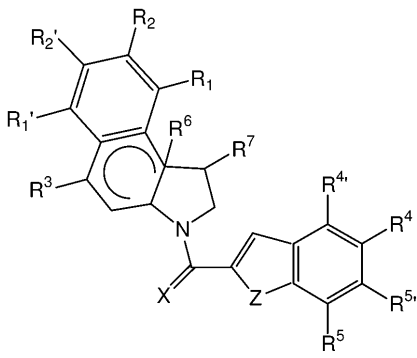
【0380】

式(e)のデュオカルマイシン類似体の別の好ましい構造は、環系Aが未置換もしくは置換フェニル環である場合の構造である。環系Aがピロールである場合での式7の構造における上記の薬剤分子上の好ましい置換基はまた、環系Aが未置換もしくは置換フェニル環である場合での好ましい置換基である。

40

【0381】

例えば、好ましい実施形態では、薬剤(D)は、構造(j)：



(j)

10

を含む。

【0382】

この構造では、 R^3 、 R^6 、 R^7 、 X は式(e)において上記の通りである。さらに、 Z はO、Sおよび $NR^{2,3}$ から選択されるメンバーであり、ここで $R^{2,3}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり；

R^1 は、H、置換もしくは未置換低級アルキル、 $C(O)R^8$ 、または CO_2R^8 であり、ここで R^8 は NR^9R^{10} および OR^9 から選択されるメンバーであり、ここで R^9 および R^{10} は、H、置換もしくは未置換アルキルおよび置換もしくは未置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーであり；

20

$R^{1'}$ は、H、置換もしくは未置換低級アルキル、または $C(O)R^8$ であり、ここで R^8 は NR^9R^{10} および OR^9 から選択されるメンバーであり、ここで R^9 および R^{10} は、H、置換もしくは未置換アルキルおよび置換もしくは未置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーであり；

R^2 は、H、または置換もしくは未置換低級アルキルまたは未置換ヘテロアルキルまたはシアノまたはアルコキシであり、かつ $R^{2'}$ は、H、または置換もしくは未置換低級アルキルまたは未置換ヘテロアルキルである。

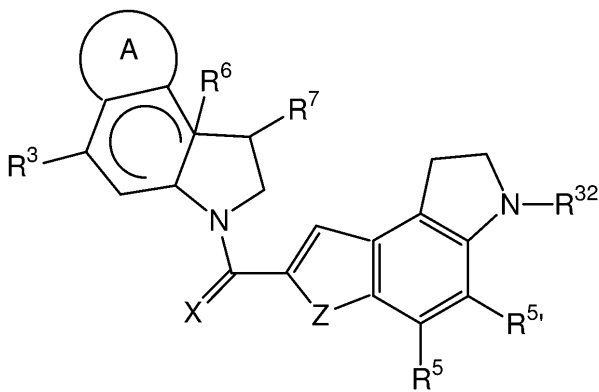
【0383】

R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} または R^{16} の少なくとも1つは、薬剤を L^1 （存在する場合）またはF、H、J、もしくは X^2 に結合させる。

30

【0384】

薬剤(D)の別の実施形態は構造(k)を含み、ここで R^4 および $R^{4'}$ は結合し、ヘテロシクロアルキル：



(k)

40

が形成される。

【0385】

この構造では、 R^3 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 R^7 、 X は式(e)において上記の通りである。さらに、 Z はO、Sおよび $NR^{2,3}$ から選択されるメンバーであり、ここで $R^{2,3}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシ

50

ルから選択されるメンバーである。

【0386】

R^{3 2} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換アリアル、置換もしくは未置換ヘテロアリアル、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR^{1 5}R^{1 6}、NC(O)R^{1 5}、OC(O)NR^{1 5}R^{1 6}、OC(O)OR^{1 5}、C(O)R^{1 5}、SR^{1 5}、OR^{1 5}、CR^{1 5}=NR^{1 6}、およびO(CH₂)_nN(CH₃)₂から選択され、ここでnは1~20の整数である。R^{1 5}およびR^{1 6}は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリアル、置換もしくは未置換ヘテロアリアル、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルおよび置換もしくは未置換ペプチジルを独立して表し、ここでR^{1 5}およびR^{1 6}はそれらの結合対象である窒素原子とともに場合により結合し、4~6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成される。R^{3 2}は、場合により、その構造内部に1つ以上の切断可能な基、例えば切断可能なリンカーまたは切断可能な基質を有する。典型的な切断可能な基は、限定はされないが、ペプチド、アミノ酸、ヒドラジン、ジスルフィド、およびセファロスポリン誘導体を含む。さらに、R⁴、R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R^{1 5}、およびR^{1 6}に対する本明細書中に記載の置換基の選択はR^{3 2}にも適用可能である。

10

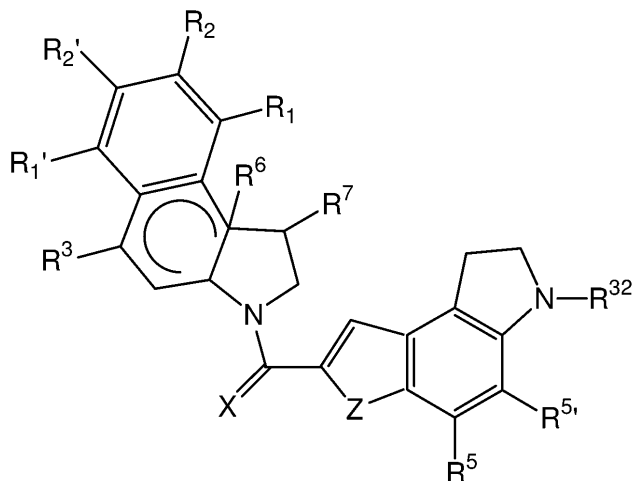
【0387】

R⁵、R^{5'}、R^{1 1}、R^{1 2}、R^{1 3}、R^{1 5}、R^{1 6}、またはR^{3 2}の少なくとも1つは、薬剤をL¹(存在する場合)またはF、H、J、もしくはX²に結合させる。少なくとも一部の実施形態では、R^{3 2}は薬剤をL¹(存在する場合)またはF、H、J、もしくはX²に結合させる。

20

【0388】

この化合物の好ましい一実施形態は、



30

であり、

R¹は、H、置換もしくは未置換低級アルキル、C(O)R⁸、またはCO₂R⁸であり、ここでR⁸はNR⁹R^{1 0}およびOR⁹から選択されるメンバーであり、ここでR⁹およびR^{1 0}は、H、置換もしくは未置換アルキルおよび置換もしくは未置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーであり；

40

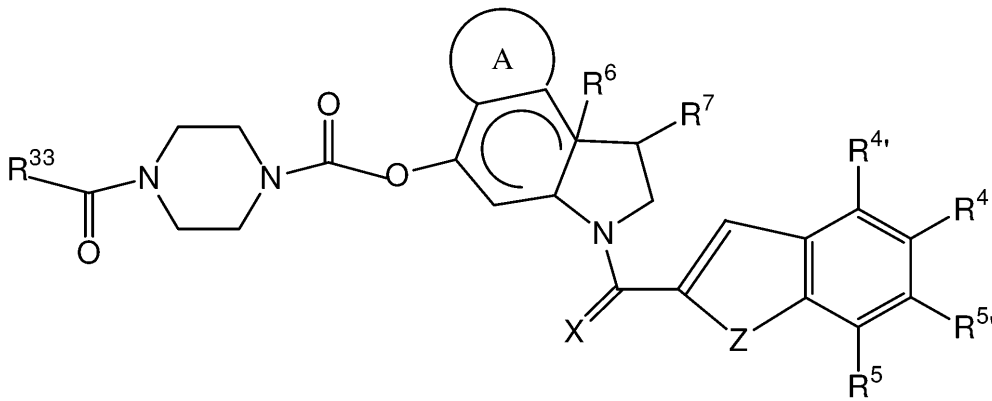
R^{1'}は、H、置換もしくは未置換低級アルキル、またはC(O)R⁸であり、ここでR⁸はNR⁹R^{1 0}およびOR⁹から選択されるメンバーであり、ここでR⁹およびR^{1 0}は、H、置換もしくは未置換アルキルおよび置換もしくは未置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーであり；

R²は、H、または置換もしくは未置換低級アルキルまたは未置換ヘテロアルキルまたはシアノまたはアルコキシであり、かつR^{2'}は、H、または置換もしくは未置換低級アルキルまたは未置換ヘテロアルキルである。

【0389】

50

さらなる実施形態は、式：



10

を有する。

【0390】

この構造では、A、 R^6 、 R^7 、X、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、および $R^{5'}$ は式(e)において上記の通りである。さらに、ZはO、Sおよび $NR^{2'3}$ から選択されるメンバーであり、ここで $R^{2'3}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり；

$R^{3'3}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{1'5}R^{1'6}$ 、 $NC(O)R^{1'5}$ 、 $OC(O)NR^{1'5}R^{1'6}$ 、 $OC(O)OR^{1'5}$ 、 $C(O)R^{1'5}$ 、 $SR^{1'5}$ 、 $OR^{1'5}$ 、 $CR^{1'5} = NR^{1'6}$ 、ならびに $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ から選択され、ここでnは1~20の整数である。 $R^{1'5}$ および $R^{1'6}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルおよび置換もしくは未置換ペプチジルを独立して表し、ここで $R^{1'5}$ および $R^{1'6}$ はそれらの結合対象である窒素原子とともに場合により結合し、4~6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成される。 $R^{3'3}$ は薬剤を L^1 (存在する場合)またはF、H、J、もしくは X^2 に結合させる。

20

30

【0391】

好ましくは、Aは置換もしくは未置換フェニルまたは置換もしくは未置換ピロールである。さらに、 $R^{1'1}$ に対する本明細書中に記載の置換基の選択は $R^{3'3}$ にも適用可能である。

【0392】

リガンド

X^4 は保護反応官能基、非保護反応官能基、検出可能な標識、および標的化剤からなる群より選択されるリガンドを表す。好ましいリガンドは標的化剤、例えば抗体およびその断片である。

【0393】

一部の実施形態では、 X^4 基は $R^{2'9}$ 、 $COOR^{2'9}$ 、 $C(O)NR^{2'9}$ 、および $C(O)NNR^{2'9}$ から選択されるメンバーとして記述可能であり、ここで $R^{2'9}$ は、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換ヘテロアリールから選択されるメンバーである。さらに別の典型的な実施形態では、 $R^{2'9}$ はチオール反応性メンバーである。さらに典型的な実施形態では、 $R^{2'9}$ は、ハロアセチルおよびアルキルハロゲン化誘導体、マレイミド、アジリジン、およびアクリロイル誘導体から選択されるチオール反応性メンバーである。上記チオール反応性メンバーは、例えば標的化剤のアミノ酸の側鎖、例えば抗体と反応しうる反応性保護基として作用することで、標的化剤をリンカー-薬剤部分に結合させうる。

40

【0394】

50

検出可能な標識

本発明の化合物および方法と併用される特定の標識または検出可能な基は、本発明の化合物の活性または有用性と有意に干渉することがない限り、一般に本発明の重要な態様ではない。検出可能な基は、検出可能な物理的または化学的特性を有する任意の材料でありうる。かかる検出可能な標識はイムノアッセイの分野で十分に開発されており、一般にかかる方法で有用な大部分の任意の標識が本発明に適用可能である。したがって、標識は、分光学的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。本発明で有用な標識は、磁気ビーズ（例えばDYNABEADS（商標））、蛍光色素（例えばフルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど）、放射性標識（例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAで一般に用いられるその他のもの）、ならびにコロイド状金または着色ガラスまたはプラスチックビーズ（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）などの比色標識を含む。

【0395】

標識は、当該技術分野で周知の方法に従い、本発明の化合物に直接的または間接的に結合されうる。上記のように、多種多様な標識の使用が可能であり、そこでの標識の選択は、要求される感受性、化合物との複合の容易性、安定性の要求、使用可能な器具類、および使い捨ての設備（disposal provision）に依存する。

【0396】

本発明の化合物が検出可能な標識に複合される場合、標識は好ましくは放射性同位体、蛍光物質、蛍光物質前駆体、発色団、酵素およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるメンバーである。様々な基を抗体に複合するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、抗体に複合されることが多い検出可能な標識は、酵素、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼである。

【0397】

非放射性標識は間接的手段により結合されることが多い。一般に、リガンド分子（例えばビオチン）は複合体の成分に共有結合される。次いで、リガンドは別の分子（例えばストレプトアビジン分子）に結合し、それは本質的に検出可能であるかあるいはシグナル系、例えば検出可能な酵素、蛍光化合物、または化学発光化合物に共有結合される。

【0398】

本発明の複合体の成分はまた、例えば酵素またはフルオロフォアとの複合により、シグナル生成化合物に直接複合されうる。標識としての目的の酵素は、主に加水分解酵素、特にホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ、またはオキシダーゼ（oxidases）、特にペルオキシダーゼとなる。蛍光化合物は、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどを含む。化学発光化合物は、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えばルミノールを含む。使用可能な様々な標識またはシグナル生成系についてのレビューとしては、米国特許第4,391,904号明細書を参照のこと。

【0399】

標識を検出する手段は当業者に周知である。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出用手段はオートラジオグラフィなどではシンチレーションカウンタまたは写真フィルムを含む。標識が蛍光標識である場合、それは蛍光色素を適切な光の波長で励起し、得られる蛍光を検出することで検出可能である。蛍光は、電荷結合素子（CCD）または光電子増倍管などの電子検出器の使用により、写真フィルムを用いて視覚的に検出可能である。同様に、酵素標識は、酵素に適する基質を提供し、得られた反応生成物を検出することにより検出可能である。最後に、簡素な比色標識は、単に標識に関連する色を観察することにより検出可能である。したがって、様々なディップスティックアッセイでは、複合された金がピンク色を呈することが多い一方、様々な複合ビーズがビーズの色

10

20

30

40

50

を呈する。

【0400】

蛍光標識は取扱い上の注意がほとんど要求されないという利点を有し、高スループット画像化技術（コンピュータを含む集積システムにおける分析用の画像のデジタル化を含む光学分析）への適合性が高いことから、ここでは好ましい。好ましい標識は、典型的には、標識における高い感受性、高い安定性、低いバックグラウンド、低い環境感受性および高い特異性のうちの1つ以上で特徴づけられる。多数の蛍光標識が、SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO)、Molecular Probes (Eugene, OR)、R&D systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland))、およびApplied Biosystems (Foster City, CA)、ならびに当業者に既知の多数の他の市販元から市販されている。さらに、当業者は、特定の用途に適するフルオロフォアの選択方法を理解し、市販品として容易に入手できない場合、必要なフルオロフォアを新規に合成するかまたは市販の蛍光化合物を合成的に修飾し、所望の蛍光標識の入手に至ることができるであろう。

10

20

【0401】

小分子のフルオロフォアに加え、天然蛍光タンパク質およびかかるタンパク質の改変類似体は本発明で有用である。かかるタンパク質として、例えば、刺胞動物の緑色蛍光タンパク質 (Wardら、Photochem. Photobiol. 35: 803-808頁 (1982年); Levineら、Comp. Biochem. Physiol., 72B: 77-85頁 (1982年))、ビブリオ・フィシェリ (Vibrio fischeri) 株由来の黄色蛍光タンパク質 (Baldwinら、Biochemistry 29: 5509-15頁 (1990年))、渦鞭毛藻のシンビオジニウム種 (dinoflagellate Symbiodinium sp.) 由来のペリジニン-クロロフィル (Morrisら、Plant Molecular Biology 24: 673: 77頁 (1994年))、海洋シアノバクテリア、例えばシネココッカス (Synechococcus) 由来のフィコピリンタンパク質、例えばフィコエリトリンおよびフィコシアニン (Wilbanksら、J. Biol. Chem. 268: 1226-35 (1993年)) などが挙げられる。

30

【0402】

一般に、細胞毒素と標的化剤（または他の作用物質）、場合によりスペーサー基の間での結合の形成に先立ち、化学官能基の少なくとも1つが活性化されることになる。当業者は、ヒドロキシ、アミノ、およびカルボキシ基を含む種々の化学官能基が種々の標準の方法および条件を用いて活性化されうることを理解するであろう。例えば、細胞毒素または標的化剤の水酸基がホスゲンでの処理を通じて活性化され、対応するクロロホルマートまたはp-ニトロフェニルクロロホルマートが形成され、対応する炭酸塩が形成されうる。

40

【0403】

典型的な実施形態では、本発明ではカルボキシル官能基を含む標的化剤が使用される。カルボキシル基は、例えば対応するアシルハロゲン化物または活性エステルへの変換により活性化されうる。この反応は、March、上記、388-89頁で例示のように種々の条件下で行われうる。典型的な実施形態では、ハロゲン化アシルは、カルボキシル含有基と塩化オキサリルとの反応を通じて調製される。活性化剤は細胞毒素または細胞毒素-リンカー-アーム複合体と反応し、本発明の複合体が形成される。当業者は、カルボキシル含有標的化剤の使用はあくまで例示であり、多数の他の官能基を有する作用物質が本発明

50

のリンカーに複合されうることを理解するであろう。

【0404】

反応官能基

例示の簡素化のため、以下の考察では細胞毒素と標的化剤との複合について着目される。その着目により本発明の一実施形態が例示され、その他は当業者により容易に推定される。本発明が単一の実施形態に関する考察に着目することによって限定されることは全く意図されていない。

【0405】

本発明の典型的な化合物は一般に置換もしくは未置換アルキルまたはヘテロアルキル鎖上に位置する反応官能基を担持することから、それらの別種への容易な結合が可能になる。反応基にとって好都合な位置は鎖の末端位置である。

10

【0406】

本発明の実施において有用な反応の反応基およびクラスは、一般にバイオコンジュゲート化学の技術分野で周知のものである。反応官能基は保護または非保護の場合があり、基の保護性は有機合成の技術分野で既知の方法により変化しうる。反応性の細胞毒素類似体の場合に使用可能な好ましい反応のクラスは比較的穏やかな条件下で進行するものである。これらは、限定はされないが、求核置換基（例えばアミンおよびアルコールとハロゲン化アシル、活性エステルとの反応）、求電子置換基（例えばエナミン反応）、ならびに炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子の複数の結合の付加（例えばマイケル反応、ディールス-アルダー付加）を含む。これらおよび他の有用な反応は、例えば、March、「Advanced Organic Chemistry」、第3版、John Wiley & Sons、ニューヨーク(New York)、1985年；Hermanson、「Bioconjugate Techniques」、Academic Press、サンディエゴ(San Diego)、1996年、およびFeeneyら、「Modification of Proteins；Advances in Chemistry Series」、第198巻、American Chemical Society、ワシントンD.C.(Washington, D.C.)、1982年において考察されている。

20

【0407】

典型的な反応タイプは、カルボキシル基と、限定はされないが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルを含むその様々な誘導体との反応を含む。水酸基は、エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換されうる。ハロアルキル基は、例えば、アミン、カルボン酸アニオン、チオールアニオン、カルボアニオン、またはアルコキシドイオンとの反応により新種に変換される。求ジエン体（例えばマレイミド）基はディールス-アルダー付加に参与する。アルデヒドまたはケトン基は、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンもしくはオキシムにまたはグリニャール付加またはアルキルリチウム付加のような機序を介して変換されうる。ハロゲン化スルホニルは例えばアミンと容易に反応し、スルホンアミドが形成される。アミンまたはスルフヒドリル基は、例えばアシル化、アルキル化または酸化される。アルケンは、付加環化、アシル化、マイケル付加などを用いて一連の新種に変換されうる。エポキシドは、アミンおよびヒドロキシル化合物と容易に反応する。

30

40

【0408】

当業者は、これら結合の多数が種々の方法でかつ種々の条件を用いて生成可能であることを容易に理解するであろう。エステルの調製においては例えばMarch、上記、1157頁を参照し；チオエステルにおいてはMarch、上記、362-363頁、491頁、720-722頁、829頁、941頁、および1172頁を参照し；炭酸塩においてはMarch、上記、346-347頁を参照し；カルバメートにおいてはMarch、上記、1156-57頁を参照し；アミドにおいてはMarch、上記、1152頁を

50

参照し；尿素およびチオ尿素においてはMarch、上記、1174頁を参照し；アセター
ールおよびケタールにおいてはGreener、上記、178-210頁およびMarch
h、上記、1146頁を参照し；アシルオキシアルキル誘導体においては「Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery」、K. B.
. Sloan編、Marcel Dekker, Inc.、ニューヨーク(New York)、1992年を参照し；エノールエステルにおいてはMarch、上記、1160
頁を参照し；N-スルホニルイミデートにおいてはBundgaardら、J. Med.
Chem.、31:2066頁(1988年)を参照し；無水物においてはMarch、
上記、355-56頁、636-37頁、990-91頁、および1154頁を参照し；
N-アシルアミドにおいてはMarch、上記、379頁を参照し；N-マンニヒ塩基
においてはMarch、上記、800-02頁および828頁を参照し；ヒドロキシメチ
ルケトンエステルにおいてはPetracekら、Annals NY Acad. Sci.、507:353-54頁(1987年)を参照し；ジスルフィドにおいてはMar
ch、上記、1160頁を参照し；かつホスホン酸エステルおよびホスホンアミデート(
phosphonamide)においては。

【0409】

反応官能基は非保護であり、反応に関与または干渉しないように選択されうる。あるいは、反応官能基は保護基の存在により反応への関与から保護されうる。当業者は、特定の官能基を選択された一連の反応条件への干渉から保護する方法を理解するであろう。有用な保護基の例として、Greener、「Protective Groups in
Organic Synthesis」、John Wiley & Sons、ニューヨーク(New York)、1991年を参照のこと。

【0410】

典型的には、標的化剤は、その各化学官能基による標準の化学技術を用いて細胞毒素に共有結合される。場合により、リンカーまたは作用物質は1つ以上のスペーサー基を介して作用物質に結合される。スペーサー基は、併用される場合、等しいかまたは異なりうる。

【0411】

一般に細胞毒素と反応官能基、場合によりスペーサー基の間での結合の形成に先立ち、化学官能基の少なくとも1つが活性化されることになる。当業者は、ヒドロキシ、アミノ、およびカルボキシ基を含む種々の化学官能基が種々の標準の方法および条件を用いて活性化されうることを理解するであろう。典型的な実施形態では、本発明は反応官能基としてカルボキシル官能基を含む。カルボキシル基は上記のように活性化されうる。

【0412】

切断可能な基質

本発明の切断可能な基質は「X²」として表される。好ましくは、切断可能な基質は酵素により切断されうる切断可能な酵素基質である。好ましくは、酵素は、治療されるべき腫瘍または他の標的細胞と直接的または間接的に優先的に結合される。酵素は、治療されるべき腫瘍または他の標的細胞により生成されうる。例えば、切断可能な基質は、腫瘍または他の標的細胞の近傍もしくは内部に見出される酵素により優先的に切断可能なペプチドでありうる。さらにまたはその他として、酵素は、腫瘍細胞に特異的に結合する標的化剤、例えば腫瘍抗原に特異的な抗体に結合されうる。

【0413】

上記の薬剤への結合に適する酵素切断可能な基質の例として、PCT特許出願公開の国際公開第00/33888号パンフレット、国際公開第01/95943号パンフレット、国際公開第01/95945号パンフレット、国際公開第02/00263号パンフレット、および国際公開第02/100353号パンフレット(これらのすべては参照により本明細書中に援用される)は、切断可能なペプチドの薬剤への結合について開示している。ペプチドは、腫瘍に関連した酵素、例えばtrouase(チメットオリゴペプチダーゼなど)、CD10(ネプリリシン)、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP2ま

10

20

30

40

50

たは MMP 9 など)、II 型膜貫通セリンプロテアーゼ(ヘブシン、テスチシン、TMPRSS4、またはマトリプターゼ/MT-SP1 など)、またはカテプシンにより切断可能である。この実施形態では、プロドラッグは、上記の薬剤、ペプチド、安定化基、また場合により薬剤とペプチドの間の連結基を含む。安定化基がペプチドの末端に結合されることで、プロドラッグが腫瘍または他の標的細胞に到達するまで分解から保護される。適切な安定化基の例として、非アミノ酸、例えばコハク酸、ジグリコール酸、マレイン酸、ポリエチレングリコール、ピログルタミン酸、酢酸、ナフチルカルボン酸、テレフタル酸、およびグルタル酸誘導体；ならびにアスパラギン酸の -カルボキシ基またはグルタミン酸の -カルボキシル基でのペプチドの N 末端に結合された遺伝的にコードされないアミノ酸またはアスパラギン酸またはグルタミン酸が挙げられる。

10

【0414】

ペプチドは、典型的には 3 ~ 12 個(またはそれより多数)のアミノ酸を含む。特定のアミノ酸の選択は、少なくとも部分的にペプチドの切断に用いられる酵素、ならびにインビボでのペプチドの安定性に依存することになる。適切な切断可能なペプチドの一例が -AlaLeuAlaLeu(配列番号 92)である。これが安定化基と結合することで、スクニル - -AlaLeuAlaLeu(配列番号 92)が形成されうる。適切な切断可能なペプチドの他の例が上記の参考文献にて提供される。

【0415】

一具体例として、ネプリリシン、中性エンドペプチダーゼ(NEP)、および急性リンパ芽球性白血病共通抗原(CALLA)としても知られる CD10 は II 型細胞表面垂鉛依存性メタロプロテアーゼである。CD10 との使用に適する切断可能な基質として、LeuAlaLeu および IleAlaLeu が挙げられる。CD10 に対する他の既知の基質が最大で 50 アミノ酸長のペプチドを含むが、基質が大きくなると触媒効率は低下することが多い。

20

【0416】

別の具体例はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に基づく。おそらくは最良に特徴づけられたタンパク質分解酵素は腫瘍に関連し、腫瘍微小環境内での MMP の活性化には明らかな相関がある。特に、可溶性のマトリックス酵素 MMP2(ゼラチナーゼ A) および MMP9(ゼラチナーゼ B) については徹底した試験が行われ、腫瘍成長を含む組織リモデリングの間に選択的に活性化されることが示されている。デキストランとメトトレキサートの複合体については、MMP2 および MMP9 により切断されるように設計されたペプチド配列の設計および試験が行われている(Chaurら、Bioconjugate Chem. 15:931-941 頁(2004年)); PEG(ポリエチレングリコール) およびドキシソルピシン(Baeら、Drugs Exp. Clin. Res. 29:15-23 頁(2004年))、ならびにアルブミンおよびドキシソルピシン(Kratzら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2001-2006 頁(2001年))。MMP との使用に適する配列の例として、限定はされないが、ProValGlyLeuIleGly(配列番号 84)、GlyProLeuGlyVal(配列番号 85)、GlyProLeuGlyIleAlaGlyGln(配列番号 86)、ProLeuGlyLeu(配列番号 87)、GlyProLeuGlyMetLeuSerGln(配列番号 88)、および GlyProLeuGlyLeuTrpAlaGln(配列番号 89)が挙げられる(例えば上記の参考文献ならびに Klineら、Mol. Pharmaceut. 1:9-22 頁(2004年) および Liuら、Cancer Res. 60:6061-6067 頁(2000年)を参照)。他の切断可能な基質の使用も可能である。

30

40

【0417】

さらに別の例が II 型膜貫通セリンプロテアーゼである。この酵素の基として、例えばヘブシン、テスチシン、および TMPRSS4 が挙げられる。GlnAlaArg は(乳癌および卵巣癌において過剰発現される)マトリプターゼ/MT-SP1 の場合に有用な 1 つの基質配列であり、LeuSerArg は(前立腺癌および一部の他の腫瘍タイプに

50

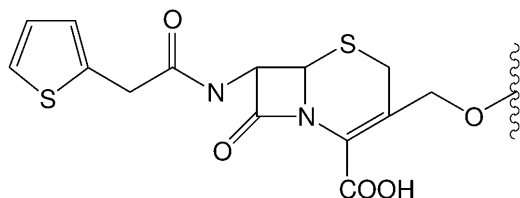
において過剰発現される)ヘブシンの場合に有用である(例えば、Leeら、J. Biol. Chem. 275:36720-36725頁およびKurachiおよびYamamoto、「Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 2」、第2版(Barrett AJ、Rawlings NDおよびWoessner JF編)、1699-1702頁(2004年)を参照)。他の切断可能な基質の使用も可能である。

【0418】

切断可能な基質配列の別のタイプとして、腫瘍または細胞と結合状態になる切断可能な基質を切断する能力がある別の酵素の調製が含まれる。例えば、酵素が腫瘍特異抗体(または腫瘍もしくは受容体リガンドなどの他の標的細胞に優先的に引き付けられる他の実体)に結合され、次いで酵素-抗体複合体が患者に提供されうる。酵素-抗体複合体は、腫瘍に関連した抗原に誘導され、結合される。次いで、薬剤-切断可能な基質複合体がプロドラッグとして患者に提供される。薬剤は、薬剤-切断可能な基質複合体が腫瘍と結合状態になっている酵素と、切断可能な基質が切断されかつ薬剤が遊離されるように相互作用する場合に、腫瘍の近傍でのみ放出される。例えば、米国特許第4,975,278号明細書;米国特許第5,587,161号明細書;米国特許第5,660,829号明細書;米国特許第5,773,435号明細書、および米国特許第6,132,722号明細書(これらのすべては参照により本明細書中に援用される)はかかる配列を開示している。適切な酵素および基質の例として、限定はされないが、 α -ラクタマーゼおよびセファロスポリン誘導体、カルボキシペプチダーゼG2およびグルタミン酸およびアスパラギン酸および葉酸誘導体が挙げられる。

【0419】

一実施形態では、酵素-抗体複合体は、目的の標的細胞上または標的部位で発現される抗原に対するその特異性に基づいて選択される抗体または抗体断片を含む。抗体についての考察が上記に与えられる。適切なセファロスポリン-切断可能な基質の一例が、



である。

【0420】

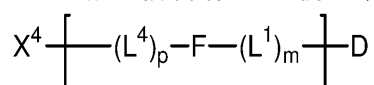
複合体の例

本発明のリンカーおよび切断可能な基質は、種々のパートナー分子を有する複合体内で用いられうる。本発明の複合体の例が、下記にさらに詳述される。他に指定がない限り、置換基は、細胞毒素、リンカー、および切断可能な基質に関するセクションで上記のように定義される。

【0421】

A. リンカー複合体

適切な複合体の一例が、式：



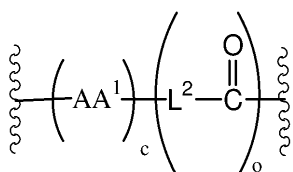
の化合物であり、ここで L^1 は自己犠牲リンカーであり; m は0、1、2、3、4、5、もしくは6の整数であり; F は構造：

10

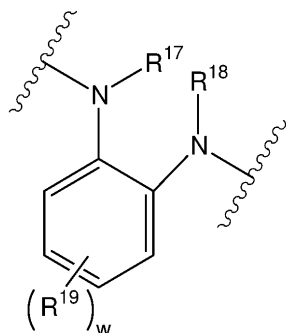
20

30

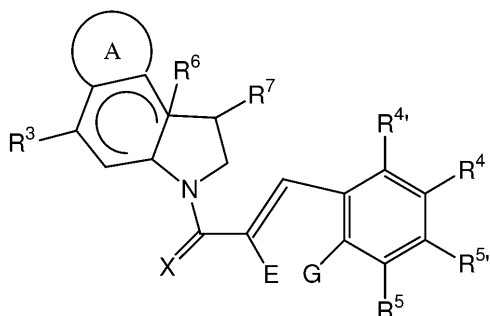
40



を含むリンカーであり、ここで AA^1 は天然アミノ酸および非天然 - アミノ酸からなる群より独立して選択される 1 種以上のメンバーであり； c は 1 ~ 20 の整数であり； L^2 は自己犠牲リンカーでありかつ



を含み、ここで R^{17} 、 R^{18} 、および R^{19} の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換アリールから独立して選択され、かつ w は 0 ~ 4 の整数であり； o は 1 であり； L^4 はリンカーメンバーであり； p は 0 もしくは 1 であり； X^4 は保護反応官能基、非保護反応官能基、検出可能な標識、および標的化剤からなる群より選択されるメンバーであり；かつ D は構造：



を含み、ここで環系 A は、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーであり； E および G は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、ヘテロ原子、単結合から独立して選択されるメンバーであるか、または E および G は結合し、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系が形成され； X は O、S および NR^{23} から選択されるメンバーであり； R^{23} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり； R^3 は OR^{11} であり、ここで R^{11} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホン酸塩、アシル、 $C(O)R^{12}R^{13}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 $C(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $P(O)(OR^{12})_2$ 、 $C(O)CHR^{12}R^{13}$ 、 SR^{12} および $SiR^{12}R^{13}R^{14}$ からなる群より選択されるメンバーであり、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NC(O)R^{15}$ 、 $OC(O)NR^{15}R^{16}$ 、 $OC(O)OR^{15}$ 、 $C(O)R^{15}$ 、 SR^{15} 、 OR^{15} 、 $CR^{15} = NR^{16}$ 、および $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ からなる群より独立して選択されるメンバーであるか、または R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ の任意の隣接対はそれらの結合対象である炭素原子と

10

20

30

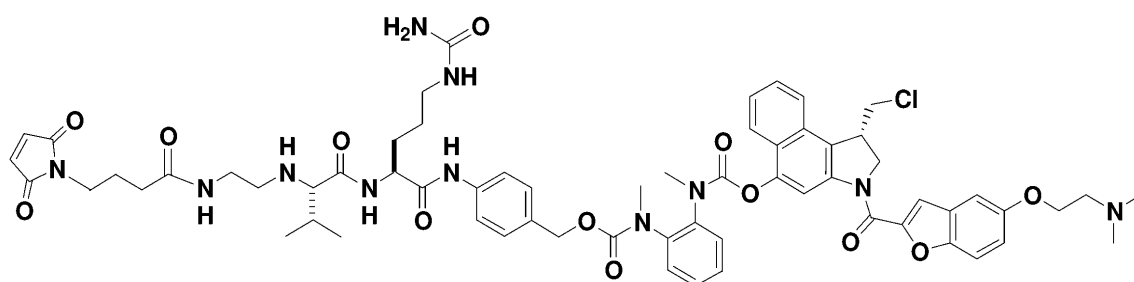
40

50

ともに結合し、4～6員を有する置換もしくは未置換シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル環系が形成され；ここでnは1～20の整数であり； R^{15} および R^{16} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、および置換もしくは未置換ペプチジルから独立して選択され、ここで R^{15} および R^{16} はそれらの結合対象である窒素原子とともに場合により結合し、4～6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され； R^6 は存在するかまたは存在しない単結合であり、存在する場合、 R^6 および R^7 は結合し、シクロプロピル環が形成され；かつ R^7 は R^6 と前記シクロプロピル環内で CH_2-X^1 もしくは $-CH_2-$ で結合され、ここで X^1 は脱離基であり、ここで R^{11} は前記薬剤を L^1 （存在する場合）またはFに結合させる。

【0422】

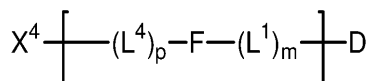
一部の実施形態では、薬剤は上記の構造(c)または(f)を有する。複合体としての使用に適する化合物の一例として、



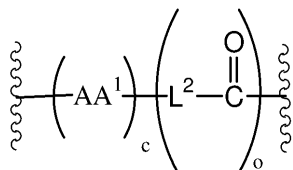
が挙げられる。

【0423】

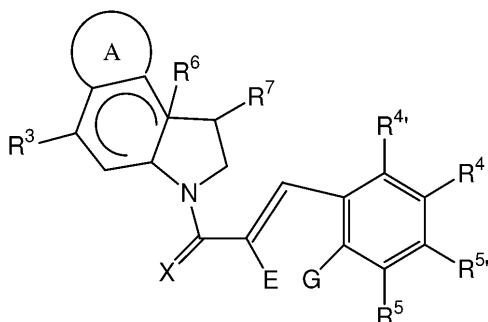
複合体のタイプの別の例が、式



の化合物であり、ここで L^1 は自己犠牲リンカーであり；mは0、1、2、3、4、5、もしくは6の整数であり；Fは構造：



を含むリンカーであり、ここで AA^1 は天然アミノ酸および非天然 - アミノ酸からなる群より独立して選択される1種以上のメンバーであり；cは1～20の整数であり； L^2 は自己犠牲リンカーであり；oは0もしくは1であり； L^4 はリンカーメンバーであり；pは0もしくは1であり； X^4 は保護反応官能基、非保護反応官能基、検出可能な標識、および標的化剤からなる群より選択されるメンバーであり；かつDは構造：



を含み、ここで環系Aは、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリ

10

20

30

40

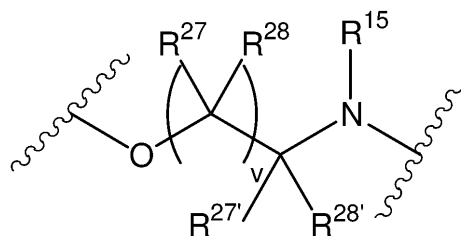
50

ールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーであり； EおよびGは、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、ヘテロ原子、単結合から独立して選択されるメンバーであるか、またはEおよびGは結合し、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系が形成され； XはO、Sおよび NR^{23} から選択されるメンバーであり； R^{23} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり； R^3 は(=O)、 SR^{11} 、 NHR^{11} および OR^{11} からなる群より選択されるメンバーであり、ここで R^{11} は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホン酸塩、アシル、 $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 SR^{12} および $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$ からなる群より選択されるメンバーであり、ここで R^{12} 、 R^{13} 、および R^{14} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換アリールから独立して選択されるメンバーであり、ここで R^{12} および R^{13} はそれらの結合対象である窒素または炭素原子とともに場合により結合し、4～6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され； R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 、 $\text{R}^{5'}$ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ 、 $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$ 、 SR^{15} 、 OR^{15} 、 $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ 、および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$ からなる群より独立して選択されるメンバーであるか、または R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 および $\text{R}^{5'}$ の任意の隣接対はそれらの結合対象である炭素原子とともに結合し、4～6員を有する置換もしくは未置換シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル環系が形成され、ここでnは1～20の整数であり； R^{15} および R^{16} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、および置換もしくは未置換ペプチジルから独立して選択され、ここで R^{15} および R^{16} はそれらの結合対象である窒素原子とともに場合により結合し、4～6員を有し、場合により2つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され； ここで R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 および $\text{R}^{5'}$ の少なくとも1つは前記薬剤を L^1 （存在する場合）またはFに結合させ、かつ

10

20

30

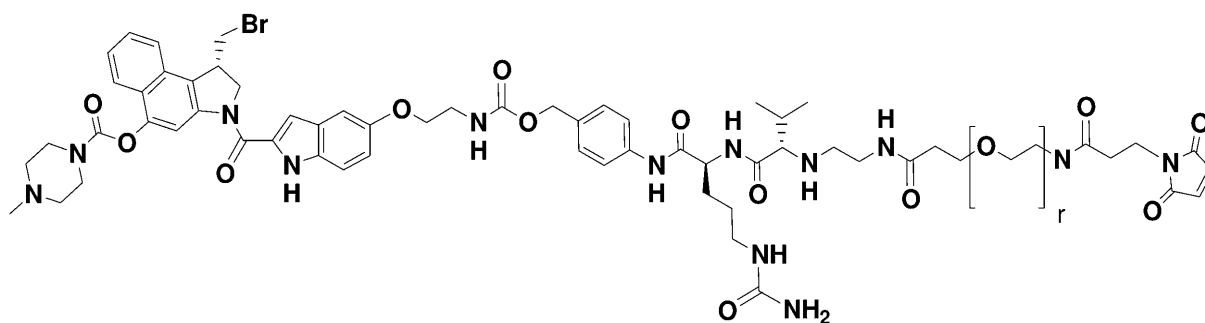


を含み、ここでvは1～6の整数であり； かつ R^{27} 、 $\text{R}^{27'}$ 、 R^{28} 、および $\text{R}^{28'}$ の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから独立して選択され； R^6 は存在するかまたは存在しない単結合であり、存在する場合、 R^6 および R^7 は結合し、シクロプロピル環が形成され； かつ R^7 は R^6 と前記シクロプロピル環内で CH_2-X^1 もしくは $-\text{CH}_2-$ で結合され、ここで X^1 は脱離基である。

40

【0424】

一部の実施形態では、薬剤は上記の構造(c)または(f)を有する。複合体としての使用に適する化合物の1つの具体例が、

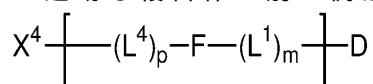


であり、ここで r は 0 ~ 24 の範囲内の整数である。

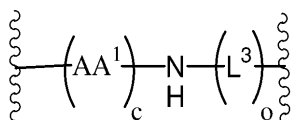
10

【0425】

適切な複合体の別の例が、式

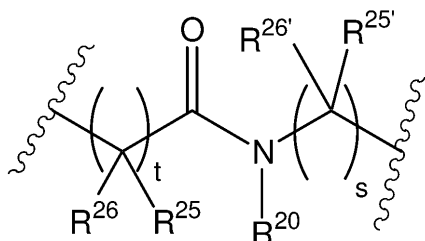


の化合物であり、ここで L^1 は自己犠牲リンカーであり、 m は 0、1、2、3、4、5、もしくは 6 の整数であり、 F は構造



20

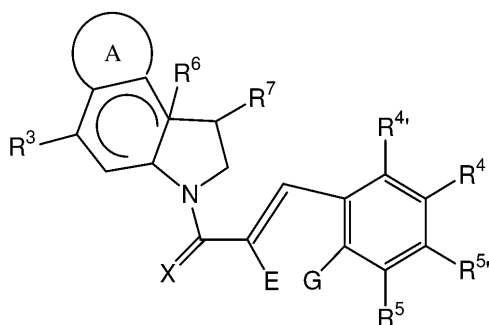
を含むリンカーであり、ここで AA^1 は天然アミノ酸および非天然 - アミノ酸からなる群より独立して選択される 1 つ以上のメンバーであり； c は 1 ~ 20 の整数であり； L^3 は第一級もしくは第二級アミンを含むスペーサー基またはカルボキシル官能基であり；ここで L^3 が存在する場合、 m は 0 でありかつ L^3 のアミンが D の懸垂カルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、または L^3 のカルボキシルが D の懸垂アミン官能基とアミド結合を形成し； o は 0 もしくは 1 であり； L^4 はリンカーメンバーであり、ここで L^4 は $(AA^1)_c$ の N 末端に直接結合された



30

を含み、ここで R^{20} は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} 、および $R^{26'}$ の各々は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから独立して選択され、かつ s および t は独立して 1 ~ 6 の整数であり； p は 1 であり； X^4 は保護反応官能基、非保護反応官能基、検出可能な標識、および標的化剤からなる群より選択されるメンバーであり、かつ D は構造：

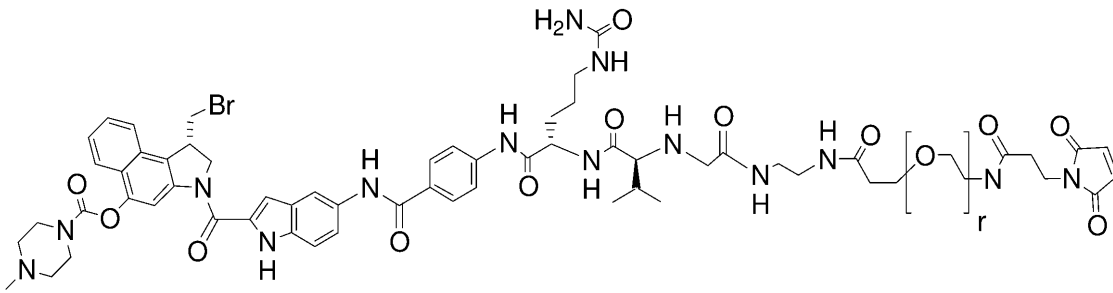
40



を含み、ここで環系 A は、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーであり；
 E および G は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、
 ヘテロ原子、単結合から独立して選択されるメンバーであるか、または E および G は結合し、
 置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系が形成され；X は O、S および N R²
³ から選択されるメンバーであり；R² R³ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり；R³ は (=O)、S R¹ R¹、N H R¹ R¹ および O R¹ R¹ からなる群より選択されるメンバーであり、
 ここで R¹ R¹ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホン酸塩、ア
 シル、C(O) R¹ R² R¹ R³、C(O) O R¹ R²、C(O) N R¹ R² R¹ R³、P(O) (O R¹ R²)₂、C(O) C H R¹ R² R¹ R³、S R¹ R² および S i R¹ R² R¹ R³ R¹ R⁴ から
 なる群より選択されるメンバーであり、ここで R¹ R²、R¹ R³、および R¹ R⁴ は、H、置
 換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換
 置換アリールから独立して選択されるメンバーであり、ここで R¹ R² および R¹ R³ はそれら
 の結合対象である窒素または炭素原子とともに場合により結合し、4 ~ 6 員を有し、場合
 により 2 つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形
 成され；R⁴、R⁴′、R⁵ および R⁵′ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換
 アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシ
 クロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、N R¹ R⁵ R¹ R⁶、N C
¹ R¹ R⁵、O C(O) N R¹ R⁵ R¹ R⁶、O C(O) O R¹ R⁵、C(O) R¹ R⁵、S R
¹ R⁵、O R¹ R⁵、C R¹ R⁵ = N R¹ R⁶、および O (CH₂)_n N (CH₃)₂ からなる群
 より独立して選択されるメンバーであるか、または R⁴、R⁴′、R⁵ および R⁵′ の任
 意の隣接対はそれらの結合対象である炭素原子とともに結合し、4 ~ 6 員を有する置換も
 しくは未置換シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル環系が形成され、ここで n は 1
 ~ 20 の整数であり；R¹ R⁵ および R¹ R⁶ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換も
 しくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロ
 アリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、および置換もしくは未置換ペプチ
 ジルから独立して選択され、ここで R¹ R⁵ および R¹ R⁶ はそれらの結合対象である窒素原
 子とともに場合により結合し、4 ~ 6 員を有し、場合により 2 つ以上のヘテロ原子を有す
 る置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され；R⁶ は存在するかまたは存
 在しない単結合であり、存在する場合、R⁶ および R⁷ は結合し、シクロプロピル環が形
 成され；かつ R⁷ は R⁶ と前記シクロプロピル環内で CH₂ - X¹ もしくは - CH₂ - で
 結合され、ここで X¹ は脱離基であり、ここで R⁴、R⁴′、R⁵、R⁵′、R¹ R⁵ また
 は R¹ R⁶ のうちの少なくとも 1 つは前記薬剤を L¹ (存在する場合) または F に結合させ
 る。

【0426】

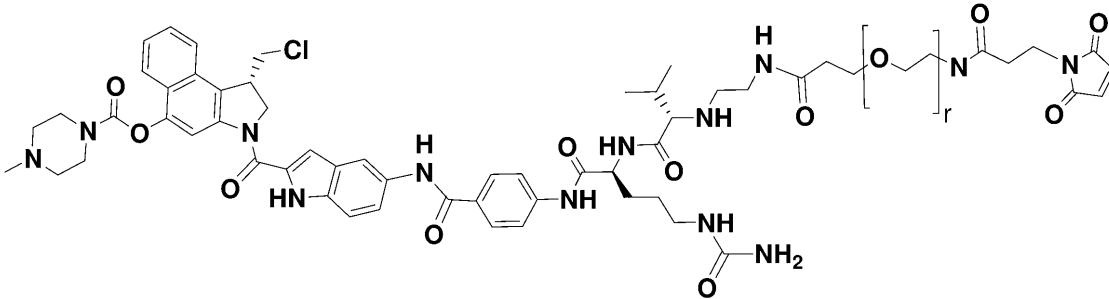
一部の実施形態では、薬剤は上記の構造 (c) または (f) を有する。複合体としての
 使用に適する化合物の 1 つの具体例が、

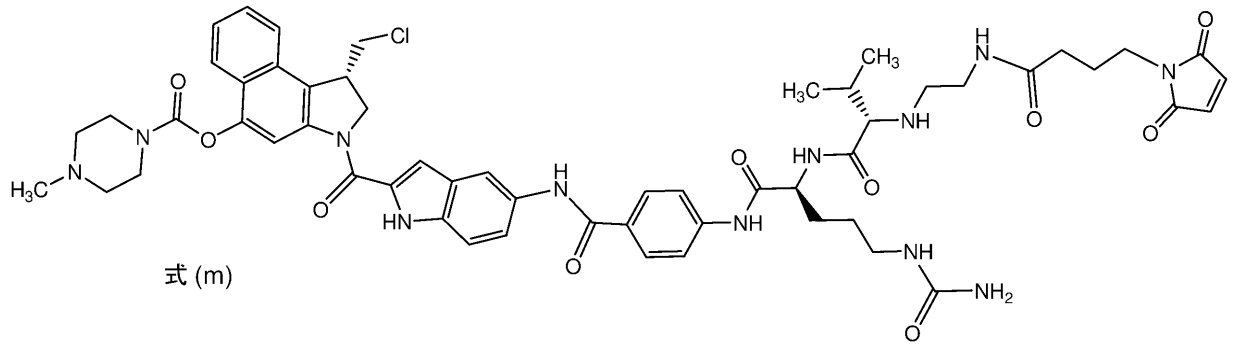


であり、ここで r は 0 ~ 24 の範囲内の整数である。

【0427】

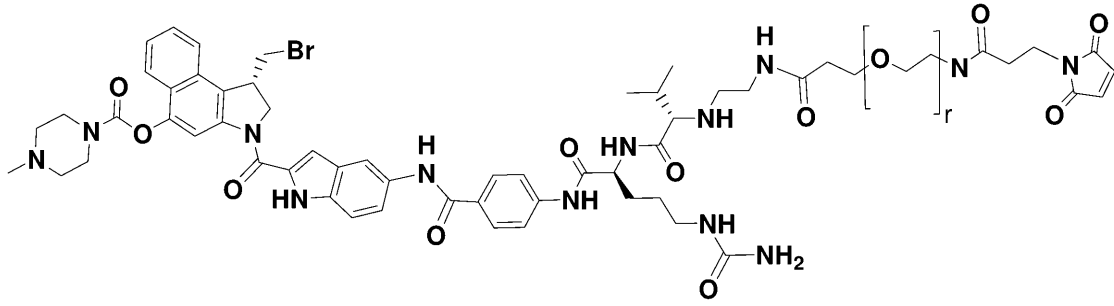
複合体としての使用に適する化合物の他の例として、



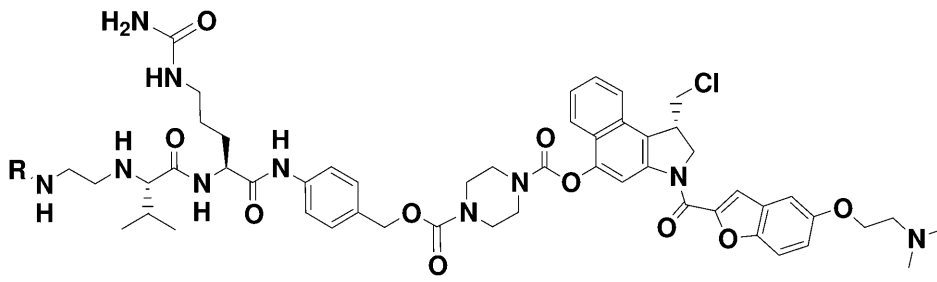


式 (m)

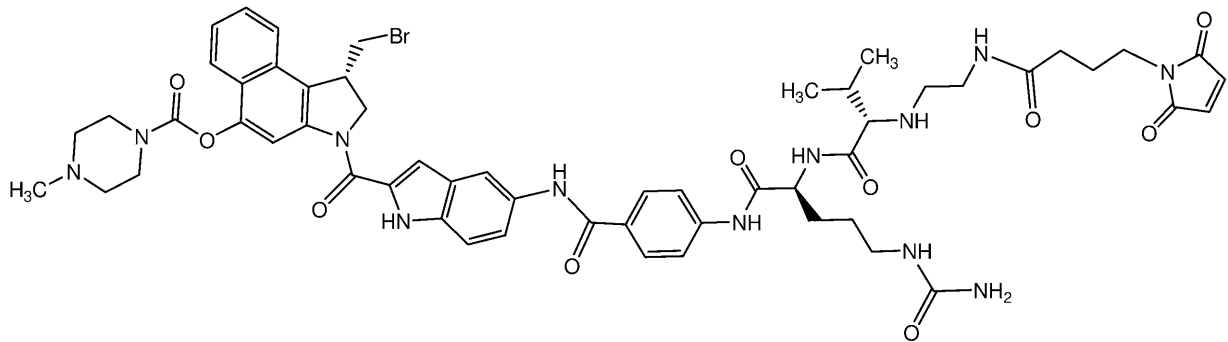
10



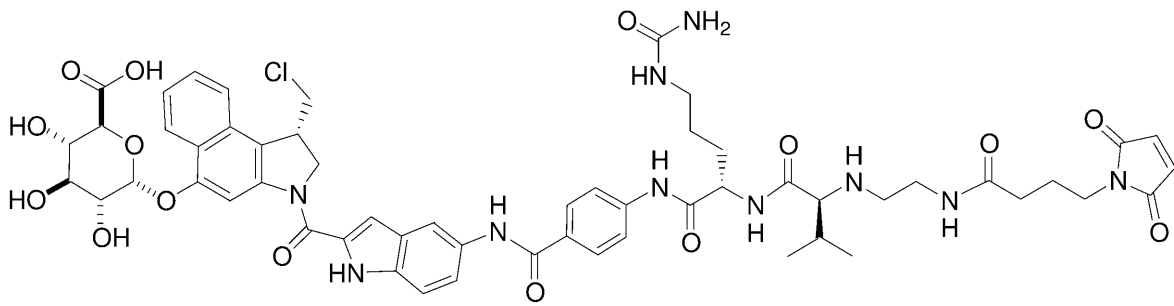
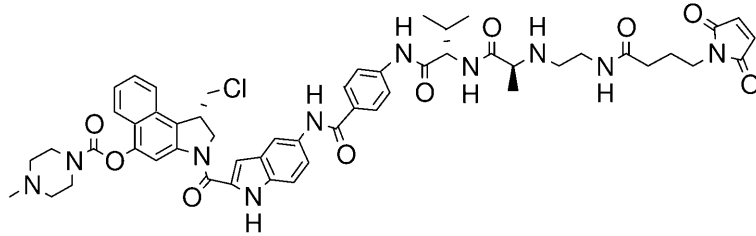
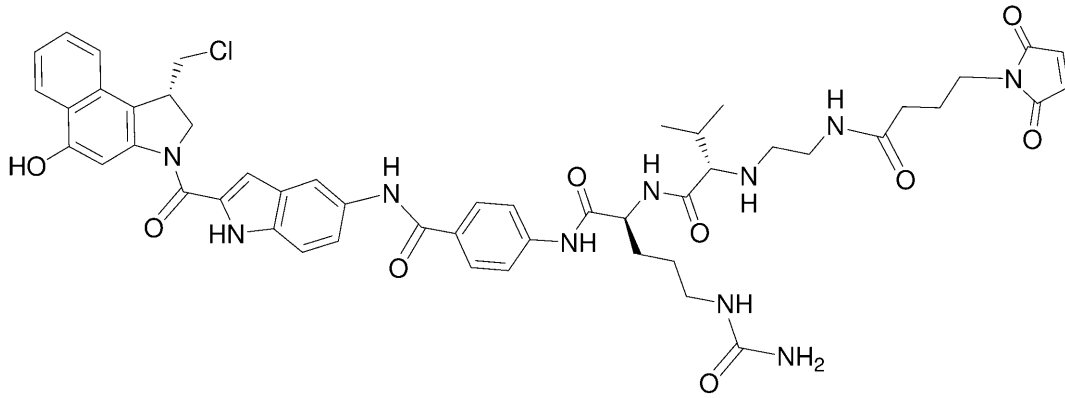
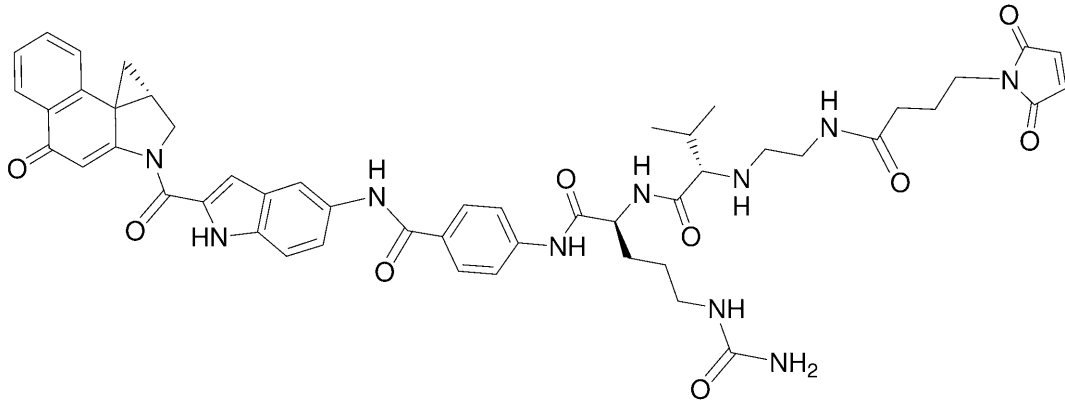
20

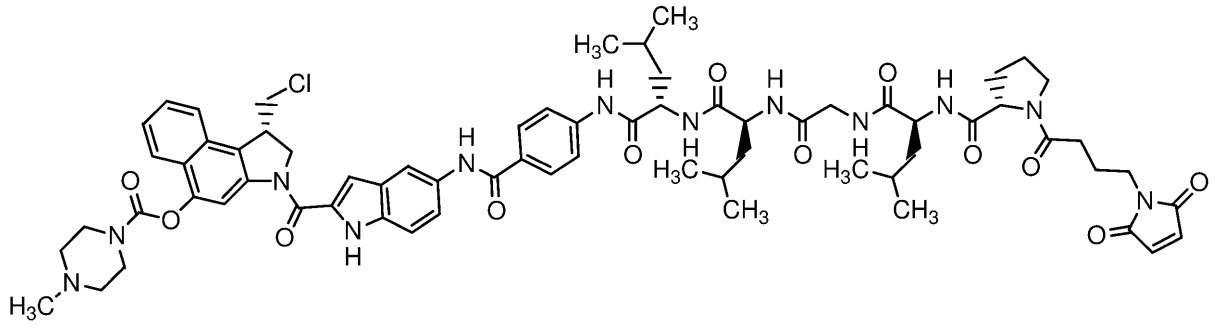
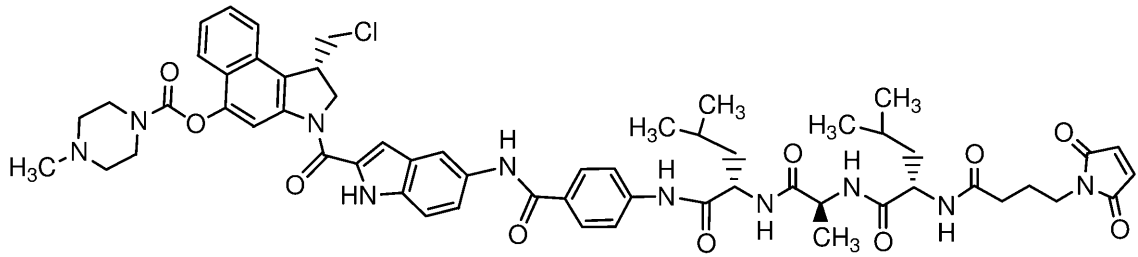


および

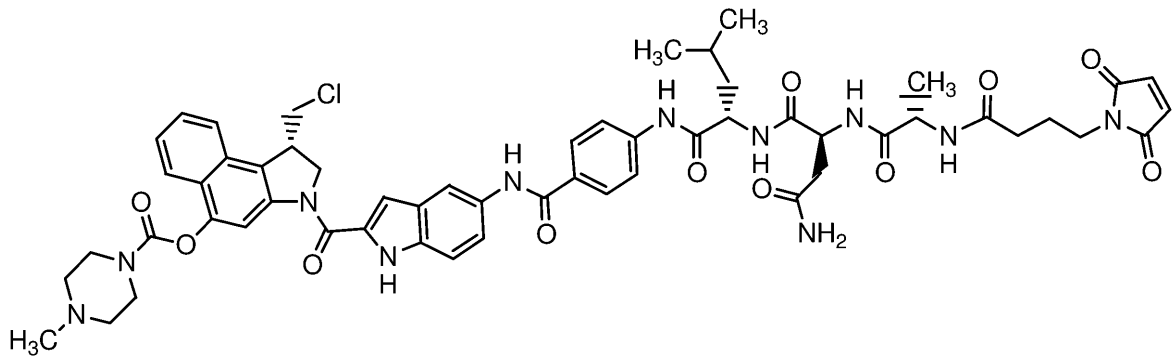


30

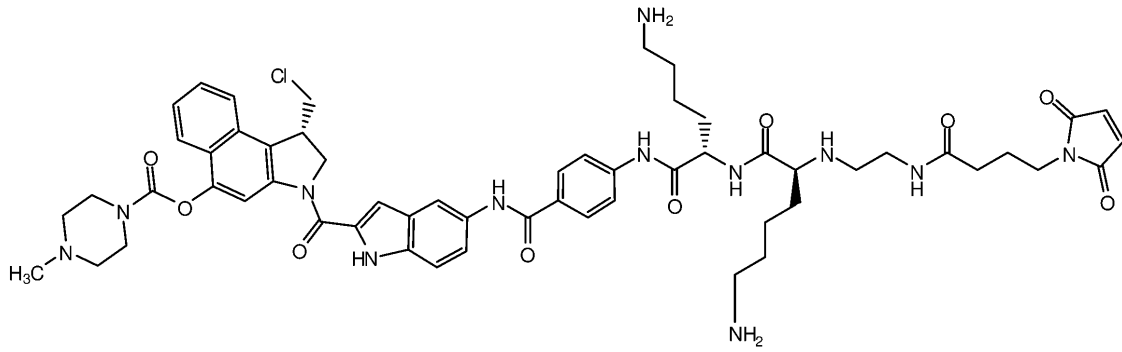




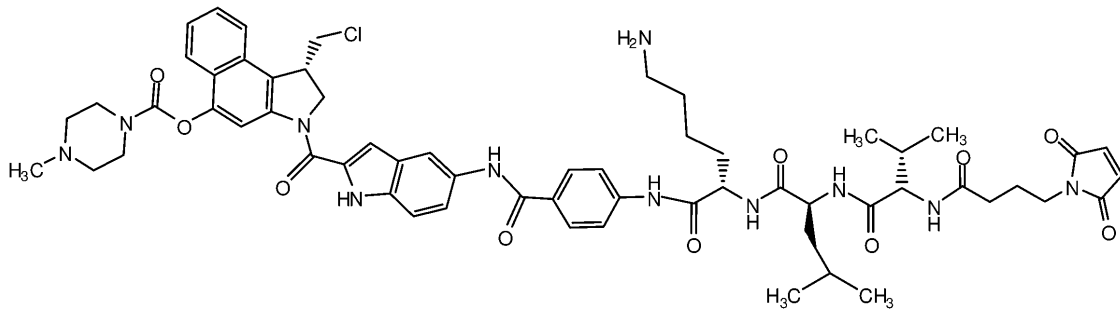
10



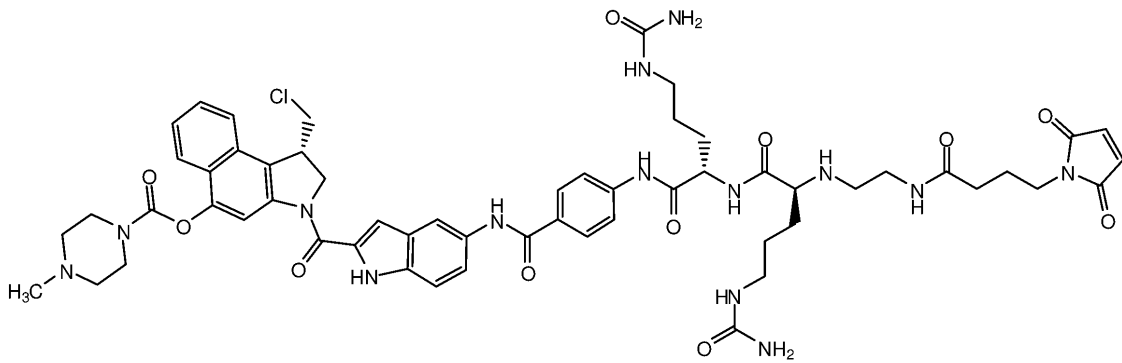
20



10

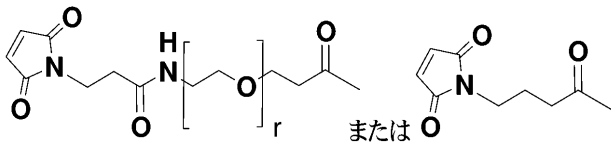


20



30

が挙げられ、ここで R は

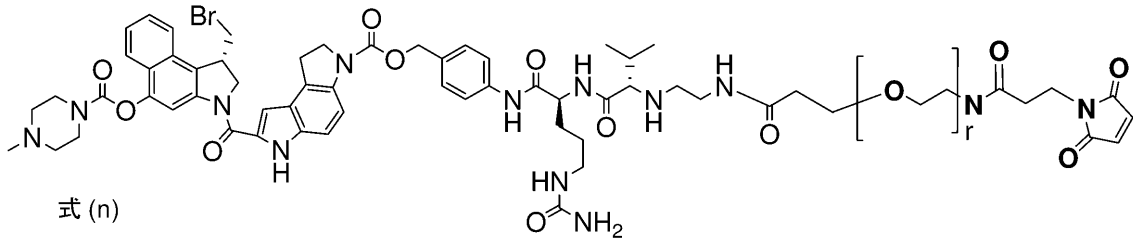
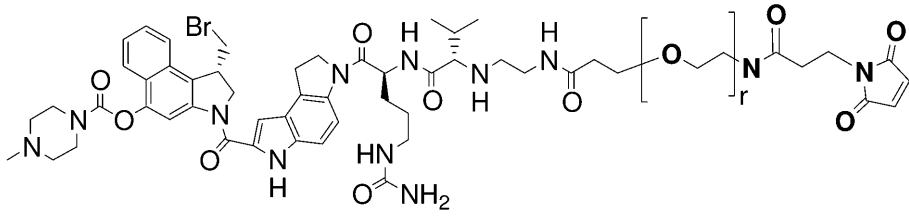


であり、かつ r は 0 ~ 24 の範囲内の整数である。

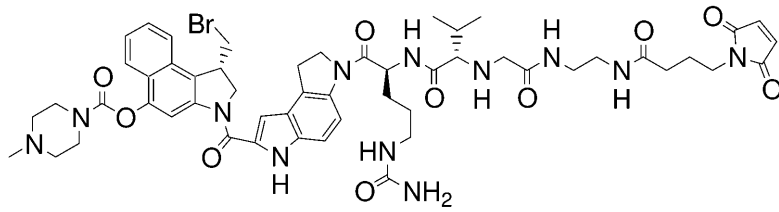
【0428】

複合体はまた、構造 (g)、例えば化合物：

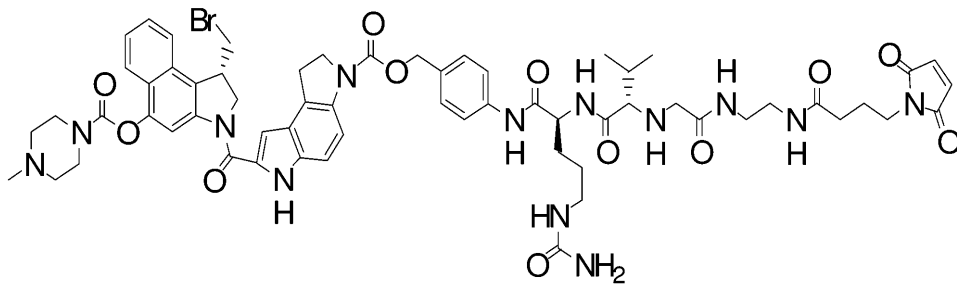
40



10

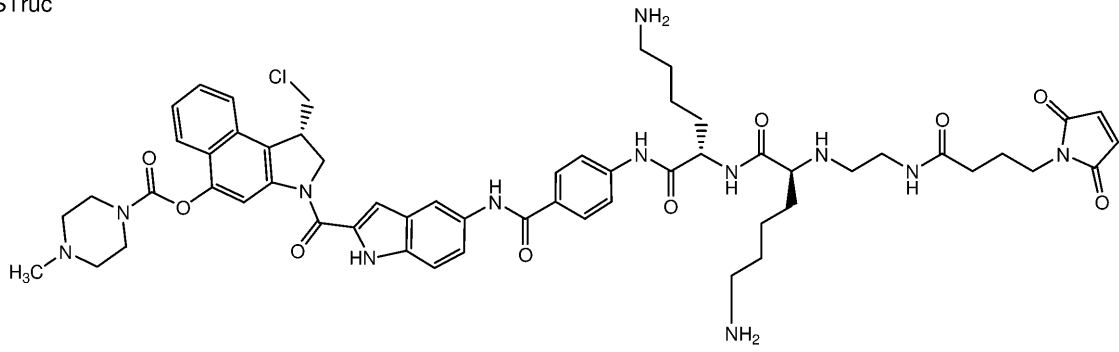


20

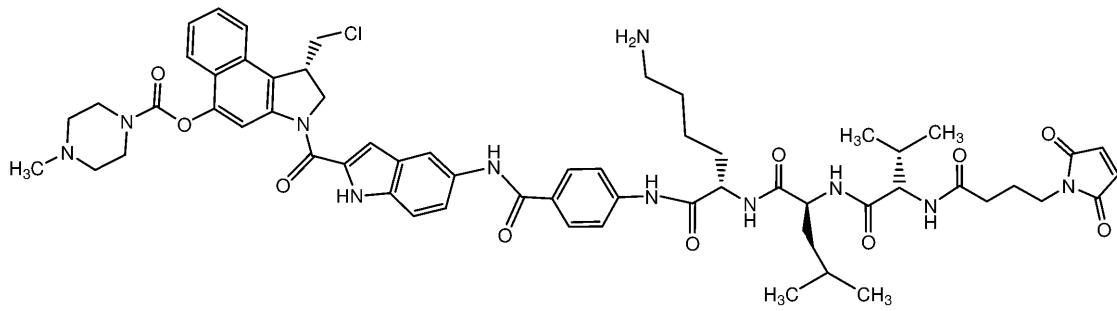


30

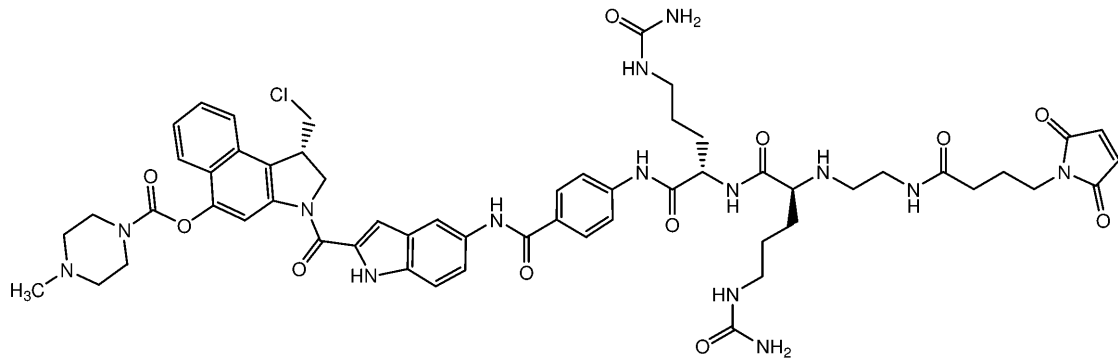
STruc



10



20

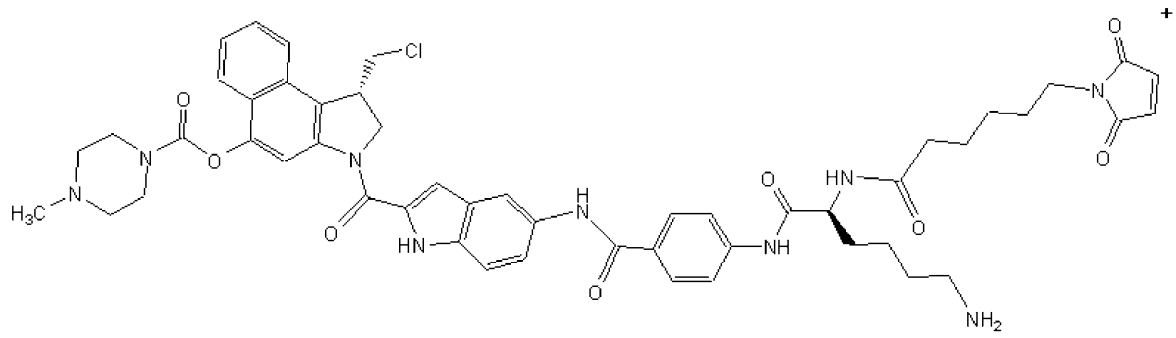


30

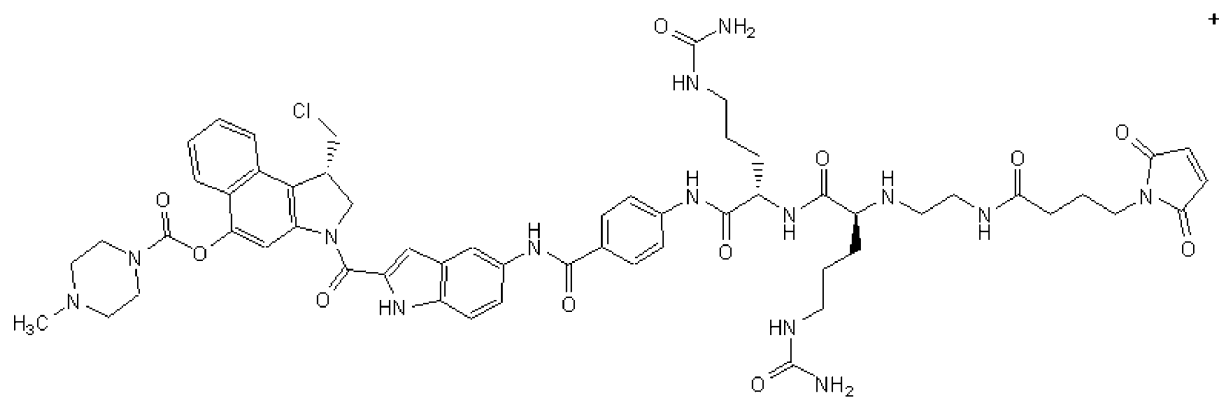
を有する薬剤を用いて形成可能であり、ここで r は 0 ~ 24 の範囲内の整数である。

【0429】

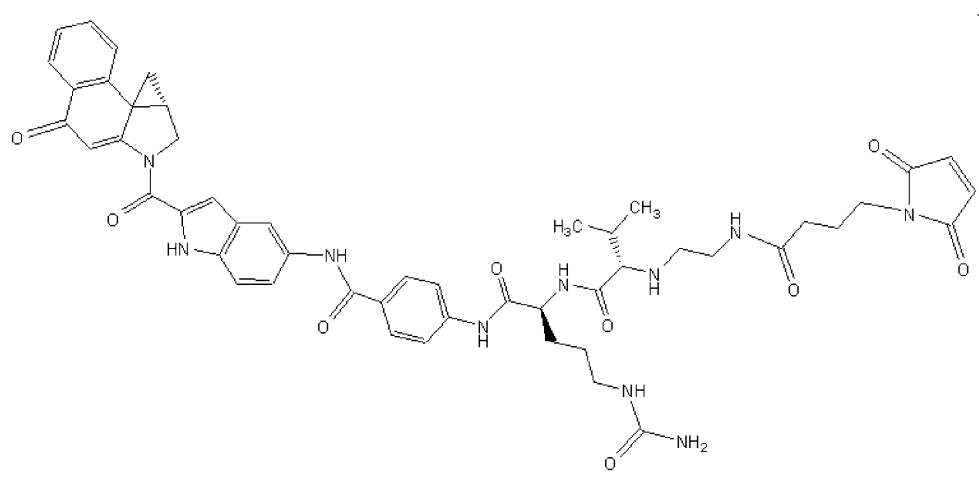
複合体はまた、構造：



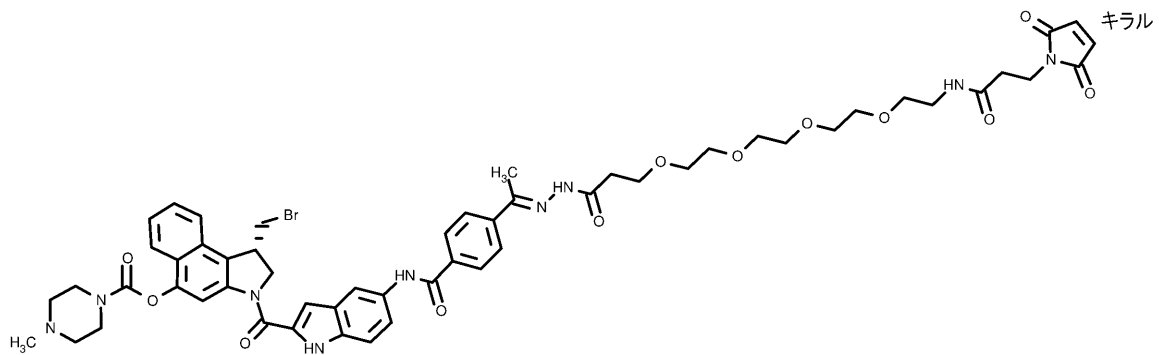
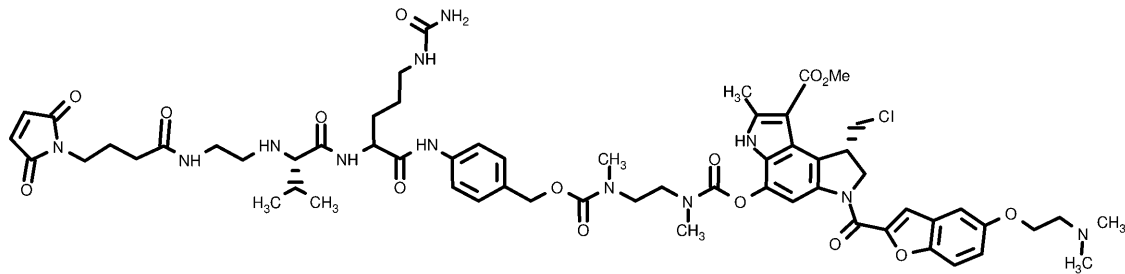
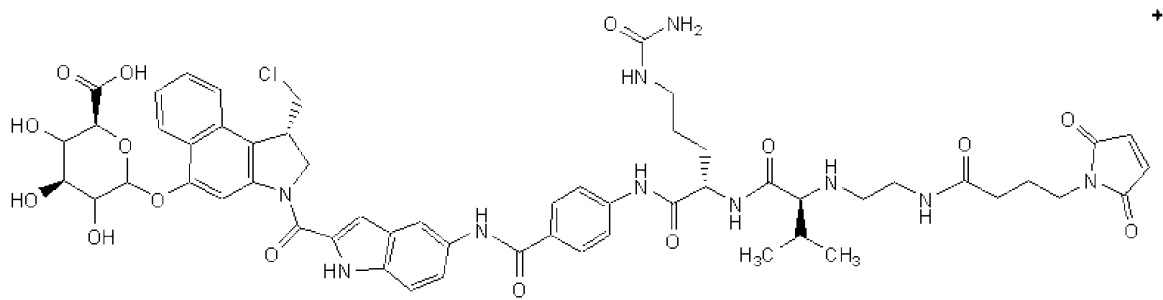
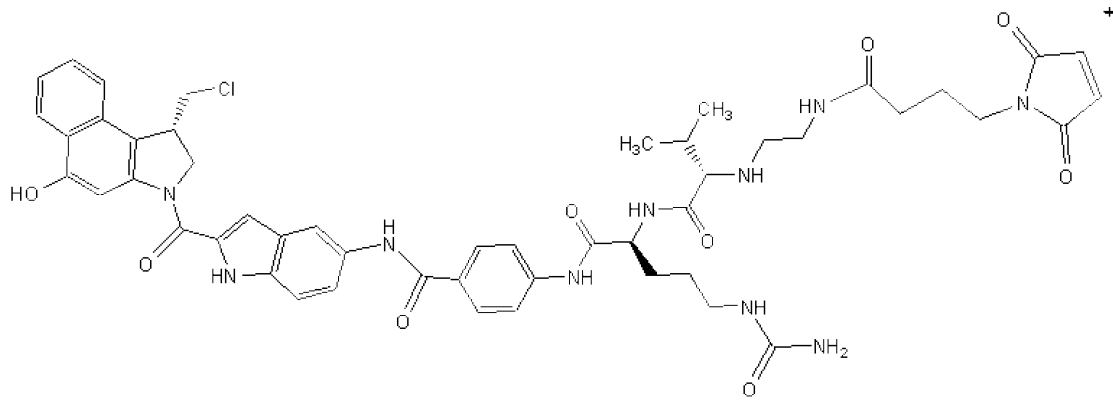
10



20

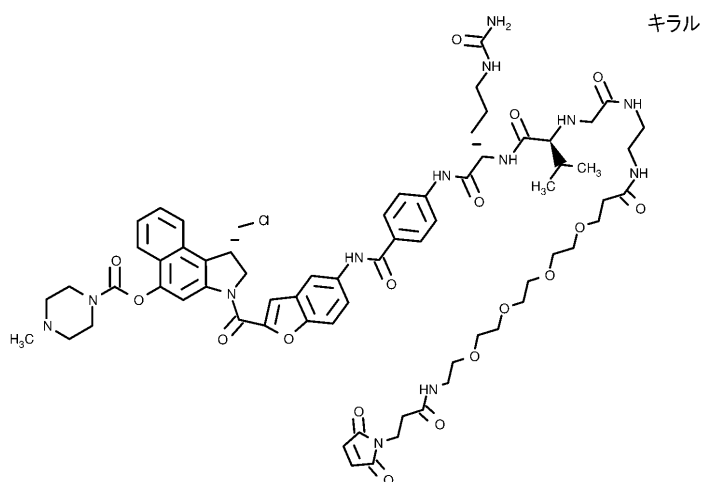


30



および

キラル



10

を有する薬剤を用いて形成されうる。

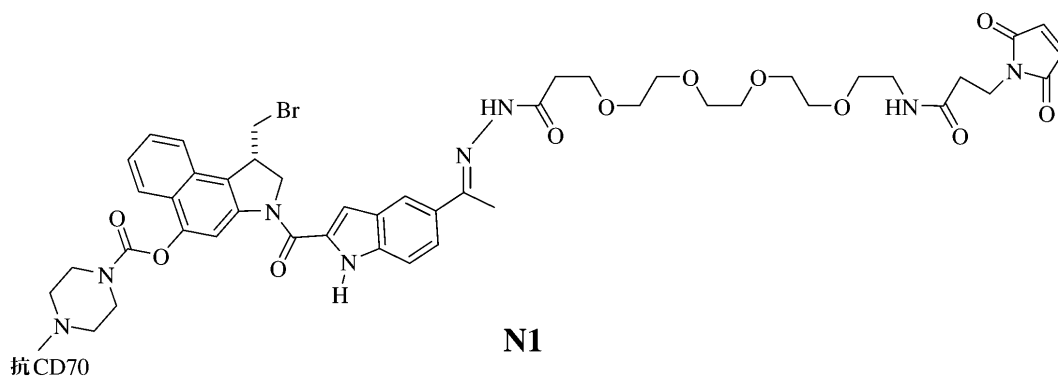
【0430】

かかる毒素の合成に加え、抗体へのその結合に関する詳細が、2007年11月30日に出願された米国仮特許出願第60/991,300号明細書に開示されている。

【0431】

特定の実施形態では、抗CD70は、構造N1のリンカーおよび治療剤に複合される。

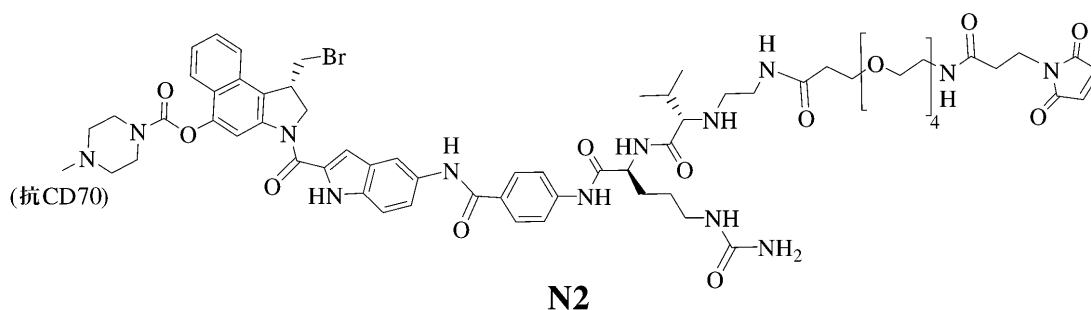
20



【0432】

30

特定の実施形態では、抗CD70は、構造N2のリンカーおよび治療剤に複合される。

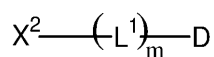


40

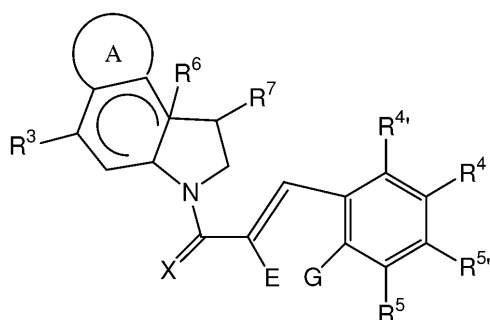
【0433】

B. 切断可能なリンカー複合体

適切な複合体の一例が、構造：



を有する化合物であり、ここで L^1 は自己犠牲スペーサーであり、 m は 0、1、2、3、4、5、もしくは 6 の整数であり； X^2 は切断可能な基質であり；かつ D は構造：



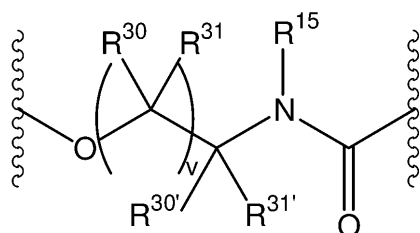
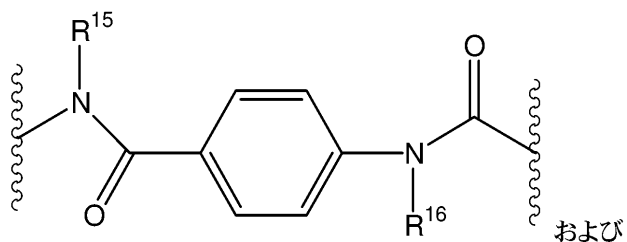
を含み、ここで環系 A は、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーであり； E および G は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、ヘテロ原子、単結合から独立して選択されるメンバーであるか、または E および G は結合し、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリールおよび置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系が形成され； X は O、S および NR^2 から選択されるメンバーであり； $\text{R}^{2,3}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、およびアシルから選択されるメンバーであり； R^3 は (= O)、 $\text{SR}^{1,1}$ 、 $\text{NHR}^{1,1}$ および $\text{OR}^{1,1}$ からなる群より選択されるメンバーであり、ここで $\text{R}^{1,1}$ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換ヘテロアルキル、未置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホン酸塩、アシル、 $\text{C}(\text{O})\text{R}^{1,2}\text{R}^{1,3}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{1,2}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{1,2}\text{R}^{1,3}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{1,2})_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{1,2}\text{R}^{1,3}$ 、 $\text{SR}^{1,2}$ および $\text{SiR}^{1,2}\text{R}^{1,3}\text{R}^{1,4}$ からなる群より選択されるメンバーであり、ここで $\text{R}^{1,2}$ 、 $\text{R}^{1,3}$ 、および $\text{R}^{1,4}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは未置換アリールから独立して選択されるメンバーであり、ここで $\text{R}^{1,2}$ および $\text{R}^{1,3}$ はそれらの結合対象である窒素または炭素原子とともに場合により結合し、4 ~ 6 員を有し、場合により 2 つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され； R^6 は存在するかまたは存在しない単結合であり、存在する場合、 R^6 および R^7 は結合し、シクロプロピル環が形成され；かつ R^7 は R^6 と前記シクロプロピル環内で $\text{CH}_2 - \text{X}^1$ もしくは $-\text{CH}_2 -$ で結合され、ここで X^1 は脱離基であり、 R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 および $\text{R}^{5'}$ は、H、置換アルキル、未置換アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、未置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $\text{NR}^{1,5}\text{R}^{1,6}$ 、 $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{1,5}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{1,5}\text{R}^{1,6}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{1,5}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{R}^{1,5}$ 、 $\text{SR}^{1,5}$ 、 $\text{OR}^{1,5}$ 、 $\text{CR}^{1,5} = \text{NR}^{1,6}$ 、および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$ からなる群より独立して選択されるメンバーであるか、または R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 および $\text{R}^{5'}$ の任意の隣接対はそれらの結合対象である炭素原子とともに結合し、4 ~ 6 員を有する置換もしくは未置換シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル環系が形成され、ここで n は 1 ~ 20 の整数であり； $\text{R}^{1,5}$ および $\text{R}^{1,6}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、および置換もしくは未置換ペプチジルから独立して選択され、ここで $\text{R}^{1,5}$ および $\text{R}^{1,6}$ はそれらの結合対象である窒素原子とともに場合により結合し、4 ~ 6 員を有し、場合により 2 つ以上のヘテロ原子を有する置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル環系が形成され、ここで R^4 、 $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 および $\text{R}^{5'}$ のメンバーうちの少なくとも 1 つは前記薬剤を L^1 (存在する場合) または X^2 に結合させ、かつ

10

20

30

40



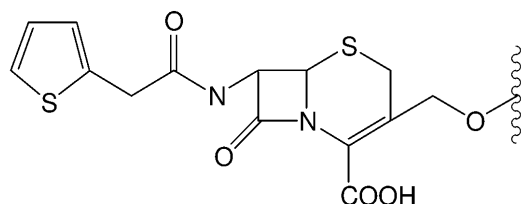
10

からなる群より選択され、ここで R^{30} 、 $R^{30'}$ 、 R^{31} 、および $R^{31'}$ は、H、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、および置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキルから独立して選択され；かつ v は1～6の整数である。

【0434】

適切な切断可能なリンカーの例として、 $-AlaLeuAlaLeu$ （配列番号92）および

20



が挙げられる。

【0435】

医薬組成物

別の態様では、本開示は、組成物、例えば薬学的に許容できる担体とともに調合された本開示のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分のうちの1つまたは組み合わせを含有する医薬組成物を提供する。かかる組成物は、本開示の（例えば2種もしくは3種以上の異なる）抗体または免疫複合体または二重特異性分子のうちの1つまたはそれらの組み合わせを含有しうる。例えば、本開示の医薬組成物は、標的抗原上で異なるエピトープに結合するかまたは相補的活性を有する抗体（または免疫複合体または二重特異性抗体）の組み合わせを含有しうる。

30

【0436】

本開示の医薬組成物は、併用療法、すなわち他の作用物質との併用であっても投与可能である。例えば、併用療法は、本開示の抗CD70抗体と、少なくとも1つの他の抗癌剤、抗炎症物質または免疫抑制剤との併用を含みうる。併用療法で用いられうる治療物質の例が、本開示の抗体の使用に関する下記セクションにおいてより詳細に記載される。

40

【0437】

本明細書で用いられる「薬学的に許容できる担体」は、生理学的に適合可能な、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば注射または注入による）に適する。投与経路に依存し、活性化合物、すなわち抗体、免疫複合体または二重特異性分子は、化合物を酸の活性および化合物を不活性化しうる他の天然条件から保護するための材料でコートされうる。

【0438】

本開示の医薬化合物は、1つ以上の薬学的に許容できる塩を含む。「薬学的に許容でき

50

る塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持する塩を示し、任意の望ましくない毒物学的効果を与えることがない（例えば、Berger, S. M.ら（1977年）、J. Pharm. Sci. 66: 1 - 19頁を参照）。かかる塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩は、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸や、脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸から誘導される塩を含む。塩基付加塩は、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどや、非毒性有機アミン、例えばN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどから誘導される塩を含む。

10

【0439】

本開示の医薬組成物は、薬学的に許容できる酸化防止剤も含有しうる。薬学的に許容できる酸化防止剤の例として、（1）水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（2）油性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、トコフェロールなど；および（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン4酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが挙げられる。

【0440】

本開示の医薬組成物中に用いられうる適切な水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール（グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油ならびに注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられる。適切な液性が、例えば、コーティング材料、例えばレシチンの使用、分散の場合に必要な粒径の維持ならびに界面活性剤の使用により維持されうる。

20

【0441】

これらの組成物は、防腐剤、浸潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントも含有しうる。微生物の出現の防止は、滅菌法と、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの封入との双方により保証されうる。組成物中に等張剤、例えば糖、塩化ナトリウムなどを含めることも望ましい場合がある。さらに、注射可能な医薬形態の吸収遅延がモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる作用物質の封入によりもたらされうる。

30

【0442】

薬学的に許容できる担体は、注射可能な無菌溶液または分散系の即時調製のための無菌水溶液または分散系および無菌粉末を含む。医薬活性物質におけるかかる媒体および作用物質の使用については当該技術分野で既知である。任意の従来媒体または作用物質が活性化合物と混合できない場合を除き、本開示の医薬組成物におけるそれらの使用が検討される。補助活性化合物も組成物中に組み込み可能である。

【0443】

治療組成物は、典型的には製造および保存の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、高い薬物濃度に適する溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは他の規則的構造として調合されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散系でありうる。適切な液性が、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散の場合に必要な粒径の維持ならびに界面活性剤の使用により維持されうる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコールまたは塩化ナトリウムを含めることが好ましいことになる。注射可能な組成物の遅延された吸収は、組成物中に吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによりもたらされうる。

40

【0444】

50

注射可能な無菌溶液は、必要に応じ、上掲の原料の1つもしくは組み合わせを有する適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、その後滅菌および精密濾過を施すことにより調製されうる。一般に、分散系は、塩基性分散系および上掲の原料由来の必要な他の原料を含有する無菌溶媒に活性化化合物を組み込むことにより調製される。注射可能な無菌溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分の粉末に加え任意の所望の追加原料をその予め無菌濾過された溶液から生成する真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【0445】

担体材料と組み合わせることで単一の剤形を生成可能な活性成分の量は、治療される対象および特定の投与方法に依存して変化することになる。単一の剤形を生成するための担体材料と併用可能な活性成分の量は、一般に治療効果をもたらす組成物の量となる。一般に、この量は、薬学的に許容できる担体との併用で、100%のうち、活性成分の約0.01%～約99%、好ましくは活性成分の約0.1%～約70%、最も好ましくは活性成分の約1%～約30%の範囲となる。

10

【0446】

投与計画を調節することで最適な所望の応答（例えば治療応答）がもたらされる。例えば、単回ボラスが投与されうるか、数回の分割用量が長期にわたり投与されうるかまたは同用量が治療状況の要件で示されるように比例的に漸減または増加されうる。投与の容易さおよび用量の均一性を意図し、非経口組成物を投与単位形態で調製することが特に有利である。本明細書で用いられる投与単位形態は、試験されるべき対象に対する単一の用量として適合する物理的に別々の単位であり、各単位は必要とされる医薬担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された既定量の活性化化合物を有する。本開示の投与単位形態における仕様は、(a)活性化化合物固有の特性および達成されるべき特定の治療効果と、(b)個体における感受性を治療するためにかかる活性化化合物を配合する当該技術分野に内在する制限により決定づけられ、かつそれらに直接依存している。

20

【0447】

抗体の投与においては、用量は、宿主体重の約0.0001～100mg/kg、およびより一般的には0.01～25mg/kgの範囲である。例えば用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重もしくは10mg/kg体重または1-10mg/kgの範囲内であってもよい。必要に応じて、例えば、15mg/kg体重、20mg/kg体重または25mg/kg体重といったより高い用量を使用することができる。典型的な治療計画では、毎週1回、2週ごとに1回、3週ごとに1回、4週ごとに1回、1か月に1回、3か月ごとに1回または3～6か月ごとに1回の投与が必要とされる。本開示の抗CD70抗体に対する特定の投与計画は、抗体の静脈内投与を介した1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、ここで抗体は(i)6回投与を4週ごと、次いで3か月ごと；(ii)3週ごと；(iii)1回の3mg/kg体重、次いで3週ごとに1mg/kg体重といった投与計画のうちの1つを用いて投与される。

30

【0448】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する、本開示の2つ以上の抗CDモノクローナル抗体が同時投与され、いずれの場合でも投与される各抗体の用量は指定範囲内に含まれる。多くの場合、抗体が通常投与される。単回投与間の間隔は、例えば、週単位、月単位、3か月単位または年単位であってもよい。患者における抗体の標的抗原に対する血中濃度の測定により示されるように、間隔は不規則であってもよい。用量は、ある方法では約1～1000μg/ml、またある方法では約25～300μg/mlの血漿抗体濃度を得るように調節される。

40

【0449】

あるいは、抗体は徐放製剤として投与可能であり、いずれの場合でも低頻度の投与が必要とされる。用量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変化する。一般に、ヒト抗体は最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体がそれに続

50

く。投与の用量および頻度は、治療が予防的であるかまたは治療的であるかに依存して変化しうる。予防的適用においては、比較的低用量が長期にわたり比較的低頻度の間隔で投与される。一部の患者が、余生にわたって治療を受け続けている。治療的適用においては、疾患の進行が低下または終結されるまで、好ましくは患者が疾患の徴候の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短い間隔で比較的高用量が必要とされる場合がある。その後、患者は予防計画通りに投与されうる。

【0450】

異常な細胞増殖に関連する疾患の予防および/または治療での使用においては、約0.001 μ M ~ 20 μ Mの投与化合物の血中濃度が好ましく、ここで約0.01 μ M ~ 5 μ Mが好ましい。

【0451】

本明細書中に記載の化合物の経口投与における患者への用量は、典型的には約1 mg / 日 ~ 約10,000 mg / 日、より典型的には約10 mg / 日 ~ 約1,000 mg / 日、および最も典型的には約50 mg / 日 ~ 約500 mg / 日の範囲である。患者の体重について述べると、典型的用量は、約0.01 ~ 約150 mg / kg / 日、より典型的には約0.1 ~ 約15 mg / kg / 日、および最も典型的には約1 ~ 約10 mg / kg / 日、例えば5 mg / kg / 日または3 mg / kg / 日の範囲である。

【0452】

少なくとも一部の実施形態では、腫瘍成長を遅らせるかまたは阻害する患者への用量は1 μ mol / kg / 日以下であってもよい。例えば、患者への用量は、(薬剤のモルについては)0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.45、0.3、0.2、0.15、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01もしくは0.005 μ mol / kg以下であってもよい。好ましくは、抗体-薬剤複合体は、少なくとも5日間にわたり日用量で投与される場合、腫瘍の成長を遅らせる。少なくとも一部の実施形態では、腫瘍はSCIDマウスにおけるヒト型腫瘍である。例として、SCIDマウスは(Taconic (Germantown, NY)から入手可能な)CB17.SCIDマウスであってもよい。

【0453】

本開示の医薬組成物中での活性成分の実際の用量レベルは、患者に毒性をもたらすことなく、特定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を得るのに有効な活性成分の量を得るように変化しうる。選択される用量レベルは、用いられる本開示の特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、用いられる特定の化合物の投与経路、投与時間、排出速度、用いられる特定の組成物と併用される治療薬、他の薬物、化合物および/または材料の持続時間、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および過去の病歴、ならびに医療において周知の要素のようなものを含む種々の薬物動態学的因子に依存することになる。

【0454】

本開示の抗CD70抗体の「治療的有效用量」は、好ましくは疾患徴候の重症度の低下、疾患徴候のない期間の頻度および持続時間の増大あるいは疾患の苦しみに起因する機能障害または身体障害の予防をもたらす。例えば、CD70⁺腫瘍の治療における「治療的有效用量」は、好ましくは細胞成長または腫瘍成長を、未治療の対象に対し、少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、およびさらにより好ましくは少なくとも約80%阻害する。化合物の腫瘍成長に対する阻害能は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価可能である。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の細胞成長に対する阻害能の試験により評価可能であり、かかる阻害は当業者に既知のアッセイによりインビトロで測定可能である。治療有効量の治療化合物により、腫瘍サイズが低減しうるかまたはそうでなくても対象における徴候が改善しうる。当業者であれば、対象の大きさ、対象の徴候の重症度および選択された投与における特定の組成物または経路などの要素に基づき、かかる量を決定できるであろう。

10

20

30

40

50

【0455】

本開示の組成物は、種々の当該技術分野で既知の方法のうちの一つ以上を用い、一つ以上の投与経路を介して投与されうる。当業者に理解されるように、投与の経路および/または方法は所望の結果に応じて変化することになる。本開示の抗体における好ましい投与経路は、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路、例えば注射もしくは注入によるものを含む。本明細書で用いられる「非経口投与」という語句は、経腸および局所投与以外の投与方法、通常は注射によるものを意味し、限定はされないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内への注射および注入を含む。

10

【0456】

あるいは、本開示の抗体は、非経口でない(non-parenteral)経路、例えば局所経路、表皮または粘膜の投与経路を介し、例えば、経鼻的、経口的、経腔的、経直腸的、舌下的または局所的に投与されうる。

【0457】

活性化化合物は、迅速な放出に対する化合物、例えばインプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤を保護することになる担体とともに調製されうる。生体分解性、生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸が用いられうる。かかる製剤を調製するための多数の方法が特許化されているかまたは一般に当業者に既知である。例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」、J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc.、ニューヨーク(New York)、1978年を参照のこと。

20

【0458】

治療組成物は、当該技術分野で既知の医療器具を用いて投与可能である。例えば、好ましい実施形態では、本開示の治療組成物は、ニードルレス皮下注射器具、例えば米国特許第5,399,163号明細書;米国特許第5,383,851号明細書;米国特許第5,312,335号明細書;米国特許第5,064,413号明細書;米国特許第4,941,880号明細書;米国特許第4,790,824号明細書;または米国特許第4,596,556号明細書に開示された器具を用いて投与可能である。本開示において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例として、薬物を制御された速度で投与するための埋め込み式マイクロ注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号明細書、皮膚を通して薬剤(medicants)を投与するための治療器具を開示する米国特許第4,486,194号明細書、薬物を正確な注入速度で送達するための薬物注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号明細書、連続的な薬物送達のための流量可変型の埋め込み式注入装置を開示する米国特許第4,447,224号明細書、マルチチャンバ式の区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号明細書、ならびに浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号明細書が挙げられる。これらの特許は参照により本明細書中に援用される。多数の他のかかるインプラント、送達システムおよびモジュールは当業者に既知である。

30

40

【0459】

特定の実施形態では、本開示のヒトモノクローナル抗体を調合し、インビボで適切な分布を保証することが可能である。例えば、血液脳関門(BBB)は多数の親水性の高い化合物を排除する。(必要に応じて)本開示の治療化合物がBBBを通過することを保証するため、それらを例えばリポソームの形で調合してもよい。リポソームを作製する方法については、例えば米国特許第4,522,811号明細書;米国特許第5,374,548号明細書;および米国特許第5,399,331号明細書を参照のこと。リポソームは特定の細胞または器官に選択的に輸送される一つ以上の部分を含みうることから、標的化された薬剤送達が進められる(例えば、V. V. Rana (1989年) J. C. Li

50

n . P h a r m a c o l . 2 9 : 6 8 5 頁を参照)。典型的な標的化部分は、葉酸塩またはビオチン（例えばLowらに交付された米国特許第5,416,016号明細書を参照）；マンノシド（Umezawaraら（1988年）Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038頁）；抗体（P.G. Bloemanら（1995年）FEBS Lett. 357:140頁；M. Owaisら（1995年）Antimicrob. Agents Chemother. 39:180頁）；界面活性剤のブドウ糖受容体（Briscoeら（1995年）Am. J. Physiol. 1233:134頁）；p120（Schreierら（1994年）J. Biol. Chem. 269:9090頁）を含み、K. Keinänen；M. L. Laukkanen（1994年）FEBS Lett. 346:123頁；J. J. Killion；I. J. Fidler（1994年）Immunomethods 4:273頁も参照のこと。

10

【0460】

本開示の使用および方法

本開示の抗体、特にヒト抗体、抗体組成物、抗体 - パートナー分子複合体組成物および方法は、CD70 媒介性障害の診断および治療を含む、極めて多数のインビトロおよびインビボでの診断的および治療的有用性を有する。例えば、これらの分子を、インビトロまたは生体外で培地内の細胞にまたは例えばインビボでヒト対象に投与し、種々の障害を治療し、予防し、かつ診断してもよい。本明細書で用いられる「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むように意図されている。「非ヒト動物」は、あらゆる脊椎動物、例えば哺乳類および非哺乳類、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類および爬虫類を含む。好ましい対象は、CD70 活性に媒介されるかまたは調節される障害を有するヒト患者を含む。本方法は、異常なCD70の発現を伴う疾患を有するヒト患者の治療に特に適する。CD70 に対する抗体 - パートナー分子複合体が別の作用物質とともに並行投与される場合、2者においては順次投与または同時投与のいずれでもよい。

20

【0461】

本開示の抗体のCD70 に対する特異的結合を仮定すると、本開示の抗体を用い、細胞の表面上でのCD70の発現の特異的検出が可能であり、さらにそれを用い、免疫親和性精製を介したCD70の精製が可能である。

30

【0462】

CD70は、腎細胞癌、転移性乳癌、脳腫瘍、白血病、リンパ腫および鼻咽腔癌を含む種々のヒト癌において発現される（Junkerら（2005年）J Urol. 173:2150-3頁；Sloanら（2004年）Am J Pathol. 164:315-23頁；Held-FeindtおよびMentlein（2002年）Int J Cancer 98:352-6頁；Hishimaraら（2000年）Am J Surg Pathol. 24:742-6頁；Lensら（1999年）Br J Haematol. 106:491-503頁）。抗CD70抗体を単独で用い、癌性腫瘍の成長を阻害することが可能である。あるいは、下記のように、抗CD70抗体を他の免疫原性物質、標準の癌治療薬または他の抗体と併用することが可能である。

40

【0463】

成長が本開示の抗体を用いて阻害可能な好ましい癌は、典型的には免疫療法に応答性がある癌を含む。治療にとって好ましい癌の非限定例として、腎癌（例えば腎細胞癌）、乳癌、脳腫瘍、急性脊髄性白血病、慢性脊髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性または急性白血病、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫、T細胞リンパ腫）、および鼻咽腔癌が挙げられる。本開示の方法を用いて治療可能な他の癌の例として、メラノーマ（例えば転移性悪性黒色腫）、前立腺癌、大腸癌、肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、睾丸癌、ファロピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、陰癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲

50

状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児固形腫瘍、膀胱癌、腎臓癌または尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）腫瘍、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍（spinal axis tumor）、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、例えば中皮腫などアスベストにより誘発される癌を含む環境的に誘発される癌（environmentally induced cancers）、ならびに前記癌の併発が挙げられる。

【0464】

さらに、様々な腫瘍細胞上でのCD70の発現を仮定すると、本開示のヒト抗体、抗体組成物および方法を用い、発癌性疾患、例えば、腎細胞癌（RCC）、例えば明細胞RCC、グリア芽腫、乳癌、脳腫瘍、鼻咽腔癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、パーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）、多発性骨髄腫、皮膚T細胞リンパ腫、結節性小切れ込み細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T細胞白血病/リンパ腫（ATLL）、成人T細胞白血病（T-ALL）、中心芽細胞性/中心細胞性（cb/cc）濾胞性リンパ腫、B細胞系のびまん性大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症（AILD）様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔に基づくリンパ腫、胎生期癌、鼻咽腔の未分化癌（例えばシュミンケ腫瘍）、キャスルマン病、カボジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストロームマクログロブリン血症、および他のB細胞リンパ腫を含む、例えばCD70を発現する腫瘍細胞の存在により特徴づけられる疾患を有する対象の治療が可能である。

【0465】

したがって、一実施形態では、本開示は、対象における腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、対象に治療有効量の抗CD70抗体またはその抗原結合部分を投与する工程を含む、方法を提供する。好ましくは、抗体はヒト抗CD70抗体（本明細書中に記載のヒト抗ヒトCD70抗体のいずれかなど）である。さらにまたはその他として、抗体はキメラまたはヒト化抗CD70抗体でありうる。

【0466】

さらに、CD70とCD27の相互作用は、細胞媒介性自己免疫疾患、例えば実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に関与することが提示されている（Nakajimaら（2000年）J. Neuroimmunol. 109: 188-96頁）。この効果は、TNF- α の産生の阻害により部分的に媒介されると考えられた。さらに、CD70シグナル伝達の遮断は、CD8⁺T細胞のCD40媒介性のクローン性増殖を阻害し、CD8⁺メモリーT細胞の生成を低下させる（Tarabanaら（2004年）J. Immunol. 173: 6542-6頁）。そのようなものとして、本開示のヒト抗体、抗体組成物および方法を用い、自己免疫疾患、例えばCD70を発現するB細胞の存在により特徴づけられる疾患（例えば実験的自己免疫性脳脊髄炎を含む）を有する対象の治療が可能である。本開示の抗体の使用が可能ならなる自己免疫疾患は、限定はされないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、インスリン依存性糖尿病（IDDM）、炎症性腸疾患（IBD）（クローン病、潰瘍性大腸炎およびセリアック病を含む）、多発性硬化症（MS）、乾癬、自己免疫性甲状腺炎、関節リウマチ（RA）および糸球体腎炎を含む。さらに、移植拒絶反応の阻害または予防あるいは移植片対宿主病（GVHD）の治療において、本開示の抗体組成物の使用が可能である。

【0467】

さらに、CD70とCD27の相互作用はまた、CD4⁺T細胞上でのシグナル伝達に関与することが提示されている。一部のウイルスが、CD27経路でのシグナル伝達により、中和抗体応答の破壊をもたらすことが示されている（Matterら（2006年）J. Exp. Med. 203: 2145-55頁）。そのようなものとして、本開示のヒト抗体、抗体組成物および方法は、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、（A型、B型、およびC型）肝炎、ヘルペスウイルス、（例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-IIおよびCMV、エプスタインバーウイルス）、アデノウイルス、インフ

10

20

30

40

50

ルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス (coronavirus)、呼吸器合胞体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、種痘ウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、モルスカムウイルス (molluscum virus)、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルスおよびアルボウイルス脳炎ウイルスおよびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) からの感染を含むウイルス感染を有する対象の治療かまたは HIV 感染症 / AIDS の治療において用いられうる。さらに、本開示のヒト抗体、抗体組成物および方法を用い、TNF- の産生の阻害が可能である。

【0468】

一実施形態では、本開示の抗体 (例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性および二重特異性分子ならびに組成物) を用い、CD70 のレベルまたは膜表面上に CD70 を有する細胞のレベルの検出が可能であり、ここでは同レベルは特定の疾患徴候に関連しうる。あるいは、抗体を用い、CD70 の機能の阻害または遮断が可能であり、ここでは同機能は特定の疾患徴候の予防または改善に関連する可能性があることから、CD70 は疾患のメディエーターとして関与している。これは、実験試料および対照試料を抗 CD70 抗体と、抗体と CD70 との間での複合体の形成を可能にする条件下で接触させることによりなされうる。抗体と CD70 との間で形成される任意の複合体が検出され、それは実験試料および対照において比較される。

【0469】

別の実施形態では、本開示の抗体 (例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子ならびに組成物) の、治療用途または診断用途に関連した結合活性についてはインビトロで最初に試験されうる。例えば、本開示の組成物は、下記の実施例に記載のフローサイトメトリーアッセイを用いて試験可能である。

【0470】

本開示の抗体 (例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子、免疫複合体ならびに組成物) は、CD70 関連疾患の治療および診断においてさらなる有用性を有する。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性または二重特異性分子および免疫複合体を用い、CD70 を発現する細胞の、成長の阻害および / または死滅、ヒトエフェクター細胞の存在下での CD70 を発現する細胞の食作用または ADC C の媒介、または CD70 リガンドの CD70 への結合の遮断といった生物学的活性のうちの 1 つ以上のインビボまたはインビトロでの誘発が可能である。

【0471】

特定の実施形態では、抗体 (例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子ならびに組成物) をインビボで用い、種々の CD70 関連疾患の治療、予防または診断がなされる。CD70 関連疾患の例として、特に、自己免疫疾患、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、腎細胞癌 (RCC)、例えば明細胞 RCC、グリア芽腫、乳癌、脳腫瘍、鼻咽腔癌、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、パーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫 (ALCL)、多発性骨髄腫、皮膚 T 細胞リンパ腫、結節性小切れ込み細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢 T 細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T 細胞白血病 / リンパ腫 (ATLL)、成人 T 細胞白血病 (T-ALL)、中心芽細胞性 / 中心細胞性 (cb / cc) 濾胞性リンパ腫、B 細胞系のびまん性大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症 (AILD) 様 T 細胞リンパ腫、HIV 関連体腔に基づくリンパ腫、胎生期癌、鼻咽腔の未分化癌 (例えばシュミンケ腫瘍)、キャスルマン病、カボジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストロームマクログロブリン血症、および他の B 細胞リンパ腫が挙げられる。

【0472】

本開示の抗体組成物 (例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体) をインビボおよびインビトロで投与する適切な経路は当該技術分野で周知であり、当業者により選択されうる。例えば、抗体組成物を注射 (例えば静脈内ま

10

20

30

40

50

たは皮下)により投与してもよい。用いられる分子の適切な用量は、対象の年齢および体重ならびに抗体組成物の濃度および/または調合に依存することになる。

【0473】

上記のように、本開示のヒト抗CD70抗体を、1つ以上の治療物質、例えば細胞毒性物質、放射性毒性物質(radiotoxic agent)または免疫抑制剤と同時投与してもよい。抗体を(免疫複合体としての)作用物質に連結するかまたは作用物質とは別々に投与してもよい。後者(別々の投与)の場合、作用物質の前、後またはそれと同時に抗体を投与するかまたは他の既知の治療、例えば抗癌治療、例えば放射線と併せて同時投与してもよい。かかる治療物質は、特にドキソルビシン(アドリアマイシン)、シスプラチン、プレオマイシン硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシルおよびシクロホスファミドヒドロキシウレア(cyclophosphamide hydroxyurea)などの抗悪性腫瘍薬を含み、それら単独では患者に対して毒性または亜毒性のレベルでのみ有効である。シスプラチンは、4週ごとに1回、100mg/用量で静脈内投与され、アドリアマイシンは、21日ごとに1回、60-75mg/ml用量で静脈内投与される。本開示のヒト抗CD70抗体またはそれらの抗原結合断片と化学療法剤の同時投与は、ヒト腫瘍細胞に細胞毒性効果をもたらす異なる機序を介して作用する2つの抗癌剤を提供する。かかる同時投与は、抗体に反応しなくなる薬剤に対する耐性または腫瘍細胞の抗原性における変化が生じることによる問題を解決しうる。

10

【0474】

標的特異的なエフェクター細胞、例えば本開示の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子)に連結したエフェクター細胞は、治療物質としても用いられうる。標的化のためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球などのヒト白血球でありうる。他の細胞は、好酸球、ナチュラルキラー細胞および他のIgG-もしくはIgA-受容体担持細胞を含む。必要に応じ、エフェクター細胞を試験されるべき対象から得てもよい。標的特異的なエフェクター細胞を生理学的に許容できる溶液中の細胞の懸濁液として投与してもよい。投与される細胞の数は 10^8 - 10^9 程度でありうるが、治療目的に応じて変化することになる。一般に、数は、標的細胞、例えばCD70を発現する腫瘍細胞で局在化を得、かつ例えば食作用による細胞死を有効にするのに十分な数となる。投与経路もまた変化しうる。

20

【0475】

標的特異的なエフェクター細胞による治療を、標的化細胞を除去するための他の技術と併せて行ってもよい。例えば、本開示の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子)および/またはこれらの組成物が備えられたエフェクター細胞を用いる抗腫瘍療法を化学療法と併用してもよい。さらに、併用免疫療法を用い、2つの異なる細胞毒性のあるエフェクター集団を指令し、腫瘍細胞を拒絶することが可能である。例えば、抗FcRIまたは抗CD3に連結された抗CD70抗体は、IgG-またはIgA-受容体に特異的な結合剤と併用可能である。

30

【0476】

本開示の二重特異性および多重特異性分子を用い、エフェクター細胞上のFcRIまたはFcRIレベルの例えば細胞表面上の受容体のキャッピングおよび除去による調節も可能である。抗FcRI受容体の混合物もこの目的で用いられうる。

40

【0477】

補体結合部位、例えば補体に結合するIgG1、IgG2、IgG3、またはIgM由来の部分をも有する本開示の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体)も補体の存在下で用いられうる。一実施形態では、本開示の結合剤および適切なエフェクター細胞による標的細胞を含む細胞の集団の生体外治療は、補体または補体を含む血清の添加により補完されうる。本開示の結合剤でコートされた標的細胞の食作用は補体タンパク質の結合により増進されうる。別の実施形態では、本開示の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子)でコートされた標的細胞も補体により溶解されうる。さらに別の実施形態では、本開示の組成物は補体を活性化すること

50

がない。

【0478】

本開示の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体）はまた、補体とともに投与可能である。したがって、ヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子および血清または補体を含有する組成物は本開示の範囲内に含まれる。これらの組成物は、補体がヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子の近接位置に存在する点で有利である。あるいは、本開示のヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子と補体または血清を別々に投与してもよい。

【0479】

本開示の抗体組成物（例えば、ヒト抗体、二重特異性または多重特異性分子または免疫複合体）と使用説明書を含むキットも本開示の範囲内に含まれる。キットは、1つ以上の追加試薬、例えば免疫抑制試薬、細胞毒性物質または放射性毒性物質あるいは1つ以上の追加の本開示のヒト抗体（例えば、第1のヒト抗体とは異なる、異なるCD70抗原内のエピトープに対して結合する相補活性を有するヒト抗体）をさらに含みうる。

10

【0480】

したがって、本開示の抗体組成物で治療される患者に、別の治療物質、例えばヒト抗体の治療効果を促進または増強する細胞毒性物質または放射性毒性物質を（本開示のヒト抗体の投与の前、投与と同時または投与後に）さらに投与してもよい。

【0481】

他の実施形態では、対象をさらに、Fc またはFc 受容体の発現または活性を調節する、例えば促進または阻害する作用物質で治療する、例えば対象をサイトカインで治療することが可能である。多重特異性分子による治療の間での投与における好ましいサイトカインは、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-）および腫瘍壊死因子（TNF）を含む。

20

【0482】

本開示の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）を用い、Fc RまたはCD70を発現する細胞を、例えばかかる細胞を標識する目的で標的にすることも可能である。かかる使用においては、結合剤を検出可能な分子に連結してもよい。したがって、本開示は、Fc RまたはCD70などのFc受容体を発現する細胞を生体外またはインビトロで局在化するための方法を提供する。検出可能な標識は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素共同因子でありうる。

30

【0483】

特定の実施形態では、本開示は、試料中でのCD70抗原の存在を検出するかまたはCD70抗原の量を測定するための方法であって、試料および対照試料を、CD70に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と、抗体またはその一部とCD70との複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程を含む、方法を提供する。次いで、複合体の形成は検出され、ここで対照試料と比較した場合での試料の複合体形成の差は試料中にCD70抗原が存在することを示す。

【0484】

さらに別の実施形態では、本開示の免疫複合体を用い、化合物（例えば、治療剤、ラベル、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剤など）をかかると化合物の抗体への結合によりCD70細胞表面受容体を有する細胞に対して標的化することが可能である。例えば、抗CD70抗体は、米国特許第6,281,354号明細書および米国特許第6,548,530号明細書、米国仮特許出願第60/991,300号明細書、米国特許出願公開第20030050331号明細書、米国特許出願公開第20030064984号明細書、米国特許出願公開第20030073852号明細書および米国特許出願公開第20040087497号明細書に記載されるかまたは国際公開第03/022806号パンフレットに公開された（これら全体が参照により本明細書中に援用される）細胞毒素化合物のいずれかに複合されうる。したがって、本開示はまた、（例えば検出可能な標識、例えば放

40

50

放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素共同因子を用いて)生体外またはインビボでCD70を発現する細胞を局在化するための方法を提供する。あるいは、免疫複合体を用い、CD70細胞表面受容体を有する細胞を、細胞毒素または放射性毒素をCD70に対して標的化することにより死滅させることが可能である。

【0485】

本開示は、以下の実施例によりさらに例示され、それらはさらに限定するものとして解釈されるべきものではない。本願全体を通して言及されるあらゆる図面およびあらゆる参考文献の内容、Genbank配列、特許および公開された特許出願は、それら全体が参照により本明細書中に明示的に援用される。

【実施例】

【0486】

実施例1. CD70に対するヒトモノクローナル抗体の産生
抗原

免疫プロトコルでは、抗原として二重myc-Hisタグと融合した組換えヒトCD70を用いた。あるいは、腎癌細胞系786-O(ATCC登録番号CRL-1932)を用い、腎癌細胞系A-498(ATCC登録番号HTB-44)で追加免疫した全細胞免疫を一部の免疫で用いた。

【0487】

トランスジェニックHuMab Mouse(登録商標)およびKM Mouse(登録商標)

CD70に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、HuMabトランスジェニックマウスのHC07、HC012およびHC017株とトランスジェニックトランスクロモゾームマウスのKM株(それぞれヒト抗体遺伝子を発現する)を用いて調製した。これらのマウス株においては、内因性マウス軽鎖遺伝子がChenら(1993年)EMBO J. 12:811-820頁に記載のようにホモ接合的に破壊されており、かつ内因性マウス重鎖遺伝子がPCT公開の国際公開第01/09187号パンフレットの実施例1に記載のようにホモ接合的に破壊されている。さらに、このマウス株は、Fishwildら(1996年)Nature Biotechnology 14:845-851頁に記載のヒト軽鎖トランス遺伝子KC05およびPCT公開の国際公開第01/09187号パンフレットの実施例2に記載のヒト重鎖トランス遺伝子HC07、HC012またはHC017を有する。KM Mouse(登録商標)株は、PCT公開の国際公開第02/43478号パンフレットに記載のSC20トランスクロモゾームを有する。

【0488】

HuMabおよびKMの免疫

CD70に対する完全ヒトモノクローナル抗体を産生するため、HuMab Mouse(登録商標)およびKM Mouse(登録商標)のマウスを、抗原としての組換えヒトCD70または細胞表面上のCD70を発現する全細胞で免疫した。HuMabマウスにおける一般的免疫スキームは、Lonberg N.ら(1994年)Nature 368(6474):856-859頁; Fishwild D.ら(1996年)Nature Biotechnology 14:845-851頁およびPCT公開の国際公開第98/24884号パンフレットに記載されている。マウスは抗原の1回目の注入時に6~16週齢であった。5~10x10⁶個の細胞を用い、HuMabマウスを、腹腔内に(IP)、皮下に(SC)または足蹠注射を介して免疫した。

【0489】

トランスジェニックマウスを、完全フロイントまたはRibiaジュバント中の抗原で腹腔内に2回免疫し、3~21日後に不完全フロイントまたはRibiaジュバント中の抗原で腹腔内に免疫した(最大、全部で11回の免疫)。免疫応答を眼窩後方からの採血(retroorbital bleed)により監視した。血漿を(下記のように)ELISAおよびFACSによりスクリーニングし、抗CD70ヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合に用いた。屠殺および脾臓の摘出の3日前、マウスの静脈内

10

20

30

40

50

に抗原で追加免疫した。典型的には、各抗原に対して10～35回の融合を行った。数十匹のマウスに対し、各抗原を免疫した。

【0490】

抗CD70抗体を産生するHuMab Mouse（登録商標）またはKM Mouse（登録商標）の選択

CD70に結合した抗体を産生するHuMab Mouse（登録商標）またはKM Mouse（登録商標）を選択するため、免疫マウス由来の血清の、組換えヒトCD70を発現する細胞系に結合してもCD70を発現しない対照細胞系に結合しないことについてフローサイトメトリーによりスクリーニングした。さらに、血清の786-OまたはA-498細胞への結合についてフローサイトメトリーによりスクリーニングした。つまり、抗CD70抗体の結合を、CD70発現CHO細胞、786-O細胞またはA498細胞を1:20の希釈で抗CD70抗体とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー（Becton Dickinson、San Jose、CA）を用いて行った。CD70発現CHO細胞に結合してもCD70を発現しない親CHO細胞に結合しない抗体のCD70への結合について、Fishwild D.ら（1996年）に記載のようにELISAによりさらに試験した。つまり、マイクロタイプレートを、PBS中1～2μg/mlでの形質移入CHO細胞由来の精製組換えCD70融合タンパク質でコートし、100μl/ウェルを4で一晚インキュベートし、次いでPBS/Tween（0.05%）中、200μl/ウェルの5%ニワトリ血清でブロックした。CD70免疫マウス由来の血清の希釈物を各ウェルに添加し、周囲温度で1～2時間インキュベートした。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いで西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）と複合したヤギ-抗ヒトIgGポリクローナル抗体とともに室温で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをABTS基質（Sigma、A-1888、0.22mg/ml）で発色させ、分光光度計によりOD415～495で分析した。最高の力価の抗CD70抗体を示すマウスを融合に用いた。融合を下記のように行い、ハイブリドーマ上清の抗CD70活性についてELISAにより試験した。

【0491】

CD70に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

HuMab Mouse（登録商標）および/またはKM Mouse（登録商標）から単離したマウス脾細胞を、標準プロトコルに基づくPEGまたはCyto Pulseの大型チャンバ式の細胞融合エレクトロポレーター（Cyto Pulse Sciences, Inc.、Glen Burnie、MD）を用いる電場に基づく電気融合のいずれかを用い、マウス骨髄腫細胞系と融合した。次いで、生成されたハイブリドーマにおける抗原特異的な抗体の産生についてスクリーニングした。免疫マウス由来の脾細胞の単一の細胞懸濁液を、SP2/0非分泌マウス骨髄腫細胞（ATCC、CRL1581）の数の1/4と、50%PEG（Sigma）を用いて融合した。細胞を、平底マイクロタイプレート内に約 1×10^5 細胞/ウェルでプレーティングした後、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを有するDMEM高グルコース培地（Mediatech, Inc.、Herndon、VA）（さらに、10%ウシ胎仔血清（Hyclone、Logan、UT）、18%P388DI条件培地、5%Origenハイブリドーマクローニング因子（BioVeris、Gaithersburg、VA）、4mM L-グルタミン、5mMヘペス、0.055mM -メルカプトエタノール、50単位/mlのペニシリン、50mg/mlのストレプトマイシンおよび1×ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（HAT）培地（Sigma；融合の24時間後にHATが添加される）を含有する）内で1週間インキュベートした。1週間後、細胞を、用いたHATをHTと交換した培地中で培養した。次いで、各ウェルにおけるヒト抗CD70モノクローナルIgG抗体について、FACSまたはELISA（上記）によりスクリーニングした。大規模にハイブリドーマが増殖すると、通常で10～14日後、培地を監視した。抗体を

10

20

30

40

50

分泌するハイブリドーマを再プレATINGし、再びスクリーニングし、ヒトIgGが依然として陽性である場合、抗CD70モノクローナル抗体を限界希釈により少なくとも2回サブクローン化した。次いで、さらなる特徴づけのため、安定なサブクローンをインビトロで培養し、組織培地中で少量の抗体を産生した。

【0492】

さらなる分析のため、ハイブリドーマクローン2H5、10B4、8B5、18E7および69A7を選択した。

【0493】

実施例2．ヒトモノクローナル抗体2H5、10B4、8B5、18E7、69A7および1F4の構造的特徴づけ

2H5、10B4、8B5、18E7、69A7および1F4モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードするcDNA配列を、標準PCR技術を用いてそれぞれ2H5、10B4、8B5、18E7、69A7および1F4ハイブリドーマから得て、標準のDNA配列決定技術を用いて配列決定した。

【0494】

2H5の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図1Aとそれぞれ配列番号49および1に示す。

【0495】

2H5の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図1Bとそれぞれ配列番号55および7に示す。

【0496】

2H5重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、2H5重鎖ではヒト生殖細胞系V_H3-30.3由来のV_Hセグメント、未確定のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH4b由来のJ_Hセグメントが用いられることが示された。2H5 V_H配列と生殖細胞系V_H3-30.3配列のアラインメントを図7に示す。CDR領域決定のKabataシステムを用いる2H5 V_H配列のさらなる分析により、重鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域が図1Aおよび7とそれぞれ配列番号13、19および25に図示されるに至った。

【0497】

2H5軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、2H5軽鎖ではヒト生殖細胞系V_KL6由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK4由来のJ_Kセグメントが用いられることが示された。2H5 V_L配列と生殖細胞系V_KL6配列のアラインメントを図11に示す。CDR領域決定のKabataシステムを用いる2H5 V_L配列のさらなる分析により、軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域が図1Bおよび11とそれぞれ配列番号31、37、および43に図示されるに至った。

【0498】

10B4の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図2Aとそれぞれ配列番号50および2に示す。

【0499】

10B4の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図2Bとそれぞれ配列番号56および8に示す。

【0500】

10B4重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、10B4重鎖ではヒト生殖細胞系V_H3-30.3由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系4-11由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH4b由来のJ_Hセグメントが用いられることが示された。10B4 V_H配列と生殖細胞系V_H3-30.3配列のアラインメントを図7に示す。CDR領域決定のKabataシステムを用いる10B4 V_H配列のさらなる分析により、重鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域が図2Aおよび7とそれぞれ配列番号14、20、および26に図示されるに至った。

10

20

30

40

50

【0501】

10B4 軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、10B4 軽鎖ではヒト生殖細胞系 $V_K L 18$ 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 3$ 由来の J_K セグメントが用いられることが示された。10B4 V_L 配列と生殖細胞系 $V_K L 18$ 配列のアラインメントを図12に示す。CDR領域決定の Kabat システムを用いる10B4 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域が図2B および 12 とそれぞれ配列番号 32、38、および 44 に図示されるに至った。

【0502】

8B5 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図3A とそれぞれ配列番号 51 および 3 に示す。

10

【0503】

8B5 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図3B とそれぞれ配列番号 57 および 9 に示す。

【0504】

8B5 重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、8B5 重鎖ではヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 $3 - 10$ 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 $J_H 4 b$ 由来の J_H セグメントが用いられることが示された。8B5 V_H 配列と生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ 配列のアラインメントを図8に示す。CDR領域決定の Kabat システムを用いる8B5 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域が図3A および 8 とそれぞれ配列番号 15、21、および 27 に図示されるに至った。

20

【0505】

8B5 軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、8B5 軽鎖ではヒト生殖細胞系 $V_K L 15$ 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 4$ 由来の J_K セグメントが用いられることが示された。8B5 V_L 配列と生殖細胞系 $V_K L 15$ 配列のアラインメントを図13に示す。CDR領域決定の Kabat システムを用いる8B5 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域が図3B および 13 とそれぞれ配列番号 33、39、および 45 に図示されるに至った。

30

【0506】

18E7 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図4A とそれぞれ配列番号 52 および 4 に示す。

【0507】

18E7 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図4B とそれぞれ配列番号 58 および 10 に示す。

【0508】

18E7 重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、18E7 重鎖ではヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 $3 - 10$ 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 $J_H 4 b$ 由来の J_H セグメントが用いられることが示された。18E7 V_H 配列と生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ 配列のアラインメントを図8に示す。CDR領域決定の Kabat システムを用いる18E7 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域が図4A および 8 とそれぞれ配列番号 16、22、および 28 に図示されるに至った。

40

【0509】

18E7 軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、18E7 軽鎖ではヒト生殖細胞系 $V_K L 15$ 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 4$ 由来の J_K セグメントが用いられることが示された。18E7 V_L 配列と生殖細胞系 $V_K L 15$ 配列のアラインメントを図13に示す。CDR領域決定の Kabat システムを用いる18E7 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 CDR 1、

50

C D R 2 および C D R 3 領域が図 4 B および 1 3 とそれぞれ配列番号 3 4、4 0、および 4 6 に図示されるに至った。

【 0 5 1 0 】

6 9 A 7 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 5 A とそれぞれ配列番号 5 3 および 5 に示す。

【 0 5 1 1 】

6 9 A 7 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 5 B とそれぞれ配列番号 5 9 および 1 1 に示す。

【 0 5 1 2 】

6 9 A 7 重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、6 9 A 7 重鎖ではヒト生殖細胞系 $V_H 4 - 6 1$ 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 4 - 2 3 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 $J_H 4 b$ 由来の J_H セグメントが用いられることが示された。6 9 A 7 V_H 配列と生殖細胞系 $V_H 4 - 6 1$ 配列のアラインメントを図 9 に示す。C D R 領域決定の K a b a t システムを用いる 6 9 A 7 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域が図 5 A および 9 とそれぞれ配列番号 1 7、2 3、および 2 9 に図示されるに至った。

10

【 0 5 1 3 】

6 9 A 7 軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、6 9 A 7 軽鎖ではヒト生殖細胞系 $V_K L 6$ 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 4$ 由来の J_K セグメントが用いられることが示された。6 9 A 7 V_L 配列と生殖細胞系 $V_K L 6$ 配列のアラインメントを図 1 4 に示す。C D R 領域決定の K a b a t システムを用いる 6 9 A 7 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域が図 5 B および 1 4 とそれぞれ配列番号 3 5、4 1、および 4 7 に図示されるに至った。

20

【 0 5 1 4 】

1 F 4 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 5 A とそれぞれ配列番号 5 4 および 6 に示す。

【 0 5 1 5 】

1 F 4 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 5 B とそれぞれ配列番号 6 0 および 1 2 に示す。

30

【 0 5 1 6 】

1 F 4 重鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較によると、1 F 4 重鎖ではヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 2 3$ 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 4 - 4 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 $J_H 4 b$ 由来の J_H セグメントが用いられることが示された。1 F 4 V_H 配列と生殖細胞系 $V_H 3 - 2 3$ 配列のアラインメントを図 1 0 に示す。C D R 領域決定の K a b a t システムを用いる 1 F 4 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域が図 5 A および 1 0 とそれぞれ配列番号 1 8、2 4、および 3 0 に図示されるに至った。

【 0 5 1 7 】

1 F 4 軽鎖免疫グロブリン配列と既知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列との比較によると、1 F 4 軽鎖ではヒト生殖細胞系 $V_K A 2 7$ 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 2$ 由来の J_K セグメントが用いられることが示された。1 F 4 V_L 配列と生殖細胞系 $V_K A 2 7$ 配列のアラインメントを図 1 5 に示す。C D R 領域決定の K a b a t システムを用いる 1 F 4 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域が図 5 B および 1 5 とそれぞれ配列番号 3 6、4 2、および 4 8 に図示されるに至った。

40

【 0 5 1 8 】

実施例 3 . 抗 C D 7 0 ヒトモノクローナル抗体の結合特異性の特徴づけ

抗 C D 7 0 抗体の免疫精製 C D 7 0 への結合についての比較を標準 E L I S A により行い、C D 7 0 に対する結合の特異性について試験した。

50

【0519】

組換えmyc-タグ化されたCD70をプレート上で一晚コートし、次いで抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5、10B4、8B5、および18E7に対する結合について試験した。標準ELISA法を実施した。抗CD70ヒトモノクローナル抗体を1 μ g/mlの濃度で添加し、1:2の段階希釈で減量して力価判定した。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)と複合したヤギ-抗ヒトIgG(Fcまたは鎖に特異的な)ポリクローナル抗体を二次抗体として用いた。結果を図16に示す。抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5、10B4、8B5および18E7はCD70に対して高い特異性で結合した。

【0520】

10

実施例4. 抗CD70抗体の腎癌細胞系の表面上に発現されるCD70への結合の特徴づけ

抗CD70抗体のCD70を発現する腎細胞癌細胞へのその細胞表面上での結合についてフローサイトメトリーにより試験した。

【0521】

腎細胞癌細胞系A-498(ATCC登録番号HTB-44)、786-O(ATCC登録番号CRL-1932)、ACHN(ATCC登録番号CRL-1611)、Caki-1(ATCC登録番号HTB-46)およびCaki-2(ATCC登録番号HTB-47)の抗体結合についてそれぞれ試験した。HuMAb 2H5抗CD70ヒトモノクローナル抗体の結合を、 1×10^5 個の細胞を1 μ g/mlの濃度の2H5とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて行った。結果を図17に示す。抗CD70モノクローナル抗体2H5は、腎癌細胞系A-498、786-O、ACHN、Caki-1およびCaki-2に結合した。

20

【0522】

腎細胞癌細胞系786-OおよびA-498に対するHuMAb抗CD70ヒトモノクローナル抗体2H5、8B5、10B4および18E7の異なる濃度での結合について試験した。抗CD70ヒトモノクローナル抗体の結合を、 5×10^5 個の細胞を50 μ g/mlの開始濃度の抗体とともにインキュベートし、抗体を1:3の希釈で段階希釈することにより評価した。細胞を洗浄し、結合をPE標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて行った。結果を図18A(786-O)および図18B(A-498)に示す。染色の平均蛍光強度(MFI)による測定によると、抗CD70モノクローナル抗体2H5、8B5、10B4および18E7は、腎癌細胞系786-OおよびA-498に濃度依存的に結合した。抗CD70モノクローナル抗体におけるEC₅₀値は、786-O細胞系においては1.844nM~6.669nMであり、A-498細胞系においては3.984nM~11.84nMの範囲であった。

30

【0523】

40

HuMAb 2H5および69A7抗CD70ヒトモノクローナル抗体の腎細胞癌細胞系786-Oへの結合を、 2×10^5 個の細胞を10 μ g/mlの濃度での2H5または69A7のいずれかとともにインキュベートすることにより評価した。アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて行った。結果を図18Cに示す。両方の抗CD70モノクローナル抗体は、腎癌細胞系786-Oに結合した。

【0524】

腎細胞癌細胞系786-Oに対する異なる濃度でのHuMAb抗CD70ヒトモノクロ

50

ーナル抗体 69A7 の結合について試験した。抗 CD70 ヒトモノクローナル抗体の結合を、 5×10^5 個の細胞を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の開始濃度の抗体とともにインキュベートし、抗体を 1 : 3 の希釈で段階希釈することにより評価した。細胞を洗浄し、結合を PE 標識抗ヒト IgG 抗体で検出した。フローサイトメトリー分析を FACSCalibur フローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて行った。結果を図 18D に示す。染色の平均蛍光強度 (MFI) による測定によると、抗 CD70 モノクローナル抗体 69A7 は、腎癌細胞系 786-O に濃度依存的に結合した。抗 CD70 モノクローナル抗体 69A7 の 786-O 細胞への結合における EC_{50} 値は 6.927 nM であった。

【0525】

これらのデータは、抗 CD70 HuMAb が腎細胞癌細胞系に結合することを示す。

【0526】

実施例 5 . 抗 CD70 抗体のリンパ腫細胞系の表面上に発現される CD70 への結合についての特徴づけ

抗 CD70 抗体の CD70 を細胞表面上に発現するリンパ腫細胞への結合についてフローサイトメトリーにより試験した。

【0527】

リンパ腫細胞系 Daudi (ATCC 登録番号 CCL-213)、HuT78 (ATCC 登録番号 TIB-161) および Raji (ATCC 登録番号 CCL-86) の抗体結合についてそれぞれ試験した。HuMAb 2H5 抗 CD70 ヒトモノクローナル抗体の結合を、 1×10^5 個の細胞を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度での 2H5 とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合を FITC 標識抗ヒト IgG 抗体で検出した。CD70 を細胞表面上に発現しない Jurkat 細胞系を陰性対照として用いた。フローサイトメトリー分析を FACSCalibur フローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて行った。結果を図 19 に示す。染色の平均蛍光強度 (MFI) による測定によると、抗 CD70 モノクローナル抗体 2H5 は、リンパ腫細胞系 Daudi、HuT78 および Raji に結合した。

【0528】

リンパ腫細胞系 Raji および Granta519 (DSMZ 登録番号 342) に対する HuMAb 抗 CD70 ヒトモノクローナル抗体 2H5 の様々な濃度での結合について試験した。抗 CD70 ヒトモノクローナル抗体の結合を、 5×10^5 個の細胞を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の開始濃度の抗体とともにインキュベートし、抗体を 1 : 3 の希釈で段階希釈することにより評価した。アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。細胞を洗浄し、結合を PE 標識抗ヒト IgG 抗体で検出した。フローサイトメトリー分析を FACSCalibur フローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて行った。結果を図 20A (Raji) および 20B (Granta519) に示す。染色の平均蛍光強度 (MFI) による測定によると、抗 CD70 モノクローナル抗体 2H5 は、リンパ腫細胞系 Raji および Granta519 に濃度依存的に結合した。抗 CD70 抗体における EC_{50} 値は、Raji 細胞においては 1.332 nM であり、Granta519 細胞においては 1.330 nM であった。

【0529】

HuMAb 2H5 および 69A7 抗 CD70 ヒトモノクローナル抗体の Raji リンパ腫細胞系への結合を、 2×10^5 個の細胞を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の HuMAb とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合を FITC 標識抗ヒト IgG 抗体で検出した。アイソタイプ対照抗体および二次抗体単独を陰性対照として用いた。フローサイトメトリー分析を FACSCalibur フローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて行った。結果を図 20C に示す。染色の平均蛍光強度 (MFI) による測定によると、両方の抗 CD70 モノクローナル抗体は Raji リンパ腫細胞系に結合した。

【0530】

10

20

30

40

50

競合FACSアッセイを行い、2H5に対する69A7の結合特異性を解明した。Raji細胞を、10 μ g/mlの濃度の裸69A7、2H5、アイソタイプ対照抗体または抗体なしのいずれかとともにインキュベートした。洗浄後、細胞を10 μ g/mlの濃度のFITCと複合した69A7とともにインキュベートした。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson、San Jose、CA)を用いて行った。結果を図20Dに示す。抗CD70抗体69A7および2H5の双方はFITC標識69A7の結合を遮断し、それは2H5および69A7の双方が類似の結合エピトープを共有することを示す。

【0531】

Daudiリンパ腫細胞系および786-O腎癌細胞の抗体結合についてさらに試験した。HuMAb 69A7抗CD70ヒトモノクローナル抗体の結合を、 2×10^5 個の細胞を1 μ g/mlの濃度の69A7とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。CD70を細胞表面上に発現しないJurkat細胞系を陰性対照として用いた。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson、San Jose、CA)を用いて行った。結果を図20Eに示す。染色の平均蛍光強度(MFI)による測定によると、抗CD70モノクローナル抗体69A7はDaudiリンパ腫細胞系および786-O腎癌細胞系に結合した。

【0532】

これらのデータは、抗CD70 HuMAbがリンパ腫細胞系に結合することを示す。

【0533】

実施例6．抗CD70モノクローナル抗体の結合親和性のスキャッチャード分析

2H5、8B5、10B4および18E7モノクローナル抗体のCD70形質移入CHO細胞系への結合親和性についてスキャッチャード分析を用いて試験した。

【0534】

CHO細胞に完全長CD70を標準の技術を用いて形質移入し、それを10%ウシ胎仔血清(FBS)を含有するRPMI培地中で成長させた。細胞をトリプシン処理し、トリスに基づく結合緩衝液(24mMトリス pH7.2、137mM NaCl、2.7mM KCl、2mMグルコース、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1%BSA)で1回洗浄し、細胞を結合緩衝液中で 2×10^6 細胞/mlに調節した。Milliporeプレート(MAFB NOB)を水中の1%脱脂粉乳でコートし、4℃で一晩保存した。プレートを結合緩衝液0.2mlで3回洗浄した。緩衝液50 μ lのみを最大結合のウェル(全結合)に添加した。緩衝液25 μ lのみを対照ウェル(非特異的結合)に添加した。様々な濃度の¹²⁵I-抗CD70抗体をすべてのウェルに25 μ lの容量で添加した。様々な濃度の100倍過剰な未標識抗体を25 μ lの容量で対照ウェルに添加し、結合緩衝液中のCD70形質移入CHO細胞(2×10^6 細胞/ml)25 μ lをすべてのウェルに添加した。プレートを、振とう器上、200RPMで、4℃で2時間インキュベートした。インキュベーションの完了時、Milliporeプレートを冷却洗浄用緩衝液(24mMトリス pH7.2、500mM NaCl、2.7mM KCl、2mMグルコース、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1%BSA)0.2mlで3回洗浄した。フィルタを除去し、ガンマカウンタで計数した。平衡結合の評価を、Prismソフトウェア(San Diego、CA)で単一の部位結合パラメータを用いて行った。

【0535】

上記のスキャッチャード結合アッセイを用い、抗体のCD70形質移入CHO細胞に対するK_Dは、2H5においては約2.1nM、8B5においては5.1nM、10B4においては1.6nMおよび18E7においては1.5nMであった。

【0536】

実施例7：抗CD70モノクローナル抗体の内在水

10

20

30

40

50

抗CD70 HuMAbのCD70発現腎癌細胞への内在化能力について、Hum-Zap内在化アッセイを用いて試験した。Hum-Zapアッセイでは、二次抗体の細胞毒素サポリンに複合されたヒトIgGに対する親和性結合を介した一次ヒト抗体の内在化について試験する。

【0537】

CD70を発現する腎癌細胞系786-Oを、ウェル100 μ l内に 1.25×10^4 細胞/ウェルで一晩播種した。抗CD70 HuMAb抗体2H5、8B5、10B4または18E7をウェルに30nMの開始濃度で添加し、1:3の段階希釈で減量して力価判定した。CD70に非特異的なアイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25)を11nMの濃度で添加し、プレートを72時間インキュベートしておいた。次いで、プレートに1.0 μ Ciの 3 H-チミジンを24時間パルスし、採取し、Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments, Meriden, CT)で読み取った。結果を図21に示す。抗CD70抗体2H5、8B5、10B4および18E7は、CD70を発現する786-O腎癌細胞内で 3 H-チミジン取り込みにおける抗体濃度依存性の低下を示した。抗CD70抗体2H5におけるEC₅₀値は0.9nMであった。このデータは、抗CD70抗体2H5、8B5、10B4および18E7が腎癌細胞系に内在化することを示す。

10

【0538】

実施例8. 腎細胞癌細胞系上での細胞毒素に複合された抗CD70抗体の細胞死の評価

本実施例では、細胞増殖アッセイにおいて、サイトトキシンDに複合された抗CD70モノクローナル抗体(図73)のCD70+腎細胞癌細胞系を死滅させる能力について試験した。サイトトキシンDはエステラーゼ活性化を必要とするプロドラッグである。

20

【0539】

抗CD70 HuMAb抗体2H5、8B5、10B4または18E7を、リンカー、例えばペプチジル、ヒドラゾンまたはジスルフィドリンカーを介してサイトトキシンDに複合させた。CD70発現腎癌細胞系ACHNおよびCaki-2を 2.5×10^4 細胞/ウェルで播種し、CD70発現腎癌細胞系786-Oをウェル100 μ l内に 1.25×10^4 細胞/ウェルで3時間播種した。抗CD70抗体-細胞毒素複合体をウェルに30nMの開始濃度で添加し、1:3の段階希釈で減量して力価判定した。CD70に非特異的なアイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。プレートを69時間インキュベートしておいた。次いで、プレートに1.0 μ Ciの 3 H-チミジンを24時間パルスし、採取し、Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments, Meriden, CT)で読み取った。結果を図22A(Caki-2)、22B(786-O)および22C(ACHN)に示す。抗CD70抗体2H5、8B5、10B4および18E7は、CD70を発現するCaki-2、786-OおよびACHN腎癌細胞内で 3 H-チミジン取り込みにおける抗体-細胞毒素の濃度依存性の低下を示した。抗CD70抗体におけるEC₅₀値は、CAKI-2細胞においては6nM~76nM、786-O細胞においては1.6nM~3.9nM、およびACHN細胞においては9nM~108nMの範囲であった。このデータは、抗CD70抗体2H5、8B5、10B4および18E7が、細胞毒素に複合される場合、腎癌細胞に対して細胞毒性があることを示す。

30

40

【0540】

実施例9: 抗CD70抗体のADCC活性の評価

本実施例では、蛍光細胞毒性アッセイにおいて、抗CD70モノクローナル抗体が抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を介してエフェクター細胞の存在下でCD70+細胞系を死滅させる能力について試験した。

【0541】

ヒトエフェクター細胞を以下のように全血から調製した。ヒト末梢血単核球を標準のF

50

icoll - paque分離によりヘパリン化全血から精製した。細胞を10% FBSおよび200U/mlのヒトIL-2を含有するRPMI 1640培地中に再懸濁し、37で一晩インキュベートした。翌日、細胞を採取し、培地中で4回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlで再懸濁した。標的CD70+細胞を、 1×10^6 個の標的細胞/ml当たりBATDA 2.5 μ lでのBATDA試薬(Perkin Elmer、Wellesley、MA)とともに37で20分間インキュベートした。標的細胞を、4回洗浄し、スピンドウンし、最終容量を 1×10^5 細胞/mlにした。

【0542】

CD70+細胞系ARH-77(ヒトBリンパ芽球性白血病; ATCC登録番号CRL-1621)、HuT78(ヒト皮膚リンパ球性リンパ腫; ATCC登録番号TIB-61)、Raji(ヒトBリンパ球性パーキットリンパ腫; ATCC登録番号CCL-86)および陰性対照細胞系L540(ヒトホジキンリンパ腫; DSMZ寄託番号ACC72)の、ヒト抗CD70モノクローナル抗体に対する抗体特異的なADCCについて、以下のDelia蛍光放射分析を用いて試験した。各標的細胞系(標識標的細胞100 μ l)を、エフェクター細胞50 μ lおよび抗体50 μ lとともにインキュベートした。実験を通じて標的対エフェクター比として1:50を用いた。すべての試験において、ヒトIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。2000rpmのバルス回転および37で1時間のインキュベーション後、上清を採取し、再び迅速に回転させ、上清20 μ lを平底プレートに移し、それに対してEu溶液(Perkin Elmer、Wellesley、MA)180 μ lを添加し、Ruby Starリーダー(BMG Labtech)で読み取った。溶解率を、(試料放出-自然放出*100)/(最大放出-自然放出)(式中、自然放出は標的細胞のみを有するウェルからの蛍光であり、かつ最大放出は標的細胞を含有し、2% Triton-Xで処理されているウェルからの蛍光である)に従って計算した。ARH-77、HuT78、RajiおよびL-540細胞系における細胞毒性の溶解率をそれぞれ図23A~Dに示す。CD70+発現細胞系ARH-77、HuT78およびRajiの各々は、HuMAb抗CD70抗体2H5および18E7による抗体媒介性細胞毒性を示した一方、陰性対照細胞系L-540は抗CD70抗体の存在下で有意な細胞毒性を有しなかった。このデータは、HuMAb抗CD70抗体がCD70+発現細胞に対して特異的な細胞毒性を示すことを示す。

【0543】

実施例10. ヒトリンパ腫細胞系上での細胞毒素に複合された抗CD70抗体の細胞死の評価

本実施例では、細胞増殖アッセイにおいて、サイトトキシンCに複合された抗CD70モノクローナル抗体2H5(図72)がCD70+ヒトリンパ腫細胞系を死滅させる能力について試験した。サイトトキシンCはエステラーゼ活性化を必要とするプロドラッグである。

【0544】

抗CD70 HuMAb抗体2H5を、リンカー、例えばペプチジル、ヒドラゾンまたはジスルフィドリンカーを介してサイトトキシンCに複合させた。本開示の抗体に複合可能な細胞毒素化合物の例が、2005年9月26日に出願された米国仮特許出願第60/720,499号明細書と同時出願された出願および2006年9月26日に出願されたPCT公開の国際公開第07/038658号パンフレット(これらの内容は参照により本明細書中に援用される)に記載されている。CD70を発現するヒトリンパ腫細胞系Daudi、HuT78、Grant 519およびRajiを、ウェル100 μ l内、 10^5 細胞/ウェルで3時間播種した。抗CD70抗体-細胞毒素複合体をウェルに30nMの開始濃度で添加し、1:2の段階希釈で減量して力価判定した。HuMAb抗体2H5-細胞毒素複合体の試験を、細胞表面上でCD70を発現しない陰性対照細胞系のJurkat細胞に対しても行った。プレートを72時間インキュベートしておいた。次いで、培養の終結前、プレートに0.5 μ Ciの³H-チミジンを8時間パルスし、採取し、Top Count Scintillation Counter(Packard

Instrument s) で読み取った。図 2 4 は、2 H 5 - 複合体の D a u d i、H u T 7 8、G r a n t a 5 1 9 および J u r k a t 細胞に対する効果を示した。抗 C D 7 0 抗体 2 H 5 は、C D 7 0 を発現する D a u d i、H u T 7 8 および G r a n t a 5 1 9 B 細胞リンパ腫癌細胞内で ^3H -チミジン取り込みにおける抗体-細胞毒素の濃度依存性の低下を示したが、J u r k a t 細胞内では示さなかった。

【0545】

別々のアッセイにおいては、C D 7 0 を発現するヒトリンパ腫癌細胞系 R a j i をウェル 1 0 0 μl 内、 10^4 細胞/ウェルで 3 時間播種した。抗 C D 7 0 抗体-細胞毒素複合体をウェルに 3 0 n M の開始濃度で添加し、1 : 3 の段階希釈で減量して力価判定した。細胞毒素複合体アイソタイプ対照抗体を対照として用いた。プレートを、3 時間経過時の洗浄または連続洗浄のいずれかを伴い、7 2 時間インキュベートさせた。次いで、培養の終結前、プレートに 0 . 5 μCi の ^3H -チミジンを 8 時間パルスし、採取し、T o p C o u n t S c i n t i l l a t i o n C o u n t e r (P a c k a r d I n s t r u m e n t s) で読み取った。図 2 5 A および 2 5 B の各々は、3 時間洗浄または連続洗浄に伴う、R a j i 細胞上で ^3H -チミジン取り込みにおける抗体-細胞毒素の濃度依存性の低下を示した。

10

【0546】

このデータは、細胞毒素に複合された抗 C D 7 0 抗体がヒトリンパ腫癌細胞に対して特異的な細胞毒性を示すことを示す。

20

【0547】

実施例 1 1 . 裸および細胞毒素に複合された抗 C D 7 0 抗体を用いるインビボでの腫瘍異種移植片モデルの治療

腎細胞癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗 C D 7 0 抗体を用いてインビボで治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0548】

A - 4 9 8 (A T C C 登録番号 H T B - 4 4) および A C H N (A T C C 登録番号 C R L - 1 6 1 1) 細胞を、標準の実験方法を用いてインビトロで増殖させた。6 ~ 8 週齢の雄 N c r 胸腺欠損ヌードマウス (T a c o n i c、H u d s o n、N Y) の右側腹に、マウス 1 匹当たり P B S / M a t r i g e l (1 : 1) 0 . 2 m l 中、 7.5×10^6 個の A C H N または A - 4 9 8 細胞を皮下移植した。移植後、週 2 回、マウスを秤量し、その腫瘍について電子キャリパーを用いて三次元的に測定した。腫瘍体積を高さ \times 幅 \times 長さとして計算した。平均 2 7 0 mm^3 の A C H N 腫瘍または平均 1 1 0 mm^3 の A 4 9 8 腫瘍を有するマウスを治療群に無作為化した。0 日目、マウスに対し、P B S 媒体、細胞毒素に複合されたアイソタイプ対照抗体または細胞毒素に複合された抗 C D 7 0 H u M A b 2 H 5 を腹腔内投与した。本開示の抗体に複合可能な細胞毒素化合物の例が、米国仮特許出願第 6 0 / 7 2 0 , 4 9 9 号明細書および 2 0 0 6 年 9 月 2 6 日に出版された P C T 公開の国際公開第 0 7 / 0 3 8 6 5 8 号パンフレット (これら全体は参照により本明細書中に援用される) に記載されている。A - 4 9 8 試料群中のマウスを、3 種の異なる細胞毒素化合物 (サイトトキシン A (N 1)、サイトトキシン B (図 7 1)、およびサイトトキシン C (図 7 2)) で試験した。投与後 6 0 日間、マウスの腫瘍成長について監視した。腫瘍が腫瘍エンドポイント (2 0 0 0 mm^3) に達した時、マウスを安楽死させた。

30

40

【0549】

結果を図 2 6 A (A - 4 9 8 腫瘍) および 2 6 B (A C H N 腫瘍) に示す。細胞毒素に複合された抗 C D 7 0 抗体 2 H 5 は、腫瘍エンドポイント体積 (2 0 0 0 mm^3) に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍成長の進行を遅延させた。したがって、抗 C D 7 0 抗体-細胞毒素複合体による治療は、腫瘍成長に対して直接のインビボ阻害効果を有した。

【0550】

実施例 1 2 . 2 H 5 の場合での免疫組織化学

抗 C D 7 0 H u M A b 2 H 5 の免疫組織化学による C D 7 0 に対する認識能について、明細胞腎細胞癌 (c c R C C)、リンパ腫およびグリア芽腫の患者由来の臨床生検を

50

用いて試験した。

【0551】

免疫組織化学においては、5 μ mの凍結切片を用いた(Ardais Inc、USA)。30分間乾燥後、切片をアセトンで固定し(室温で10分間)、5分間風乾した。スライドをPBSですすぎ、次いでPBS中の10%正常ヤギ血清とともに20分間予備インキュベートし、次いで10%正常ヤギ血清を有するPBS中の10 μ g/mlのFITC化(fitcylated)2H5とともに室温で30分間インキュベートした。次いで、スライドをPBSで3回洗浄し、マウス抗FITC(10 μ g/mlのDAKO)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドをPBSで再洗浄し、ヤギ抗マウスHRP複合体(DAKO)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドをPBSで3回再洗浄した。ジアミノベンジジン(Sigma)を基質として用いた結果、茶色の染色が得られた。スライドを、蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで1分間対比染色した。次いで、スライドを流れる蒸留水で10秒間洗浄し、グリセルゲル(DAKO)でマウントした。臨床生検の免疫組織化学染色は、非ホジキンリンパ腫、形質細胞腫、ccRcおよびグリア芽腫切片においては陽性染色を呈した。各場合において、悪性細胞のみが陽性であり、隣接する正常組織は染色されなかった。

10

【0552】

実施例13. 脱フコシル化HuMAbの産生

フコシル残基の量が減少した抗体が抗体のADCC能を増大させることが示されている。本実施例では、フコシル残基が欠損している2H5 HuMAbが産生されている。

20

【0553】

フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8(Biowa, Inc., Princeton, NJ)が欠損したCHO細胞系Ms704-PFを、抗体2H5の重鎖および軽鎖を発現するベクターでエレクトロポレートした。薬剤耐性クローンを、6mMのL-グルタミンおよび500 μ g/mlのG418(Invitrogen, Carlsbad, CA)を有するEx-Cell 325-PF CHO培地(JRH Biosciences, Lenexa, KS)内での成長により選択した。クローンにおけるIgGの発現を標準ELISAアッセイによりスクリーニングした。2つの別々のクローンB8A6およびB8C11が産生され、それらは1.0~3.8ピコグラム/細胞/日の範囲の産生速度を有した。

30

【0554】

実施例14. 脱フコシル化抗CD70抗体のADCC活性の評価

本実施例では、蛍光細胞毒性アッセイにおいて、脱フコシル化されたまた脱フコシル化されていない抗CD70モノクローナル抗体が、抗体依存性細胞障害作用(ADCC)を介してエフェクター細胞の存在下でCD70+細胞系を死滅させる能力について試験した。

【0555】

ヒト抗CD70モノクローナル抗体2H5を上記のように脱フコシル化した。ヒトエフェクター細胞を以下のように全血から調製した。ヒト末梢血単核球を、標準のFicoll-paque分離によりヘパリン化全血から精製した。細胞を10%FBS(培地)および200U/mlのヒトIL-2を含有するRPMI1640培地中に再懸濁し、37で一晚インキュベートした。翌日、細胞を回収し、培地中で1回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlで再懸濁した。標的CD70+細胞を、2.5mMのプロベネシドを補充した培地(アッセイ培地)中で、 1×10^6 個の標的細胞/ml当たりBATDA2.5 μ lでのBATDA試薬(Perkin Elmer, Wellesley, MA)とともに37で20分間インキュベートした。アッセイ培地中で、標的細胞を、20mMヘパスおよび2.5mMプロベネシドを有するPBSで4回洗浄し、スピンドウンし、最終容量を 1×10^5 細胞/mlにした。

40

【0556】

CD70+細胞系ARH-77(ヒトBリンパ芽球性白血病; ATCC登録番号CRL

50

- 1621)、MEC-1(ヒト慢性B細胞白血病; DSMZ登録番号ACC497)、SU-DHL-6(ヒトB細胞リンパ腫、DSMZ登録番号Acc572)、IM-9(ヒトBリンパ芽球性; ATCC登録番号CCL-159)およびHuT78(ヒト皮膚リンパ球性リンパ腫; ATCC登録番号TIB-161)の、脱フコシル化されたまた脱フコシル化されていないヒト抗CD70モノクローナル抗体2H5に対する抗体特異的なADCCについて、以下のDelfia蛍光放射分析を用いて試験した。標的細胞系ARH77(標識標的細胞100 μ l)を、50 μ lのエフェクター細胞および50 μ lの2H5または脱フコシル化2H5抗体のいずれかとともにインキュベートした。実験を通じて標的対エフェクター比として1:50を用いた。ヒトIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。2100rpmのパルス回転および37 $^{\circ}$ で1時間のインキュベーション後、上清を採取し、再び迅速に回転させ、上清20 μ lを平底プレートに移し、それに対してEu溶液(Perkin Elmer, Wellesley, MA)180 μ lを添加し、Fusion Alpha TRFプレートリーダー(Perkin Elmer)で読み取った。溶解率を、(試料放出-自然放出*100)/(最大放出-自然放出)(式中、自然放出は標的細胞のみを有するウェルからの蛍光であり、かつ最大放出は標的細胞を含有し、3%Lysolで処理されているウェルからの蛍光である)に従って計算した。ARH-77細胞系における細胞毒性の特異的溶解率を図27A~Fに示す。CD70+発現細胞系ARH-77、MEC-1、SU-DHL-6、IM-9およびHuT78は、HuMAb抗CD70抗体2H5での抗体媒介性細胞毒性と、抗CD70抗体2H5の脱フコシル化形態に関連した特異的溶解率の増加を示した。さらに、抗CD16抗体はMEC-1細胞系におけるADCC効果を遮断することが示された。このデータは、脱フコシル化HuMAb抗CD70抗体がCD70+発現細胞に特異的な細胞毒性の増大を示すことを示す。

10

20

30

40

50

【0557】

実施例15. ^{51}Cr -放出アッセイを用いての抗CD70抗体のADCC活性の評価
本実施例では、 ^{51}Cr -放出アッセイにおいて、抗CD70モノクローナル抗体が、抗体依存性細胞障害作用(ADCC)によりエフェクター細胞の存在下でCD70+ Raji Bリンパ球細胞を死滅させる能力について試験した。

【0558】

ヒト末梢血単核球(エフェクター細胞)を、標準のFicoll-paque分離によりヘパリン化全血から精製した。細胞を10%FBSおよび200U/mlのヒトIL-2を含有するRPMI1640培地中に 2×10^6 /mlで再懸濁し、37 $^{\circ}$ で一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、培地中で1回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlで再懸濁した。200万個の標的Raji細胞(ヒトBリンパ球性パーキットリンパ腫; ATCC登録番号CCL-86)を、全容量1mlでの200 μ Ci ^{51}Cr とともに37 $^{\circ}$ で1時間インキュベートした。標的細胞を、1回洗浄し、培地1ml中に再懸濁し、37 $^{\circ}$ でさらに30分間インキュベートした。最終のインキュベーション後、標的細胞を1回洗浄し、最終容量を 1×10^5 細胞/mlにした。最終のADCCアッセイにおいては、標識Raji細胞100 μ lをエフェクター細胞50 μ lおよび抗体50 μ lとともにインキュベートした。実験を通じて標的対エフェクター比として1:100を用いた。すべての試験において、ヒトIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。一部の試験では、PBMCのアッセイプレートへの添加に先立ち、PBMC培養物を、20 μ g/mlの抗ヒトCD16抗体、無関係のマウスIgG1抗体、または抗体なしのいずれかを含有するチューブに等しく分離した。27 $^{\circ}$ で15分間のインキュベーション後、血球を洗浄なしで上記のように用いた。37 $^{\circ}$ で4時間のインキュベーション後、上清を採取し、240~400keVの読み取り窓を備えたCobra II自動ガンマカウンタ(Packard Instruments)上で計数した。1分当たりの計数値を抗体濃度の関数としてプロットし、データを、Prismソフトウェア(San Diego, CA)を用い、非線形回帰、S字形用量応答(sigmoidal dose response)(可変性の傾き(variable slope))により分析した。溶解率を、

方程式：溶解率 = (試料 C P M - 抗体なしの C P M) / (T r i t o n X C P M - 抗体なしの C P M) × 100 により決定した。R a j i 細胞系における細胞毒性の特異的溶解率に対する抗体適定曲線を図 28 に示す。このデータは、抗 C D 70 抗体が R a j i 細胞系に対して A D C C 効果を有することを示す。R a j i 細胞に対する抗 C D 70 抗体における E C₅₀ 値は 36 nM であった。抗 C D 16 抗体の存在下での R a j i 細胞に対する細胞毒性のグラフを図 29 に示す。このデータは、R a j i 細胞に対する抗 C D 70 抗体の A D C C 効果が C D 16 に依存することを示す。

【0559】

実施例 16 . 活性化 T 細胞に対する抗 C D 70 抗体の A D C C 活性の評価

本実施例では、蛍光細胞毒性アッセイにおいて、脱フコシル化されたまた脱フコシル化されていない抗 C D 70 モノクローナル抗体が、抗体依存性細胞障害作用 (A D C C) によりエフェクター細胞の存在下で活性化 T 細胞を死滅させる能力について試験した。

【0560】

ヒト抗 C D 70 モノクローナル抗体 2 H 5 を上記のように脱フコシル化した。ヒトエフェクター細胞を上記のように調製した。ヒト脾臓 T 細胞を抗 C D 3 がコートされた磁気ビーズ (純度 > 90%) で陽性選択した。細胞を抗 C D 3 および抗 C D 28 がコートされたビーズおよび I s c o v e 培地 + 10% 熱不活性化 F C S 中の 25 ng / ml の I L - 2 で 6 日間刺激した。A D C C アッセイに含める前に、細胞を採取し、ヨウ化プロピジウム取り込みにより生存度をアッセイし (60% 生存)、生存細胞での C D 70 の発現についてゲーティングし、分析した (生存細胞上に約 65% の C D 70+)。

【0561】

活性化 T 細胞の、脱フコシル化されたまた脱フコシル化されていないヒト抗 C D 70 モノクローナル抗体 2 H 5 に対する抗体特異的な A D C C について、以下の D e l f i a 蛍光放射分析を用いて試験した。標的活性化 T 細胞 (標識標的細胞 100 μl) を、エフェクター細胞 50 μl および 50 μl の 2 H 5 または脱フコシル化 2 H 5 抗体のいずれかとともにインキュベートした。実験を通じて標的対エフェクター比として 1 : 50 を用いた。ヒト I g G 1 アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。2100 rpm のパルス回転および 37 °C で 1 時間のインキュベーション後、上清を採取し、再び迅速に回転させ、上清 20 μl を平底プレートに移し、それに対して E u 溶液 (P e r k i n E l m e r、W e l l e s l e y、M A) 180 μl を添加し、F u s i o n A l p h a T R F プレートリーダー (P e r k i n E l m e r) で読み取った。溶解率を、(試料放出 - 自然放出 * 100) / (最大放出 - 自然放出) (式中、自然放出は標的細胞のみを有するウェルからの蛍光であり、かつ最大放出は標的細胞を含有し、3% L y s o l で処理されているウェルからの蛍光である) に従って計算した。活性化 T 細胞における細胞毒性の特異的溶解率を図 30 に示す。活性化 T 細胞は、H u M A b 抗 C D 70 抗体 2 H 5 での抗体媒介性細胞毒性と、抗 C D 70 抗体 2 H 5 の脱フコシル化形態に関連した特異的溶解率の増加を示した。抗 C D 70 抗体の脱フコシル化されたまた脱フコシル化されていないの双方の形態での抗 C D 16 抗体の添加により、抗体媒介性細胞毒性は遮断された。対照 I g G は細胞毒性に対する効果を全く有しなかった。このデータは、脱フコシル化 H u M A b 抗 C D 70 抗体が活性化 T 細胞に特異的な細胞毒性の増大を示すことを示す。

【0562】

実施例 17 . 受容体 - リガンド C D 70 - C D 27 結合についての遮断アッセイ

本実施例では、抗 C D 70 モノクローナル抗体の、C D 70 とリガンド C D 27 との相互作用に対する遮断能について、遮断アッセイを用いて試験した。

【0563】

ウェルを、4 × 4、2 μg / ml での 100 μl / ウェルの抗 I g G 抗体 (F c - s p .) で一晩コートした。ウェルを、200 μl / ウェルの 1% B S A / P B S で、室温で 1 時間遮断した。各ウェルに対し、0.16 μg / ml での 100 μl / ウェルの C D 27 - F c - h i s を、振とうしながら 37 °C で 1 時間添加した。各ウェルを 200 μl / ウェルの P B S / T w e e n 20 (0.05% (v : v)) で 5 回洗浄した。抗 C D 70

抗体を10% NHS + 1% BSA / PBS 中で希釈し、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での CD70 - myc - his と混合し、室温で1時間インキュベートし、200 μl / ウェルの PBS / Tween 20 (0.05% (v:v)) で5回洗浄した。CD70 / CD27 相互作用を遮断する既知の抗体を陽性対照として用い、アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。CD70 および抗 CD70 抗体の混合物を抗 Fc 抗体で遮断し、100 μl / ウェルの CD70 - myc - his + 抗体を、CD27 - Fc - his を含有するウェルに添加した。混合物を37 で振とうしながら1時間インキュベートした。混合物に対し、100 μl / ウェルの抗 myc - HRP (10% NHS + 1% BSA / PBS 中、1:1000 の希釈) を添加し、37 で振とうしながら1時間インキュベートした。シグナルを100 μl の TMB 基質の添加により検出し、室温で5~10分間インキュベートし、次いで75 μl の 0.25 M H_2SO_4 を添加し、結果を A450 nm で読み取った。結果を図31に示す。このデータは、2H5、8B5、および18E7を含む一部の抗 CD70 抗体が CD70 の CD27 への結合を遮断する一方、他の抗体が CD70 と CD27 の間の相互作用に作用しないことを示す。

10

【0564】

実施例18. 裸抗 CD70 抗体を用いての腫瘍異種移植片モデルのインビボ治療

リンパ腫腫瘍を移植したマウスを裸抗 CD70 抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0565】

ARH-77 (ヒトBリンパ芽球性白血病; ATCC登録番号CRL-1621) および Raji (ヒトBリンパ球性パーキットリンパ腫; ATCC登録番号CCL-86) 細胞を、標準の実験方法を用いてインビトロで増殖させた。6~8週齢の雄Ncr胸腺欠損ヌードマウス (Taconic, Hudson, NY) の右側腹に、マウス1匹当たり PBS / Matrigel (1:1) 0.2 ml 中、 5×10^6 個の ARH-77 または Raji 細胞を皮下移植した。移植後、週2回、マウスを秤量し、その腫瘍について電子キャリパーを用いて三次元的に測定した。腫瘍体積を高さ \times 幅 \times 長さ/2として計算した。平均80 mm^3 の ARH-77 腫瘍または平均170 mm^3 の Raji 腫瘍を有するマウスを治療群に無作為化した。0日目、マウスに対し、PBS 媒体、アイソタイプ対照抗体または裸抗 CD70 HuMAb 2H5 を腹腔内投与した。腫瘍が腫瘍エンドポイント (2000 mm^3) に達した時、マウスを安楽死させた。結果を図32A (Raji 腫瘍) および32B (ARH-77 腫瘍) に示す。裸抗 CD70 抗体 2H5 は、腫瘍エンドポイント体積 (2000 mm^3) に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍成長の進行を遅延させた。したがって、抗 CD70 抗体単独による治療は、腫瘍成長に対して直接のインビボ阻害効果を有する。

20

30

【0566】

実施例19. 細胞毒素に複合された抗 CD70 抗体を用いてのリンパ腫腫瘍異種移植片モデルのインビボ治療

リンパ腫腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗 CD70 抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0567】

ARH-77 (ヒトBリンパ芽球性白血病; ATCC登録番号CRL-1621)、Grant 519 (DSMZ登録番号342) および Raji (ヒトBリンパ球性パーキットリンパ腫; ATCC登録番号CCL-86) 細胞を、標準の実験方法を用いてインビトロで増殖させた。6~8週齢の雄Ncr胸腺欠損ヌードマウス (Taconic, Hudson, NY) の右側腹に、マウス1匹当たり PBS / Matrigel (1:1) 0.2 ml 中、 5×10^6 個の ARH-77、 10×10^6 個の Grant 519 または 5×10^6 個の Raji 細胞を皮下移植した。移植後、週2回、マウスを秤量し、その腫瘍について電子キャリパーを用いて三次元的に測定した。腫瘍体積を高さ \times 幅 \times 長さ/2として計算した。平均80 mm^3 (ARH-77)、220 mm^3 (Grant 519)、または170 mm^3 (Raji) の腫瘍を有するマウスを治療群に無作為化した。0

40

50

日目、マウスに対し、PBS媒体、細胞毒素に複合されたアイソタイプ対照抗体または細胞毒素に複合された抗CD70 HuMAb 2H5を腹腔内投与した。この実験で用いた複合体は、N1におけるリンカーの切断により放出される遊離毒素であった。本開示の抗体に複合可能な細胞毒素化合物の例が、2005年9月26日に出願された米国仮特許出願第60/720,499号明細書および2006年9月26日に出願されたPCT公開の国際公開第07/038658号パンフレット（これらの内容は参照により本明細書中に援用される）に記載されている。腫瘍が腫瘍エンドポイント（ 2000mm^3 ）に達した時、マウスを安楽死させた。結果を図33A（ARH-77）、33B（Grant 519）および33C（Raji腫瘍）に示す。細胞毒素に複合された抗CD70抗体2H5は、腫瘍エンドポイント体積（ 2000mm^3 ）に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍成長の進行を遅延させた。したがって、抗CD70抗体-細胞毒素複合体による治療は、リンパ腫腫瘍成長に対して直接のインビボ阻害効果を有する。

10

【0568】

実施例20．抗CD70抗体とアカゲザルBリンパ腫細胞との交差反応

FACS分析を用い、抗CD70抗体69A7がアカゲザルCD70+Bリンパ腫細胞系LCL8664（ATCC番号CRL-1805）と交差反応する能力を評価した。HuMAb 69A7抗CD70ヒトモノクローナル抗体の結合を、 1×10^5 個の細胞を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度での69A7とともにインキュベートすることにより評価した。細胞を洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。フローサイトメトリー分析をFACS Caliburフローサイトメトリー（Becton Dickinson、San Jose、CA）を用いて行った。結果を図34に示す。結果は、抗CD70抗体69A7がサルCD70+Bリンパ腫細胞と交差反応することを示した。

20

【0569】

実施例21．786-O腎癌細胞への結合時における抗CD70抗体の内在化

786-Oヒト腎癌細胞系を用い、細胞への結合時におけるHuMAb抗CD70抗体69A7および2H5の内在化について免疫蛍光染色を用いて試験した。786-O細胞（96ウェルプレート内、 1×10^4 細胞/ $100\mu\text{l}$ /ウェル）を組織培養フラスコから0.25%トリプシン/EDTAでの処理により採取し、次いでFACS緩衝液（PBS+5%FBS、培地）中、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ での各HuMAb抗CD70抗体とともに氷上で30分間インキュベートした。ヒトIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。培地での2回の洗浄後、細胞を培地（ $100\mu\text{l}$ /ウェル）中に再懸濁し、次いで1:100の希釈でのPE（Jackson ImmunoResearch Lab）と複合したヤギ抗ヒト二次抗体とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞を、0分時に蛍光顕微鏡（Nikon）下で形態および免疫蛍光強度について直ちに画像化するかまたは37°Cで様々な時間インキュベートした。蛍光がHuMAb抗CD70抗体で染色した細胞において観察されたが、対照抗体の場合には観察されなかった。同様の結果が、アッセイにおいてFITCと直接複合したHuMAb抗CD70抗体の場合に観察された。結果は、0分時に両方の抗CD70 HuMAbを有する細胞表面膜上で蛍光の出現を示した。30分間のインキュベーション後、膜蛍光強度が有意に低下する一方、内部蛍光が増大した。120分の時点で膜蛍光は明確でなかったのに対し、細胞内区画内に存在するように見られた。データは、HuMAb抗CD70抗体がCD70を発現する内因性腫瘍細胞への結合時に特異的に内在化されうることを示す。

30

40

【0570】

実施例22．HuMAb抗CD70は既知のマウス抗CD70抗体の結合を遮断する

この実験では、HuMAb抗CD70抗体69A7の、既知のマウス抗CD70抗体のCD70+腎癌786-O細胞への結合に対する遮断能について試験した。786-O細胞を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でのマウス抗CD70抗体BU-69（Ance11、Bayport、MN）および1、5もしくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でのHuMAb69A7とともに氷上で20分間インキュベートした。IgG1およびIgG2アイソタイプ対照抗体を陰性対照

50

として用いた。細胞を2回洗浄し、結合をFITC標識抗ヒトIgG抗体で検出した。フローサイトメトリー分析をFACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて行った。結果を図35に示す。抗CD70 HuMAb 69A7は、濃度依存的にマウス抗CD70抗体の結合を遮断する。

【0571】

実施例23. HuMAb抗CD70は炎症性応答を阻害する

この実験では、HuMAb抗CD70抗体2H5の炎症性応答の阻害について試験した。マウスCD32(CHO-S/mCD32細胞)を安定的に形質移入したCHO-S細胞に、完全長ヒトCD70コンストラクト(CHO-S/mCD32/CD70細胞)を一時的に形質移入した。表面での発現を、2A5およびPEと複合した抗ヒトIgG二次抗体を用いるフローサイトメトリーにより確認した(データは示さず)。Rosette Sep(登録商標)Human T Cell Enrichment Kit(カタログ番号15061; StemCell Technologies Inc)で精製したヒト末梢血CD3+T細胞を、96ウェルプレートの3通りのウェル内で、 1×10^5 個のCHO-S/mCD32またはCHO-S/mCD32/CD70細胞/ウェル、 $1 \mu\text{g/ml}$ の抗hCD3(クローンOKT3; BD Bioscience)、およびHuMAb 2H5または非フコシル化2H5(2H5 NF)のいずれかの段階希釈物で、 1×10^6 個/ウェルでインビトロで刺激した。3日後、上清の一定分量を採取し、インターフェロン(INF-)の分泌を定量ELISAキット(BD Bioscience)により測定した。プレートに対して $1 \mu\text{Ci/ml}$ の ^3H -チミジンをパルスし、それを8時間インキュベートし、細胞を採取し、 ^3H -チミジン取り込みをTrilux(登録商標)1450 Microbeta Counter(Wallac, Inc.)で読み取った。IgG1アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。結果を図36A~Bに示す。2H5および2H5 NFの双方は、用量依存的にCD70で共刺激された増殖を完全に阻害した(図36A)。データはまた、2H5による阻害が、2H5が抗CD3+CHO-S/mCD32媒介性の増殖に対する効果を全く有しなかったことから、CD70共刺激に対して特異的であることを示す。同様に、2H5および2H5 NFの双方は用量依存的にCD70で共刺激されたINF-分泌を完全に阻害した(図36B)。データはまた、2H5阻害が、2H5が抗CD3+CHO-S/mCD32媒介性のINF-分泌に対する効果を全く有しなかったようにCD70共刺激に対して特異的であることを示す。併せると、データは2H5および2H5 NFがCD70ヒト細胞共刺激を機能的に遮断することを示す。

【0572】

サイトメガロウイルス(CMV)に特異的なT細胞応答について予備スクリーニングされたヒトMHCクラスIハプロタイプB*3501+末梢血単核球(PBMC)(Astarte, Inc)を、 25 ng/ml のB*3501に結合するCMVペプチドIPSI NVH HY(配列番号90)(ProImmune, Oxford, UK)およびHuMAb 2H5の段階希釈物の存在下で11日間培養した。培養物を、フローサイトメトリーにより、CD8+T細胞についてはPEと複合された抗CD8染色(クローンRPA-T8, BD Biosciences)によって、ペプチドに特異的なCD8+T細胞についてはAPC標識ペプチド-MHCクラスI五量体オリゴマー染色(F114-4B; ProImmune)によって、また生存度についてはヨウ化プロビジウム染色の欠如によって分析した。アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。結果を図37A~Cに示す。2H5はペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖を部分的に阻害し、かつ2H5 NFおよび陽性対照の抗MHCクラスI抗体(クローンW6/32; BD Bioscience)はペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖を完全に阻害した(図37A)。観察された細胞全体の生存度の低下は全く有意でなかった(図37B)。CD8+細胞の総数に有意な減少は全く認められなかった(図37C)。併せると、データは、2H5および2H5 NFの効果がペプチドで刺激されたCD8+T細胞に対して特異的であ

ったことを示す。データは、同じドナーを用いて行われた1つの追加実験を表す。

【0573】

サイトメガロウイルス(CMV)に特異的なT細胞応答について予備スクリーニングしたヒトMHCクラスIハプロタイプB*3501+PBMC(Astarte, Inc)を、25ng/mlのB*3501に結合するCMVペプチドIP SIN V H H Y (ProImmune) (配列番号90)の存在下で、また、20μg/mlのHuMAb 2H5を、抗ヒトCD16(FcRII)を機能的に遮断する抗体(クローン3G8; BD Biosciences)の段階希釈物の存在下または不在下で11日間培養し、次いで上記のようにペプチドに特異的なCD8+細胞数についてフローサイトメトリーにより分析した。結果を図38に示す。抗CD16によるペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖の2H5および2H5 NF媒介性の阻害での用量依存性の反転は、2H5および2H5 NF阻害が2H5および2H5 NFとCD16+エフェクター細胞との相互作用により媒介されることを示す。2H5 NF媒介性の阻害を反転させるため、2H5に対して約1000倍多い3G8が必要であった。3G8の濃度に無関係にアイソタイプ陰性対照によるペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖の阻害は全くなく、陽性対照W6/32の機能的遮断によるペプチドに特異的なCD8+T細胞の増殖の阻害に対する3G8の効果はほぼ皆無であった。

10

【0574】

実施例24. 細胞毒素に複合された抗CD70抗体を用いての腎癌腫瘍異種移植片モデルのインビボ治療

20

腎癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。本実施例では、抗CD70抗体2H5をN2に複合させた。N2はエステラーゼ活性化を必要とするプロドラッグである。

【0575】

786-O(ATCC登録番号CRL-1932)およびCaki-1(ATCC登録番号HTB-46)細胞を、標準の実験方法を用いてインビトロで増殖させた。6~8週齢の雄CB17.SCIDマウス(Taconic, Hudson, NY)の右側腹に、マウス1匹当たりPBS/Matrigel(1:1)0.2ml中、250万個の786-OまたはCaki-1細胞を皮下移植した。移植後、週2回、マウスを秤量し、その腫瘍について電子キャリパーを用いて三次元的に測定した。腫瘍体積を高さ×幅×長さとして計算した。平均200mm³の腫瘍を有するマウスを治療群に無作為化した。0日目、マウスに対し、PBS媒体、細胞毒素に複合されたアイソタイプ対照抗体または細胞毒素に複合された抗CD70 HuMAb 2H5を腹腔内投与した。本開示の抗体に複合可能な細胞毒素化合物の例が、2005年9月26日に出願された米国仮特許出願第60/720,499号明細書および2006年9月26日に出願されたPCT公開の国際公開第07/038658号パンフレット(これらの内容は参照により本明細書中に援用される)に記載されている。腫瘍が腫瘍エンドポイント(2000mm³)に達した時、マウスを安楽死させた。結果を図39A(786-O)および図39B(Caki-1)に示す。N2に複合された抗CD70抗体2H5は、腫瘍エンドポイント体積(2000mm³)に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍成長の進行を遅延させた。治療動物においては10%未満の体重変化があった。

30

40

【0576】

したがって、抗CD70抗体-細胞毒素複合体による治療は、リンパ腫腫瘍成長に対して直接のインビボ阻害効果を有する。

【0577】

実施例25. 抗CD70免疫複合体を用いての腎細胞癌異種移植片モデルのインビボ治療

腎癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0578】

チオール化抗CD70 2H5抗体に結合された複合体N1またはN2の免疫複合体を

50

過去に記載のように調製した（例えば、米国特許出願公開第2006/0024317号明細書；およびPCT出願のPCT/US2006/37793号明細書を参照）。NOD-SCIDマウスに 2.5×10^6 個の786-O細胞を皮下移植した。腫瘍形成を、平均腫瘍体積が（高精度キャリパーを用いて）約 80 mm^3 であることが測定されるまで監視した。腫瘍担持マウス8匹からなる群を、（a）媒体対照、（b）免疫複合体抗CD70-N1、または（c）免疫複合体抗CD70-N2のうちの1つの単回投与で治療した。免疫複合体の抗CD70-N1および抗CD70-N2を、マウスの腹腔内（i.p.）に、それぞれN1相当の $0.3 \mu\text{mol/kg}$ およびN2相当の $0.1 \mu\text{mol/kg}$ の用量で投与した。抗CD70-N1群は、1回目の投与後の21日目に同用量で2回目の治療を受けた。腫瘍成長を、実験の62日間にわたって高精度キャリパーを用いた測定により監視した。

10

【0579】

図40で明らかのように、免疫複合体抗CD70-N1または抗CD70-N2による単回投与治療の結果、媒体対照のみで治療される場合に実質的な腫瘍成長を有するマウスに対し、15日以内に腫瘍を有しないマウスが得られた（最大62日間、腫瘍を有しない状態が維持された）。

【0580】

実施例26．免疫複合体抗CD70 N2を用いての腎細胞癌異種移植片モデルのインビボ治療

腎癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

20

【0581】

チオール化抗CD70 2H5抗体に結合された複合体N2の免疫複合体を実施例25に記載のように調製した。SCIDマウスに、マウス1匹当たり、PBS0.1mlおよびMatrigel0.1ml中、 2.5×10^6 個の786-O細胞を皮下移植した。腫瘍形成を、平均腫瘍体積が（高精度キャリパーを用いて）約 105 mm^3 であることが測定されるまで監視した。腫瘍担持マウス8匹からなる群を、（a）媒体対照、（b）アイソタイプ対照、（c）抗CD70抗体2H5単独、または（d）免疫複合体抗CD70-N2のうちの1つの単回投与で治療した。免疫複合体抗CD70-N2およびアイソタイプ対照-N2（IgG-N2）を、マウスの腹腔内に、N2相当の $0.1 \mu\text{mol/kg}$ の用量で投与した。抗CD70抗体を 10 mg/kg （すなわち、免疫複合体CD70-N2において用いられるN2相当に対して等しいタンパク質用量）で投与した。腫瘍成長を、実験の62日間にわたって高精度キャリパーを用いた測定により監視した。

30

【0582】

図41で明らかのように、免疫複合体抗CD70-N2による単回の低用量治療の結果、対照または抗CD70抗体単独のみで治療される場合に実質的な腫瘍成長を有するマウスに対し、10日以内に最低限検出可能な腫瘍を有するマウスが得られた（そして最大62日間、その状態が維持された）。

【0583】

実施例27．免疫複合体抗CD70 N2に対するインビボでの腎細胞癌異種移植片の用量応答

腎癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

40

【0584】

チオール化抗CD70 2H5抗体に結合された複合体N2の免疫複合体を実施例25に記載のように調製した。SCIDマウスに、マウス1匹当たり、PBS0.1mlおよびMatrigel0.1ml中、 2.5×10^6 個の786-O細胞を皮下移植した。腫瘍形成を、平均腫瘍体積が（高精度キャリパーを用いて）約 280 mm^3 であることが測定されるまで監視した。腫瘍担持マウス8匹からなる群を、（a）媒体対照または（b）免疫複合体抗CD70-N2のいずれかで治療した。免疫複合体抗CD70-N2を、

50

各群のマウスの腹腔内に、N2相当の $0.03 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、 $0.01 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、または $0.005 \mu\text{mol}/\text{kg}$ のうちの1つの用量で投与した。腫瘍成長を、実験を通じて高精度キャリパーを用いた測定により監視した。

【0585】

図42で明らかのように、極めて低い用量の免疫複合体抗CD70-N2により腫瘍体積が減少し、用量依存的に腫瘍体積の減少が生じた。

【0586】

実施例28. 別の腎細胞癌異種移植片モデルについてのインビボでの免疫複合体抗CD70-N2の有効性

腎癌腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

10

【0587】

チオール化抗CD70-2H5抗体に結合された複合体N2の免疫複合体を実施例25に記載のように調製した。SCIDマウスに、マウス1匹当たり、PBS0.1mlおよびMatrigel0.1ml中、 2.5×10^6 個のCaki-1細胞を皮下移植した。腫瘍形成を、平均腫瘍体積が(高精度キャリパーを用いて)約 105mm^3 であることが測定されるまで監視した。腫瘍担持マウス8匹からなる群を、(a)媒体対照、(b)アイソタイプ対照、(c)抗CD70抗体2H5単独、または(d)免疫複合体抗CD70-N2のうちの1つの単回投与で治療した。免疫複合体抗CD70-N2およびアイソタイプ対照-N2を、マウスの腹腔内にN2相当の $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で投与した。抗CD70抗体を $11.5 \text{mg}/\text{kg}$ (すなわち、免疫複合体CD70-N2において用いられるN2相当に対して等しいタンパク質用量)で投与した。腫瘍成長を、実験の62日間にわたって高精度キャリパーを用いた測定により監視した。

20

【0588】

図43で明らかのように、免疫複合体抗CD70-N2による単回投与治療の結果、対照または抗CD70抗体単独のみで治療される場合に実質的な腫瘍成長を有するマウスに対し、最大約40日間で最低限検出可能な腫瘍を有するマウスが得られた。したがって、抗CD70免疫複合体は複数の腎癌モデルに対して有効である。

【0589】

実施例29. リンパ腫モデルにおけるインビボでの免疫複合体抗CD70-N2の有効性
リンパ腫腫瘍を移植したマウスを細胞毒素に複合された抗CD70抗体でインビボ治療し、腫瘍成長に対する抗体のインビボ効果を試験した。

30

【0590】

チオール化抗CD70-2H5抗体に結合された複合体N2の免疫複合体を実施例25に記載のように調製した。SCIDマウスに、マウス1匹当たり、PBS0.1mlおよびMatrigel0.1ml中、 1.0×10^7 個のRaji細胞を皮下移植した。腫瘍形成を、平均腫瘍体積が(高精度キャリパーを用いて)約 50mm^3 であることが測定されるまで監視した。腫瘍担持マウス8匹からなる群を、(a)媒体対照、(b)アイソタイプ対照、または(c)免疫複合体抗CD70-N2のうちの1つの単回投与で治療した。免疫複合体抗CD70-N2を、マウスの腹腔内にN2相当の $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量で投与した。腫瘍成長を、実験の60日間にわたって高精度キャリパーを用いた測定により監視した。

40

【0591】

図44で明らかのように、免疫複合体抗CD70-N2による単回投与治療の結果、対照または抗CD70抗体単独のみで治療される場合に実質的な腫瘍成長を有するマウスに対し、最大約40日間で最低限検出可能な腫瘍を有するマウスが得られた。したがって、抗CD70免疫複合体はまた、リンパ腫に対して有効である。

【0592】

実施例30. 免疫複合体抗CD70-N2の安全性試験

BALB/cマウスを、N2相当の $0.1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、 $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、0

50

・ $6 \mu\text{mol} / \text{kg}$ 、または $0.9 \mu\text{mol} / \text{kg}$ のうちの 1 つの用量での免疫複合体抗 CD70 - N2 の腹腔内投与で治療した。マウスの重量を、最初の 12 日間は毎日、またその後は投与後に最大 60 日間にわたり定期的に測定した。マウスを、体重減少が開始体重の 20% を超える時、安楽死させた。図 45 にプロットしたデータは各群における平均体重である。

【0593】

図 45 で明らかなように、抗 CD70 - N2 免疫複合体は、N2 相当の $0.9 \mu\text{mol} / \text{kg}$ 未満の用量で投与される場合、良好な耐性を示しかつ安全であった。したがって、免疫複合体抗 CD70 - N2 の有効性が示されている用量 (N2 相当の約 $0.005 \sim 0.3 \mu\text{mol} / \text{kg}$ の範囲) は良好な安全性特性を有することになる。

10

【0594】

実施例 31 . 免疫複合体抗 CD70 N2 のさらなる安全性試験

雄ビーグル犬における免疫複合体抗 CD70 N2 のさらなる安全性試験を実施した。免疫複合体を薬剤単独の場合と比較した。ビーグル犬 2 匹の各々に対し、N2 相当の $0.18 \mu\text{mol} / \text{kg}$ での免疫複合体抗 CD70 N2 および $0.15 \mu\text{mol} / \text{kg}$ での (N2 構造内にリンカーを有しない) N2 薬剤単独を静脈内投与した。イヌを投与後 4 時間にわたり毎時監視し、28 日間にわたり 1 日 2 回臨床観察を行った。体重を、投与後 8 日目まで毎日、その後は週単位で測定した。標準の血液学、凝固および臨床化学について、予備投与 (predose) 期中および投与後 3、7、14 および 28 日目に 2 回実施した。結果を図 46 A ~ D に示す。薬剤なしの群におけるイヌ 1 匹を、毒性の臨床徴候に

20

【0595】

実施例 32 . 活性化ヒト B 細胞の抗 CD70 抗体媒介性 ADCC

この試験では、HuMAb 抗 CD70 抗体および非フコシル化形態の、ヒト B 細胞に対する ADCC 効果に対する媒介能について試験した。凍結ヒト脾臓細胞を解凍し、B 細胞を磁気ビーズにより陰性として精製した。精製 B 細胞を、NEAA、ピルビン酸ナトリウム、 β -ME およびペニシリン/ストレプトマイシンを補充した RPMI + 10% FBS 中、 $2 \times 10^6 / \text{ml}$ で培養した。B 細胞を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の LPS および $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 CD40 により 3 日間活性化した。細胞を採取し、洗浄し、一定分量をビオチンと複

合した非フコシル化 2H5 (2H5 NF - bio) + ストレプトアビジン - APC で染色した。ヒト末梢血単核エフェクター細胞を、標準の Ficoll - Paque 分離によりヘパリン化全血から精製し、 $50 \text{U} / \text{ml}$ IL - 2 の存在下で一晩培養した。活性化 B 細胞を、 1×10^6 個の細胞当たり $100 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer、Welllesley、MA) で 1 時間標識した。エフェクター細胞を、2H5 および 2H5 NF (非フコシル化) の段階希釈物の存在下で標識標的細胞に 1 : 100 の比で添加した。さらに、試験項目について、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ のマウス抗 CD16 抗体 3G8 またはマウスアイソタイプ対照抗体の存在下で $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ でアッセイした。37 で 4 時間のインキュベーション後、細胞を遠心分離し、上清を、 $240 \sim 400 \text{KeV}$ の読み取り窓を備えた Cobra II 自動ガンマカウンタ (Perkin Elmer) で読み取った。特異的溶解率を、(実験放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) $\times 100$ に従って計算し、ここでは (i) 自然放出においては標的細胞はエフェクター細胞も抗体対照も全く有しないでかつ (ii) 最大放出においては標的およびエフェクター細胞は 3% Lysol 洗剤対照の存在下である。特異的溶解率を抗体濃度に対してプロットし、データを、GraphPad Prism (商標) 3.0 ソフトウェア (San Diego、CA) を用い、非線形回帰、S 字形用量応答 (可変性の傾き) により分析した。

30

40

【0596】

データを図 47 に示す。2H5 NF は活性化 B 細胞の約 60% に結合する。2H5 NF および 2H5 の双方は、活性化ヒト B 細胞の溶解を誘発したが、2H5 NF は 2H

50

5 よりも約 10 倍強力がかつ有効であった。抗体誘発性溶解の抗 CD 16 の反転により、抗体媒介性溶解の作用機序が NK 細胞媒介性の ADCC であることが確認される。したがって、2H5 および 2H5 NF の双方は、ヒト活性化 B 細胞の ADCC を媒介する。

【0597】

実施例 33 . 抗 CD 70 抗体による、CMV 抗原で刺激されたヒト CD 4 + T 細胞の増殖のインビトロでの阻害

この試験では、抗 CD 70 抗体の、刺激されたヒト PBMC 培養物中に自然に存在するエフェクター細胞による ADCC を介した、抗原で活性化された CD 70 + ヒト T 細胞 (自己免疫疾患および炎症性疾患における炎症性プロセスに対する主要な寄与因子である細胞) の溶解に対する媒介能が示される。

10

【0598】

CMV 陽性の予備スクリーニングされたドナーを、24 ウェル培養プレート上、 1×10^6 細胞 / ml で 10 % 熱不活性化 FCS を補充した AIM - V 培地中で培養し、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ のビオチン化 2H5、2H5 NF または hIgG1nf 対照抗体の存在下で、 $5.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ の CMV 溶解物で刺激した。細胞を 9 日目に採取し、各培養物中の生存細胞数 / ml を、一定分量を血球計数器およびトリプシン排除を用いて計数することにより測定した。細胞を染色緩衝液で洗浄し、5 % ヒト血清でブロッキングした。ビオチン化 2H5、2H5 NF、または hIgG1nf を、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ の最終濃度で等容量の細胞に添加した。細胞を 30 分間インキュベートし、洗浄し、抗 CD 4 - FITC および PE 複合ストレプトアビジンで染色した。細胞を再び 30 分間インキュベートし、2 回洗浄し、次いで BD Cyt of ix / Cyto perm キットを用い、固定して膜透過させた。細胞をパーム / 洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、抗 INF - APC (BD Clone B27) で細胞内染色を行った。細胞を 30 分間インキュベートし、洗浄し、染色緩衝液中に再懸濁した。細胞を、CD 70 表面におけるフローサイトメトリーにより分析し、INF の細胞内発現を生存 CD 4 + 細胞上でのゲーティングにより分析した。各条件下での CD 4 + / CD 70 + および CD 4 + / INF + 細胞の数 / ml を、CD 4 ゲート内の CD 70 + または INF + 細胞のパーセント \times 全 CD 4 + 細胞のパーセント \times 生存可能細胞の総数 / ml ((% CD 70 + または INF +) \times (% CD 4 +) \times (全生存可能細胞 / ml)) により計算した。

20

【0599】

データを図 48 に示す。 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ での 2H5 および 2H5 NF は、9 日目、CMV で活性化された CD 70 + / CD 4 + 細胞をそれぞれ 67 % および 97 % 低下させた。両方の抗体は有効であったが、抗原で活性化された CD 4 + / CD 70 + T 細胞の ADCC を正常なヒト血液中に存在する CD 16 + エフェクター細胞により媒介するのに 2H5 NF は 2H5 よりも強力であった。

30

【0600】

実施例 34 . ヒト CD 70 抗体 1F4、1F4 NF および 2H5 NF の CD 70 + 腎癌細胞系 786 - O への結合についての相対的結合特性

この試験では、抗 CD 70 抗体の天然に発現する CD 70 + ヒト癌細胞系 786 - O 細胞に対する結合特性について検討した。ヒト腎細胞腺癌細胞系 786 - O はコンフルエンスに成長し、それをトリプシンで採取し、染色緩衝液で洗浄し、1F4、1F4 NF、2H5 NF、hIgG1 - NF または hIgG4 (それぞれ 30、10、3、1、0.4、0.1、0.04 および $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ の最終濃度) とともにインキュベートした。細胞を氷上で 30 分間インキュベートし、染色緩衝液で 2 回洗浄し、ヤギ F (ab) ' 2 - 抗ヒト - IgG (Fc) - PE 複合体で 30 分間染色した。フローサイトメトリーによる分析のため、細胞を洗浄し、染色緩衝液中に再懸濁した。

40

【0601】

データを図 49 に示す。2H5 NF は 1F4 および 1F4 NF よりも低い濃度で結合する。2H5 NF は、天然細胞表面に発現される CD 70 に対して 1F4 および 1F4 NF よりも高い結合親和性を有する。1F4 および 1F4 NF は 786 - O 細胞系

50

に等しく十分に結合し、NFアイソタイプに起因して特異的結合特性の作用を全く示さない。

【0602】

実施例35．1F4および1F4 NFの、CD70+リンパ腫細胞系ARH77に対するADCCを媒介する相対的能力

この試験では、フコシル化および非フコシル化(nf)抗CD70抗体の、CD70+リンパ腫細胞系ARH77に対するADCCを媒介する相対的能力について試験した。ヒト末梢血単核エフェクター細胞を、標準のFicoll-Paque分離によりヘパリン化全血から精製し、50U/mlのIL-2の存在下で一晩培養した。ARH77細胞を 1×10^6 個の細胞当たり100 μ Ciの $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer、Welllesley、MA)で1時間標識した。エフェクター細胞を、2H5および2H5nfの段階希釈物の存在下、1:100の比での標識標的細胞に添加した。さらに、試験項目について5 μ g/mlでアッセイした。37 $^\circ$ Cで4時間のインキュベーション後、細胞を遠心分離し、上清を、240~400KeVの読み取り窓を備えたCobra II自動ガンマカウンタ(Perkin Elmer)で読み取った。特異的溶解率を、(実験放出-自然放出)/(最大放出-自然放出) \times 100に従って計算した。ここでは(i)自然放出においては標的細胞はエフェクター細胞も抗体対照も全く有しないかつ(ii)最大放出においては標的およびエフェクター細胞は3%Lysol洗剤対照の存在下である。

10

【0603】

データを図50に示す。1F4および1F4 NFの双方は、CD70+ARH77細胞に対するADCCを媒介し、1F4 NFは1F4よりも強力なADCCのメディエーターである。

20

【0604】

実施例36．抗CD70-サイトトキシンEによるインビボでの腫瘍成長阻害

異なる腫瘍細胞に対する標的化治療薬としての抗CD70-サイトトキシンE複合体の広範な有用性を実証するため、SCIDマウスにおける3つの腎細胞癌異種移植片モデルおよび2つのリンパ腫モデルを用い、インビボでの抗CD70-サイトトキシンE複合体の有効性を試験した。CD70抗体2H5の細胞毒素複合体は本明細書中で抗CD70-サイトトキシンEと称され、それはサイトトキシンEに結合された組換え2H5抗CD70抗体からなり(図74)、2006年12月28日に出願された米国仮特許出願第60/882,461号明細書(その内容全体は参照により本明細書中に具体的に援用される)にさらに記載されている。サイトトキシンEはプロドラッグ形態であり、活性のため、抗体からの放出だけでなく活性部分を放出するための4'カルバメート基の切断を必要とする。

30

【0605】

786-O細胞異種移植片上での抗CD70-サイトトキシンEの活性を実証するため、マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel(商標)0.1ml中の250万個の786-O細胞をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が110mm³の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、0.005、0.03または0.1 μ mol/kg体重のいずれかでの抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独、抗CD70抗体単独(0.03および0.1 μ mol/kgでの抗CD70-サイトトキシンEで用いられる用量に等しい用量)、または0.03および0.1 μ mol/kgの用量でのサイトトキシンEに結合されたアイソタイプ対照抗体のいずれかを注射した。腫瘍体積(LWH/2)およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後61日間にわたって続けた。結果を図51に示す。この免疫不全状態の特定のマウス異種移植片モデルでは、規定用量での裸CD70抗体による治療は腫瘍体積に対する効果を示さなかった(すなわち腫瘍成長を阻害しなかった)。アイソタイプ対照もまた、腫瘍成長に対する効果をほとんど有しなかった。それに対し、抗CD70-サイトトキシンE複合体は用量依存性の抗腫瘍有効性を明らかに示した。特異

40

50

的複合体の治療効果は、 $0.03 \mu\text{mol}/\text{kg}$ であっても最大であるように思われる。

【0606】

次いで、抗CD70-サイトトキシンEの活性が、A498腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。A498細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中500万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が 110mm^3 の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、 0.03 、 0.1 もしくは $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重のいずれかでの抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後約60日間にわたって続けた。結果を図52に示す。結果は、このモデルでは抗CD70-サイトトキシンE複合体が腎癌の治療において有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

10

【0607】

次いで、抗CD70-サイトトキシンEの活性が、Caki-1腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。Caki-1細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中250万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が 150mm^3 の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、 0.03 、 0.1 もしくは $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重のいずれかでの抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに追加の群を用い、14日で分け、 $0.1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ での抗CD70-サイトトキシンE複合体の2用量の投与による反復投与療法の効果を試験した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後62日間にわたって続けた。結果を図53に示す。結果は、抗CD70-サイトトキシンE複合体がCaki-1腫瘍を担持するマウスにおける腎癌の治療において有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

20

【0608】

リンパ腫のモデルにおける抗CD70-サイトトキシンEの活性を実証するため、皮下Raji異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて試験を行った。Raji細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中1000万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が 250mm^3 の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、 0.03 、 0.1 もしくは $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重での抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独または 0.1 もしくは $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重でのサイトトキシンEに結合されたアイソタイプ対照抗体を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後約60日間にわたって続けた。結果を図54に示す。結果は、このモデルでは抗CD70-サイトトキシンE複合体がリンパ腫の治療において有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

30

【0609】

第2のリンパ腫モデルについてはDauidi異種移植片を用いて行った。Dauidi細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中1000万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が 70mm^3 の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、 0.1 または $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重のいずれかでの抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、抗CD70抗体単独または 0.1 もしくは $0.3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重でのアイソタイプ対照抗体サイトトキシンE複合体を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後約60日間にわたって続けた。結果を図55に示す。この免疫不全状態の特定のマウス異種移植片モデルでは、規定用量での裸CD70抗体による治療は腫瘍体積に対する効果を示さなかった（すなわち腫瘍成長を阻害しなかった）。それに対し、このモデルでは抗CD70-サイトトキシンE複合体はリンパ腫に対して有効でありかつその治療は用量依存性である。

40

【0610】

50

有効性が複数の種で観察されうることを実証するため、ヌードラットにおける異種移植片モデルを試験した。このモデルでは、全身照射ヌードラットにCaki-1細胞(ラット1匹当たり0.2mlのRPMI-1640中1000万個)を皮下移植し、腫瘍が100mm³の平均サイズに達した時、ラット群を、0.1もしくは0.3μmol/kg体重のいずれかでの抗CD70-サイトトキシンEの単回投与の腹腔内注射により治療した。あるいは複数回投与治療を行い、ここではラットは8、15および22日目に0.3μmol/kg体重の3回の投与を受けた。さらに、対照群に対し、単回用量として0.3μmol/kg体重でまたは同複数回投与治療において、媒体単独、抗CD70抗体単独またはアイソタイプ対照抗体サイトトキシンE複合体を注射した。腫瘍体積(LW²/2)およびラットの重量を、試験を通じて記録した。結果を図56に示す。この免疫不全状態の特定のマウス異種移植片モデルでは、規定用量での裸CD70抗体による治療は腫瘍体積に対する効果を示さなかった(すなわち腫瘍成長を阻害しなかった)。それに対し、抗CD70-サイトトキシンE複合体は顕著な抗腫瘍効果を示した。有効性は複数回投与治療で増大するとともに、動物の体重に対して有意な効果はなかった。反復投与治療の場合でさえ、アイソタイプ対照複合体が示す腫瘍成長に対する効果ははるかに低かった。

【0611】

抗CD70複合体の安全性を3つの異なる動物種において試験した。正常なbalb/cマウス5匹からなる群に対し、0.1、0.3、0.6および0.9μmol/kg体重の用量で抗CD70-サイトトキシンEを腹腔内投与し、動物の体重を60日間にわたり監視し、媒体単独を注射した動物と比較した。試験を通じて、対照動物は10~20%の体重増加を得た。抗CD70-サイトトキシンEを投与したマウスは、複合体が一般に良好な耐性を示し、より低い用量では体重に対する効果がほとんどないことを示した。明確な毒性において用量依存性の増大があるとともに、高用量により回復前の動物の体重の一時的減少がもたらされた。それに対し、複合体は異種移植片モデルにおける有効性にとって必要な用量を超える用量で良好な耐性を示す。結果を図57に示す。

【0612】

イヌおよびサル双方における毒性についても試験した。イヌ3匹からなる群に対して0.1、0.2、0.3、0.4および0.6μmol/kg体重で投与し、サル2匹からなる群に対して0.2、0.4、0.6および0.8μmol/kg体重で投与した。各試験においては、全白血球数および血小板数が抗CD70抗体-サイトトキシンE複合体における毒性に対して特に感受性が高い指標と考えられることからそれらに対して特別な注意を払った。イヌにおいては、用量が0.6μmol/kg体重に達するまで観察される細胞数の変化は全く有意でなかった。この用量では、血小板数における一時的減少が生じ、白血球数も減少した。サルにおいては、任意の用量でこれらのパラメータの変化はほとんど観察されなかった。両方の試験は、動物における抗CD70複合体の毒性用量が異種移植片モデルにおける有効用量よりも有意に高いことを裏付けている。結果を図58(イヌの結果)および59(サルの結果)に示す。

【0613】

実施例37. 抗CD70-サイトトキシンFによるインビボでの腫瘍成長阻害

本実施例では、腎癌および1つのリンパ腫の2つの異種移植片モデルにおける抗CD70-サイトトキシンFの有効性が示される。CD70抗体2H5の細胞毒素複合体は本明細書中でCD70-サイトトキシンFと称され、それはサイトトキシンFに結合された組換え2H5抗CD70抗体からなる(図75)。サイトトキシンFはエステラーゼ活性化を必要とするプロドラッグである。

【0614】

786-O細胞異種移植片に対する抗CD70-サイトトキシンFの活性を実証するため、マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel(商標)0.1ml中250万個の786-O細胞をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が110mm³の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、0.005、0.03もしくは0.1μmo

10

20

30

40

50

1 / k g 体重のいずれかでの抗 C D 7 0 - サイトトキシン F の単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独または 0 . 0 3 および 0 . 1 μ m o l / k g の用量でのサイトトキシン F に結合されたアイソタイプ対照抗体のいずれかを注射した。腫瘍体積 (L W H / 2) およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後 6 2 日間にわたって続けた。結果を図 6 0 に示す。この免疫不全状態の特定のマウス異種移植片モデルでは、規定用量での裸 C D 7 0 抗体による治療は腫瘍体積に対する効果を示さなかった (すなわち腫瘍成長を阻害しなかった) 。アイソタイプ対照複合体もまたこの実験において腫瘍成長に対する効果をほとんど有しなかった一方、抗 C D 7 0 - サイトトキシン F で治療されたマウスは用量依存性の抗腫瘍有効性を明らかに示した。特定の複合体の治療効果は、0 . 0 3 μ m o l / k g であっても最大であるように思われた。

10

【 0 6 1 5 】

次いで、抗 C D 7 0 - サイトトキシン F の活性が C a k i - 1 腫瘍異種移植片を担持する S C I D マウスにおいて示された。C a k i - 1 細胞 (マウス 1 匹当たり P B S 0 . 1 m l および M a t r i g e l (商標) 0 . 1 m l 中 2 5 0 万個) を S C I D マウスに皮下移植し、腫瘍が 1 2 0 m m ³ の平均サイズに達した時、マウス 8 匹からなる群を、0 . 0 3、0 . 1 もしくは 0 . 3 μ m o l / k g 体重のいずれかでの抗 C D 7 0 - サイトトキシン F の単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後 6 2 日間にわたって続けた。結果を図 6 1 に示す。結果は、抗 C D 7 0 - サイトトキシン F 複合体が C a k i - 1 腫瘍を担持するマウスにおいて有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

20

【 0 6 1 6 】

リンパ腫のモデルにおける抗 C D 7 0 - サイトトキシン F の活性を実証するため、皮下 R a j i 異種移植片を担持する S C I D マウスにおいて試験を行った。R a j i 細胞 (マウス 1 匹当たり P B S 0 . 1 m l および M a t r i g e l (商標) 0 . 1 m l 中 1 0 0 0 万個) を S C I D マウスに皮下移植し、腫瘍が 2 5 0 m m ³ の平均サイズに達した時、マウス 8 匹からなる群を、0 . 0 3、0 . 1 もしくは 0 . 3 μ m o l / k g 体重のいずれかでの抗 C D 7 0 - サイトトキシン F の単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独または 0 . 1 もしくは 0 . 3 μ m o l / k g 体重でのサイトトキシン F に結合されたアイソタイプ対照抗体を注射した。腫瘍体積 (L W H / 2) およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後約 6 0 日間にわたって続けた。結果を図 6 2 に示す。結果は、抗 C D 7 0 - サイトトキシン F 複合体がリンパ腫に対しても有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

30

【 0 6 1 7 】

実施例 3 8 . 抗 C D 7 0 - サイトトキシン G によるインビボでの腫瘍成長阻害

本実施例では、腎癌の 2 つの異種移植片モデルにおける抗 C D 7 0 - サイトトキシン G の有効性が示される。C D 7 0 抗体 2 H 5 の細胞毒素複合体は本明細書中で C D 7 0 - サイトトキシン G と称され、それはサイトトキシン G に結合された組換え 2 H 5 抗 C D 7 0 抗体からなる (図 7 6) 。サイトトキシン G はエステラーゼ活性化を必要とするプロドラッグである。

【 0 6 1 8 】

7 8 6 - O 細胞異種移植片に対する抗 C D 7 0 - サイトトキシン G の活性を実証するため、マウス 1 匹当たり P B S 0 . 1 m l および M a t r i g e l (商標) 0 . 1 m l 中、2 5 0 万個の 7 8 6 - O 細胞を S C I D マウスに皮下移植し、腫瘍が 1 1 0 m m ³ の平均サイズに達した時、マウス 8 匹からなる群を、0 . 0 0 5、0 . 0 3 もしくは 0 . 1 μ m o l / k g 体重のいずれかでの抗 C D 7 0 - サイトトキシン G の単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独または 0 . 0 3 および 0 . 1 μ m o l / k g の用量でのサイトトキシン G に結合されたアイソタイプ対照抗体のいずれかを注射した。腫瘍体積 (L W H / 2) およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後 6 1 日間にわたって続けた。結果を図 6 3 に示す。結果は、この実験において抗 C D 7 0 抗体単独またはアイソタイプ対照複合体が腫瘍の成長に対する効果をほとんど有しない一方、抗

40

50

CD70 - サイトトキシンGで治療されたマウスが用量依存性の抗腫瘍有効性を明らかに示すことを示す。

【0619】

次いで、抗CD70 - サイトトキシンGの活性がCaki - 1腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。Caki - 1細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中250万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が120mm³の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、0.03、0.1もしくは0.3μmol/kg体重のいずれかでの抗CD70 - サイトトキシンGの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後61日間にわたって続けた。結果を図64に示す。結果は、抗CD70 - サイトトキシンG複合体がCaki - 1腫瘍を担持するマウスにおける腎癌に対して有効でありかつ治療が用量依存性であることを示す。

10

【0620】

実施例39 . 抗CD70 - サイトトキシンHによるインビボでの腫瘍成長阻害

本実施例では、腎癌の2つの異種移植片モデルにおける抗CD70 - サイトトキシンHの有効性が示される。CD70抗体2H5の細胞毒素複合体は本明細書中でCD70 - サイトトキシンHと称され、それはサイトトキシンHに結合された組換え2H5抗CD70抗体からなる（図77）。

【0621】

抗CD70 - サイトトキシンHの活性がA498腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。A498細胞（マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中500万個）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が110mm³の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、0.1μmol/kg体重での抗CD70 - サイトトキシンHの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後約60日間にわたって続けた。これらの結果を図65に示す。結果は、抗CD70 - サイトトキシンH複合体が腎癌に対して有効であることを示す。

20

【0622】

Caki - 1細胞異種移植片に対する抗CD70 - サイトトキシンHの活性を実証するため、マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel（商標）0.1ml中、250万個のCaki - 1細胞をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が130mm³の平均サイズに達した時、マウス8匹からなる群を、0.03、0.1もしくは0.3μmol/kg体重のいずれかでの抗CD70 - サイトトキシンHの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独または0.1および0.3μmol/kgの用量でのサイトトキシンHに結合されたアイソタイプ対照抗体のいずれかを注射した。腫瘍体積（LWH/2）およびマウスの重量を、試験を通じて記録し、投与後61日間にわたって続けた。結果を図66に示す。この免疫不全状態の特定のマウス異種移植片モデルでは、規定用量での裸CD70抗体による治療は腫瘍体積に対する効果を示さなかった（すなわち腫瘍成長を阻害しなかった）。アイソタイプ対照複合体もまた、この実験において腫瘍の成長に対する効果をほとんど有しない。それに対し、抗CD70 - サイトトキシンH複合体は用量依存性の抗腫瘍有効性を明らかに示す。

30

40

【0623】

実施例40 . 抗CD70 - サイトトキシンIによるインビボでの腫瘍成長阻害

本実施例では、SCIDマウスにおける786 - O細胞およびヌードラットにおけるCaki - 1細胞といった腎癌の2つの異種移植片モデルにおける抗CD70 - サイトトキシンIの有効性が示されている。CD70抗体2H5の細胞毒素複合体は本明細書中でCD70 - サイトトキシンIと称され、それはサイトトキシンIに結合された組換え2H5抗CD70抗体からなる（図78）。

【0624】

50

抗CD70-サイトトキシンIの活性が786-O腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。786-O細胞(マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel(商標)0.1ml中250万個)をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が170mm³の平均サイズに達した時、マウス6匹からなる群を、0.005μmol/kg体重での抗CD70-サイトトキシンIの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積(LWH/2)およびマウスの重量を、試験を通じて記録した。結果を図67に示す。これらの結果は、抗CD70-サイトトキシンI複合体が低用量であっても腎癌に対して有効であることを示す。

【0625】

有効性が複数の種において観察されうることを実証するため、ヌードラットにおける異種移植片モデルを試験した。このモデルでは、ヌードラットにCaki-1細胞(ラット1匹当たり0.2mlのRPMI-1640中1000万個)を皮下移植し、腫瘍が100mm³の平均サイズに達した時、ラット群を0.3μmol/kg体重での抗CD70-サイトトキシンIの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に対し、媒体単独、抗CD70抗体単独または単回用量として0.3μmol/kg体重でのアイソタイプ対照抗体サイトトキシンI複合体を注射した。腫瘍体積(LW²/2)およびラットの重量を、試験を通じて記録した。結果を図68に示す。結果は、CD70抗体単独が腫瘍成長に対する効果をほとんど有することなく、かつアイソタイプ対照複合体が腫瘍成長に対する効果を全く示さないことを示す。しかし、抗CD70-サイトトキシンI複合体は顕著な抗腫瘍効果を示す。腫瘍の緩解が得られた。したがって、抗CD70-サイトトキシンI複合体は複数の種において抗腫瘍効果を示す。

【0626】

実施例41. 抗CD70-サイトトキシンJによるインビボでの腫瘍成長阻害

本実施例では、SCIDマウスにおける786-O細胞といった腎癌の異種移植片モデルにおける抗CD70-サイトトキシンJの有効性が示されている。CD70抗体2H5の細胞毒素複合体は本明細書中でCD70-サイトトキシンJと称され、それはサイトトキシンJに結合された組換え2H5抗CD70抗体からなる(図79)。サイトトキシンJは、活性化のためのグルクロニダーゼによる切断を必要とするプロドラッグである。

【0627】

抗CD70-サイトトキシンJの活性が786-O腫瘍異種移植片を担持するSCIDマウスにおいて示された。786-O細胞(マウス1匹当たりPBS0.1mlおよびMatrigel(商標)0.1ml中250万個)をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍が170mm³の平均サイズに達した時、マウス6匹からなる群を、0.03μmol/kg体重での抗CD70-サイトトキシンJの単回投与の腹腔内注射により治療した。さらに、対照群に媒体単独を注射した。腫瘍体積(LWH/2)およびマウスの重量を、試験を通じて記録した。結果を図69に示す。結果は、このモデルにおいて抗CD70-サイトトキシンJ複合体が腎癌に対して有効であることを示す。

【0628】

実施例42. 抗CD70抗体によるCD70で共刺激されたT細胞増殖の機能遮断

本実施例は、抗CD70抗体1F4 IgG1、1F4 IgG4、2H5、2H5 F(ab')₂および2H5 FabによるCD70で共刺激されたT細胞増殖の機能遮断の分析および特徴づけについて記載する。

【0629】

ヒトCD3+T細胞を、MACS CD3 Microbeadsを用いて冷凍保存したPBMCから単離し、次いで、マウスCD32およびヒトCD70の双方を安定的に形質移入したマイトマイシンCで処理したCHO細胞の存在下、RPMI-1640完全培地+10%熱不活性化FCS中、2×10⁶細胞/mlで培養した。細胞を1μg/mlの抗CD3(クローンOKT3)で3日間刺激し、1μCi/ウェルの³H-チミジンを6時間添加し、細胞を採取した。増殖を、シンチレーション計数により取り込まれるCPMとして測定した。

10

20

30

40

50

【0630】

データは、1F4および2H5抗体が、用量依存的に、ヒト抗CD3で刺激されたT細胞により、CD70媒介性のCD27シグナル伝達で誘発される増殖を遮断しうること示す。データはまた、2H5による機能遮断が非典型的には活性の遮断に作用するためのIgG1Fc領域媒介性の細胞表面CD70の多量体化を必要とする一方、1F4は典型的には必要としないことを示す。図70を参照のこと。2H5により結合されたエピトープのその異常な特性は、2H5F(ab')₂の機能遮断の有効性の低下および2H5IgG1に対する2H5Fabの機能遮断活性の完全な欠如により示される。それに対し、1F4IgG4の1F4IgG1と等価な機能遮断活性は、典型的には機能遮断活性を有する抗体で観察されるように、1F4により結合されたエピトープが典型的には活性の遮断に作用するためのIgG1Fc領域媒介性のCD70の多量体化を必要としないことを示す。

10

【0631】

したがって、これらのデータは、2H5が、CD70媒介性のヒトT細胞活性化の機能遮断についての異常でかつ場合によっては固有の特性を有するエピトープに結合することを示す。さらに、2H5により結合されたエピトープはまた、好ましくは2H5IgG1または2H5NF媒介性のADCC、内在化、親和性などの質および効力に寄与しうる。

【0632】

抗体1F4および2H5の、ヒト抗CD3で刺激されたT細胞による、CD70媒介性のCD27シグナル伝達で誘発される増殖に対する遮断能は、CD70機能が疾患の進行に關与する場合での任意の炎症徴候の治療に關連性がある。

20

【0633】

配列識別表

配列番号	配列	配列番号	配列
1	V _H アミノ酸 2H5	31	V _K CDR1 アミノ酸 2H5
2	V _H アミノ酸 10B4	32	V _K CDR1 アミノ酸 10B4
3	V _H アミノ酸 8B5	33	V _K CDR1 アミノ酸 8B5
4	V _H アミノ酸 18E7	34	V _K CDR1 アミノ酸 18E7
5	V _H アミノ酸 69A7	35	V _K CDR1 アミノ酸 69A7 および 69A7Y
6	V _H アミノ酸 1F4	36	V _K CDR1 アミノ酸 1F4
7	V _K アミノ酸 2H5	37	V _K CDR2 アミノ酸 2H5
8	V _K アミノ酸 10B4	38	V _K CDR2 アミノ酸 10B4
9	V _K アミノ酸 8B5	39	V _K CDR2 アミノ酸 8B5
10	V _K アミノ酸 18E7	40	V _K CDR2 アミノ酸 18E7
11	V _K アミノ酸 69A7 および 69A7Y	41	V _K CDR2 アミノ酸 69A7 および 69A7Y
12	V _K アミノ酸 1F4	42	V _K CDR2 アミノ酸 1F4
13	V _H CDR1 アミノ酸 2H5	43	V _K CDR3 アミノ酸 2H5
14	V _H CDR1 アミノ酸 10B4	44	V _K CDR3 アミノ酸 10B4
15	V _H CDR1 アミノ酸 8B5	45	V _K CDR3 アミノ酸 8B5
16	V _H CDR1 アミノ酸 18E7	46	V _K CDR3 アミノ酸 18E7
17	V _H CDR1 アミノ酸 69A7 および 69A7Y	47	V _K CDR3 アミノ酸 69A7 および 69A7Y
18	V _H CDR1 アミノ酸 1F4	48	V _K CDR3 アミノ酸 1F4
19	V _H CDR2 アミノ酸 2H5	49	V _H ヌクレオチド 2H5
20	V _H CDR2 アミノ酸 10B4	50	V _H ヌクレオチド 10B4
21	V _H CDR2 アミノ酸 8B5	51	V _H ヌクレオチド 8B5
22	V _H CDR2 アミノ酸 18E7	52	V _H ヌクレオチド 18E7
23	V _H CDR2 アミノ酸 69A7 および 69A7Y	53	V _H ヌクレオチド 69A7
24	V _H CDR2 アミノ酸 1F4	54	V _H ヌクレオチド 1F4
25	V _H CDR3 アミノ酸 2H5	55	V _K ヌクレオチド 2H5
26	V _H CDR3 アミノ酸 10B4	56	V _K ヌクレオチド 10B4
27	V _H CDR3 アミノ酸 8B5	57	V _K ヌクレオチド 8B5
28	V _H CDR3 アミノ酸 18E7	58	V _K ヌクレオチド 18E7
29	V _H CDR3 アミノ酸 69A7	59	V _K ヌクレオチド 69A7 および 69A7Y
30	V _H CDR3 アミノ酸 1F4	60	V _K ヌクレオチド 1F4
61	V _H 3-30.3 生殖細胞系アミノ酸	69	JH4b 生殖細胞系アミノ酸
62	V _H 3-33 生殖細胞系アミノ酸	70	JK4 生殖細胞系アミノ酸
63	V _H 4-61 生殖細胞系アミノ酸	71	JK3 生殖細胞系アミノ酸

10

20

30

40

64	V _H 3-23 生殖細胞系アミノ酸	72	JK2 生殖細胞系アミノ酸
65	V _K L6 生殖細胞系アミノ酸	73	V _H アミノ酸 69A7Y
66	V _K L18 生殖細胞系アミノ酸	74	V _H スクレオチド 69A7Y
67	V _K L15 生殖細胞系アミノ酸	75	V _H CDR3 アミノ酸 69A7Y
68	V _K A27 生殖細胞系アミノ酸	76	ヒト CD70 (P32970)
		77	ペプチドリンカー
		78	ペプチドリンカー
		79	ペプチドリンカー
		80	ペプチドリンカー
		81	ペプチドリンカー
		82	ペプチドリンカー
		83	ペプチドリンカー
		84	ペプチドリンカー
		85	ペプチドリンカー
		86	ペプチドリンカー
		87	ペプチドリンカー
		88	ペプチドリンカー
		89	ペプチドリンカー
		90	サイトメガロウイルスペプチド
		91	ペプチドリンカー
		92	ペプチドリンカー

10

20

【 図 1 A 】

抗CD70 2H5 VH 領域

V セグメント : 3-30.3
D セグメント : 未決定
J セグメント : JH4b

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAG CTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
CDR1
R L S C A A S G F T F S S Y I M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTT ACC TTC AGT AGC TAT ATT ATG CAC TGG
CDR2
V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT
CDR2
G R N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGA AAC AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
CDR3
T A V Y Y C A R D T D G Y D F D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACG GAT GGC TAC GAT TTT GAC TAC TGG
G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
JH4b

【 図 1 B 】

抗CD70 2H5 VK 領域

V セグメント : L6
J セグメント : JK4

E I V L T O S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR1
A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GGC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC
CDR2
Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG
CDR2
A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT
CDR3
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG
CDR3
R T N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT ACC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
JK4

【 図 2 A 】

抗CD70 10B4 VH 領域

V セグメント : 3-30.3
D セグメント : 4-11
J セグメント : JH4b

Q I Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAA ATA CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
CDR1
R L S C A A S G F T F S Y Y A M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC GGT TAC TAT GCT ATG CAC TGG
CDR2
V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT
CDR2
G S I K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGC ATT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
CDR3
T A V Y Y C A R E Q P Y S H Y L D Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GGC CCT TAC AGT AAC TAC CTT GAC TAC
W G Q G T L V T V S S
325 TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
JH4b

【 図 2 B 】

抗CD70 10B4 VK 領域

V セグメント : L18
J セグメント : JK3

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
CDR1
V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT
CDR2
Q Q K P G K A P K F L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC TTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
CDR2
E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AAG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3
F N S Y P F T F G P G T K V D I K
271 TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
JK3

【 図 3 A 】

抗 CD70 8B5 VH 領域

V セグメント : 3-33
D セグメント : 3-10
J セグメント : JH4b

```

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

          CDR1
-----
R L S C A T S G P T F S D Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCG ACG TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT GGC ATG CAC TGG

          CDR2
-----
V R Q A P G K G L E N V A V I W Y D
109 GTC GGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

          CDR2
-----
G S N K Y Y A D S V K G R P T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K K T L S L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAA ACG CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

          CDR3
-----
T A V Y Y C A R D S I M V R G D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCT ATT ATG GTT GGG GAC TAC TGG
                                     ↳ JK4b

G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

【 図 3 B 】

抗 CD70 8B5 VK 領域

V セグメント : L15
J セグメント : JK4

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

          CDR1
-----
V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

          CDR2
-----
Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GGT GCA TCC AGT TTG

          CDR2
-----
Q S G V P S R F S G S G S G T D F F
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

          CDR3
-----
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ITT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

          CDR3
-----
Y N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT CTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                                     ↳ JK4

```

【 図 4 A 】

抗 CD70 18E7 VH 領域

V セグメント : 3-33
D セグメント : 3-10
J セグメント : JH4b

```

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

          CDR1
-----
R L S C A A S S F T F S D H G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGC GAC CAT GGC ATG CAC TGG

          CDR2
-----
V R Q A P G K G L E N V A V I W Y D
109 GTC GGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

          CDR2
-----
G S N K Y Y A D S V K G R P T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

          CDR3
-----
T A V Y Y C A R D S I M V R G D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCT ATT ATG GTT GGG GAC TAC TGG
                                     ↳ JK4b

G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

【 図 4 B 】

抗 CD70 18E7 VK 領域

V セグメント : L15
J セグメント : JK4

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

          CDR1
-----
V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

          CDR2
-----
Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GGT GCA TCC AGT TTG

          CDR2
-----
Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

          CDR3
-----
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ITT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

          CDR3
-----
Y N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT CTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                                     ↳ JK4

```

【 図 5 A 】

抗 CD70 69A7 VH

V セグメント : 4-61
D セグメント : 4-23
J セグメント : JH4b

1 Q V Q L Q E S G F G L V K P S E T L
CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG ARG CCT TCG GAG ACC CTG
CDR1
S L T C T V S G G S V S S D Y Y Y W
TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GAT TAT TAC TAC TGG
CDR1 CDR2
S W I R Q P P G K G L E W L G Y I Y
AGC TGG ATC CCG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG CTT GGG TAT ATC TAT
CDR2
Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA
V D T S K N Q F S L K L R S V T T A
GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGG TCT GTG ACC ACT GCG
CDR3
D T A V Y Y C A R G D G D Y G G N C
GAC ACC GCC CTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GAT GGG GAC TAC GGT GGT AAC TGT
CDR3
F D Y W G Q G T L V T V S S
ITT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

【 図 5 B 】

抗 CD70 69A7 VK

V セグメント : L6
J セグメント : JK4

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR1
A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC
CDR2
Q Q K P G Q A P R L L I F D A S N R
CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TTT GAT GCA TCC AAC AGG
CDR2
A T G I P A R F S G S G S G T D F T
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT
CDR3
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA
CDR3
R S N W P L T F G G G T K V E I K
CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

【 図 6 A 】

抗 CD70 1F4 VH 領域

V セグメント : 3-23
D セグメント : 4-4
J セグメント : JH4b

1 B V Q L L E S G G G L V Q P G G S L
GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG
CDR 1
R L S C A A S G F T F S I Y A M S W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC ATC TAT GCC ATG AGC TGG
CDR 2
V R Q A P G K G L E W V S A I S D S
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG TGC TCA GCT AIT AGT GAT AGT
CDR 2
G G R T Y F A D S V R G R F T I S R
163 GGT GGT CGC ACA TAC TTC GCA GAC TCC GTG AGG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
D N S K N T L S L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
CDR 3
T A V Y Y C A K V D Y S N Y L F F D
271 ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAG GTC GAC TAC AGT AAC TAC CFA TTC TTT GAC
Y W G Q G T L V T V S S
325 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

【 図 6 B 】

抗 CD70 1F4 VK 領域

V セグメント : A27
J セグメント : JK2

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG AGG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR 1
A T L S C R A S Q S I S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG
CDR 2
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC
CDR 2
R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC
CDR 3
T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
CDR 3
Q Y G S S P Y T F G Q G T K L E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【 図 7 】

抗 CD70 2H5 および 10B4 V_H 領域

3-30.3 生精細胞系: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQ
 2H5 VH: -----I-----
 10B4 VH: -----CY-----

3-30.3 生精細胞系: A P C G L E W V A V I S Y D G S N K K Y A D S Y K G R E T I S R D N S K N T
 2H5 VH: -----I-----
 10B4 VH: -----

3-30.3 生精細胞系: L Y I O M N S L R A E D T A V Y Y C A R -----
 2H5 VH: -----D D G V D Y F D Y K G C G C T L
 10B4 VH: -----E G G V S M L-----

JH4b 生精細胞系: V T V Y S S (JH4b)
 2H5 VH: ----- (JH4b)
 10B4 VH: ----- (JH4b)

「」はこのクローンにおけるこの位置に残基が全く存在しないことを示す

【 図 8 】

抗 CD70 8B5 および 18E7 V_H 領域

3-23 生精細胞系: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQ
 8B5 VH: -----I-----
 18E7 VH: -----DH-----

3-23 生精細胞系: A P C G L E W V A V I W F D G S N T Y A D S V K G R F T I S R D N S K R F
 8B5 VH: -----
 18E7 VH: -----

3-23 生精細胞系: L Y I O M N S L R A E D T A V Y Y C A R -----
 JH4b 生精細胞系: M V R G
 8B5 VH: -----D S I-----
 18E7 VH: -----D Y W G C G C L V T V S S-----

【 図 9 】

抗 CD70 69A7 V_H 領域

4-61 生精細胞系: QVQLQESGGPGLVRFSECCLESLTCCVSSGSSYYS
 69A7 VH: -----D Y-----

4-61 生精細胞系: S W I R Q P P G K G L E N I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S
 69A7 VH: -----L-----

4-61 生精細胞系: V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R -----
 JH4b 生精細胞系: -----Y
 69A7 VH: -----R-----T-----G D G D Y G G N C-----

JH4b 生精細胞系: F D Y W G G G T L V T V S S
 69A7 VH: ----- (JH4b)

【 図 10 】

抗 CD70 1E4 V_H 領域

3-23 生精細胞系: E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R
 1E4 VH: -----

3-23 生精細胞系: L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R
 1E4 VH: -----I-----

3-23 生精細胞系: Q A P G K G L F W V S A I S G S G G S
 1E4 VH: -----D-----R-----

3-23 生精細胞系: T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K
 1E4 VH: -----F-----R-----

3-23 生精細胞系: N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
 1E4 VH: -----S-----

3-23 生精細胞系: C A K -----
 4-4 生精細胞系: . . . D Y S N Y
 JH4b 生精細胞系: F D Y W G G G T
 1E4 VH: -----V-----L F-----

JH4b 生精細胞系: L V T V S S
 1E4 VH: -----

【 図 11 】

抗 CD70 mAb1 2H5 V_K 領域

1.6 生精細胞系: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
 2H5 VK #1: -----

1.6 生精細胞系: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
 2H5 VK #1: -----

1.6 生精細胞系: T D P T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W
 JK4 生精細胞系: L T F G G G T
 2H5 VK #1: -----T-----P-----

JK4 生精細胞系: K V B I K
 2H5 VK #1: ----- (JK4)

【 1 2 】

抗 CD70 mAb13 10B4 VK 領域

L18 生細胞系 : A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S A L A
 10B4 VK: CDR1

L18 生細胞系 : W Y Q O K P C K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R P S C S G S G
 10B4 VK: CDR2

L18 生細胞系 : T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y C Q Q E N S Y P
 JK3 生細胞系: P T F P F P G T
 10B4 VK: CDR3

JK3 生細胞系 : K V D I K
 10B4 VK: (JK3)

【 1 3 】

抗 CD70 8B5 および 18E7 VK 領域

L15 生細胞系 : D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A
 8B5 VK: CDR1
 18E7 VK: - - - - -

L15 生細胞系 : W Y Q O K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R P S G S G S G
 8B5 VK: CDR2
 18E7 VK #1: - - - - -

L15 生細胞系 : T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y C Q Q Y N S Y P
 JK4 生細胞系: L T F G G G
 8B5 VK: - - - - -
 18E7 VK #1: - - - - -

JK4 生細胞系 : T K V E I K
 8B5 VK: - - - - - (JK4)
 18E7 VK #1: - - - - - (JK4)

【 1 4 】

抗 CD70 69A7 VK 領域

L6 生細胞系 : E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
 69A7 VK: CDR1

L6 生細胞系 : Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
 JK4 生細胞系: F - - - - -
 69A7 VK: CDR2

L6 生細胞系 : S C S G S G T D E F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N
 JK4 生細胞系: - - - - -
 69A7 VK: CDR3

L6 生細胞系 : W F
 JK4 生細胞系: L T F G G G T K V E I K
 69A7 VK: - - - - - (JK4)

【 1 5 】

抗 CD70 1F4 VK 領域

A27 生細胞系 : E I V L T Q S E P G T L S L S P G E R
 1F4 VK: - - - - -

A27 生細胞系 : A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
 1F4 VK: CDR1
 - - - - - I - - - - -

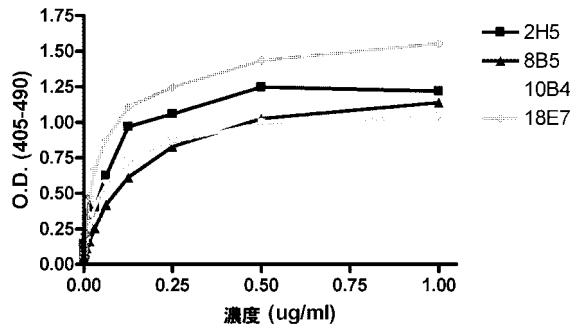
A27 生細胞系 : Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
 1F4 VK: CDR2
 - - - - - - - - - - - - - - - -

A27 生細胞系 : R A T G I P D R F S G S G S G T D F
 1F4 VK: - - - - -

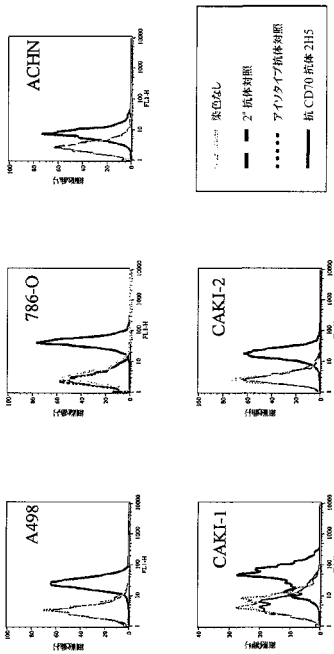
A27 生細胞系 : T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
 1F4 VK: - - - - -

A27 生細胞系 : Q Y G S S P
 JK2 生細胞系: Y T F G Q G T K L E I K
 1F4 VK: CDR3
 - - - - - - - - - - - - - - - -

【 1 6 】

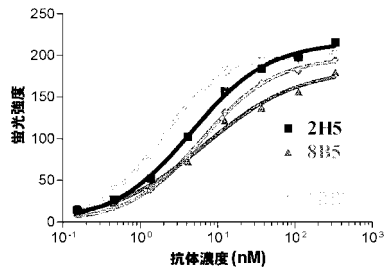


【 図 1 7 】



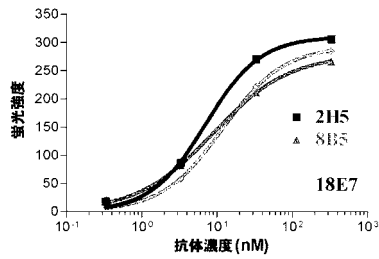
【 図 1 8 A 】

786-O FACS 力価判定



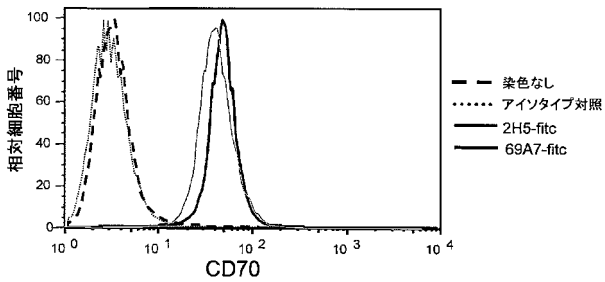
【 図 1 8 B 】

A498 FACS 力価判定

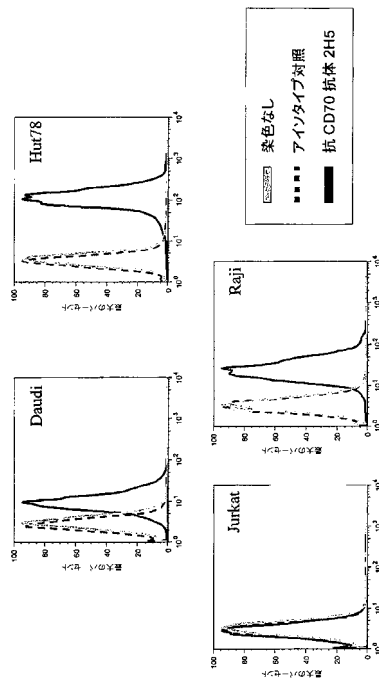


【 図 1 8 C 】

69A7 は CD70 + ヒト腎癌細胞系(786-O)に結合する

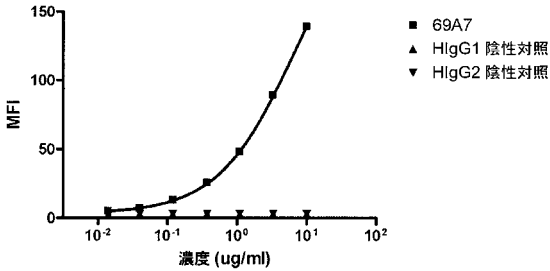


【 図 1 9 】



【 図 1 8 D 】

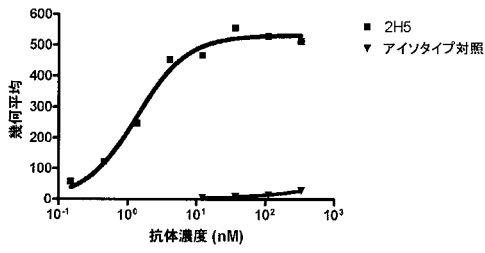
786-O 細胞上での 抗 CD70 抗体 69A7 の力価判定



EC50	69A7 2.1,1
	6.927

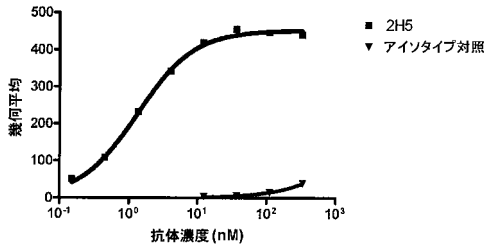
【 図 2 0 A 】

Raji 細胞に対する FACS



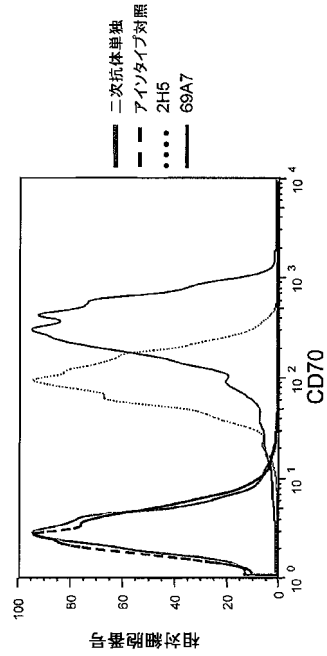
【 図 2 0 B 】

Granta-519 細胞に対する FACS



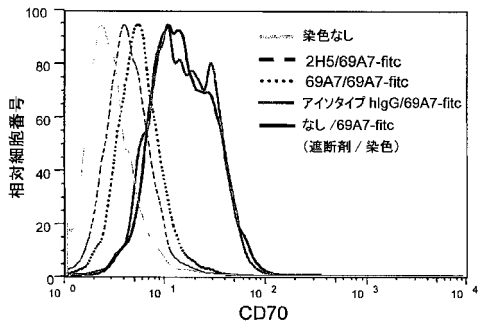
【 図 2 0 C 】

69A7 は CD70+ ヒト B リンパ腫細胞系 (Raji 細胞) に結合する



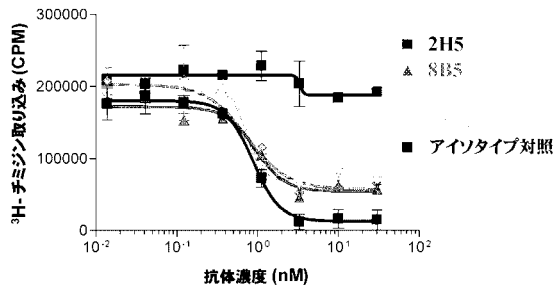
【 図 2 0 D 】

69A7 および 2H5 は Raji 細胞内で CD70 の類似エピトープと反応する



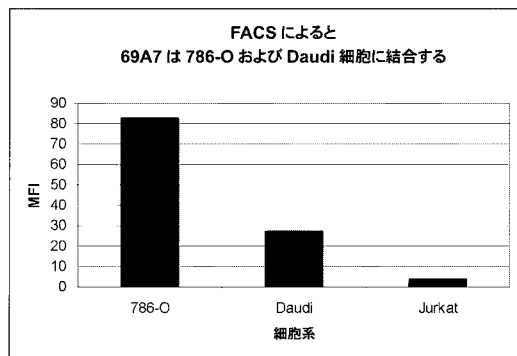
【 図 2 1 】

786-O 72 時間 HumZap アッセイ



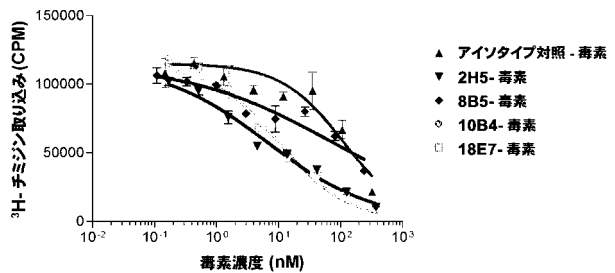
【 図 2 0 E 】

FACS によると 69A7 は 786-O および Daudi 細胞に結合する

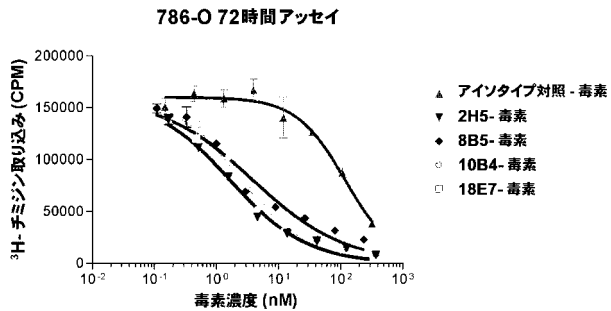


【 図 2 2 A 】

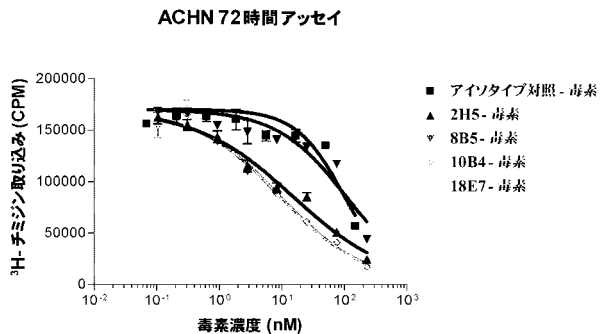
CAKI-2 72 時間アッセイ



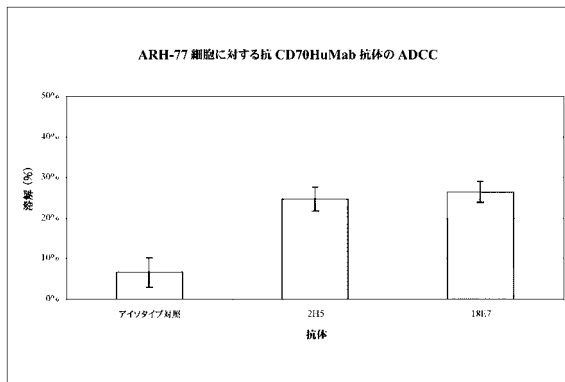
【 図 2 2 B 】



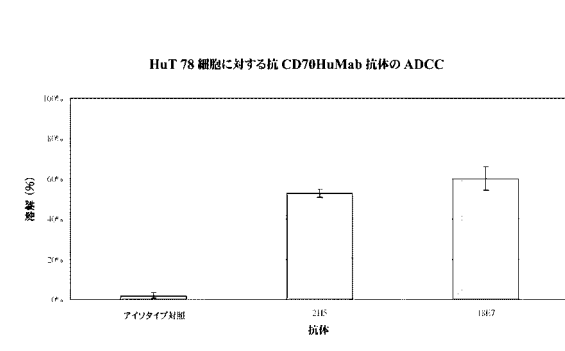
【 図 2 2 C 】



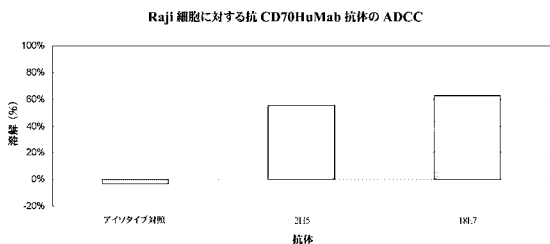
【 図 2 3 A 】



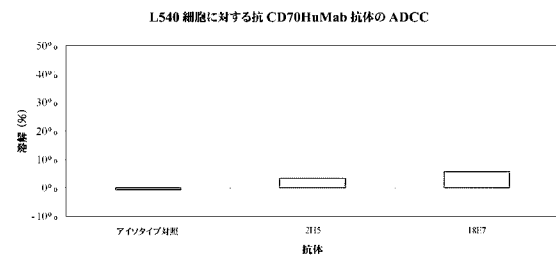
【 図 2 3 B 】



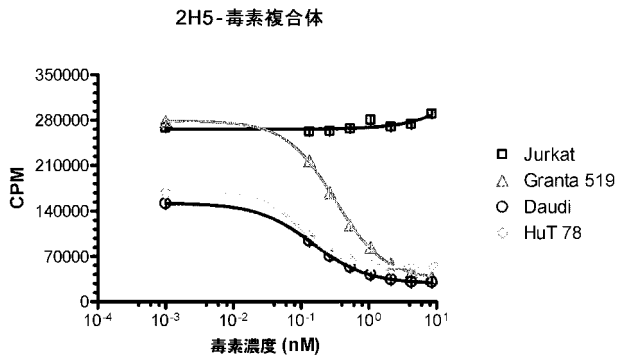
【 図 2 3 C 】



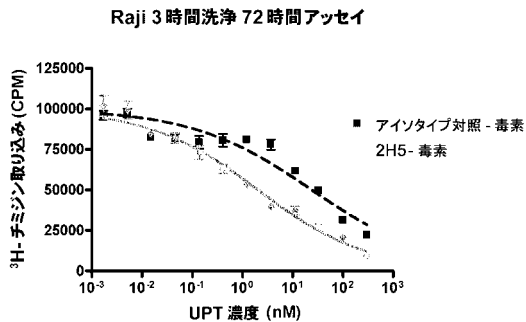
【 図 2 3 D 】



【 図 2 4 】

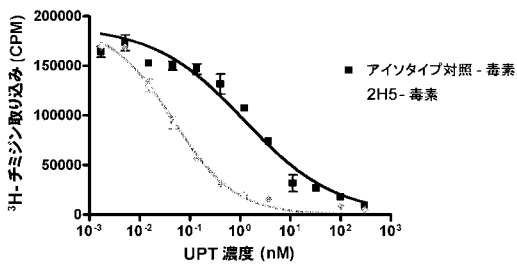


【 図 2 5 A 】



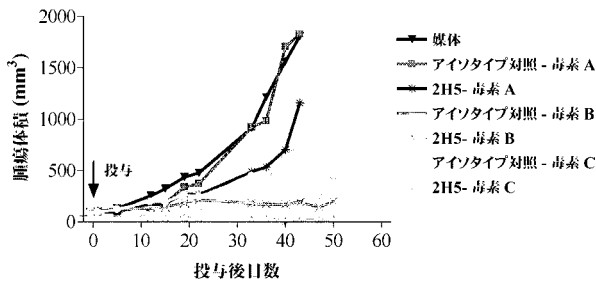
【 図 2 5 B 】

Raji 連続 72 時間アッセイ



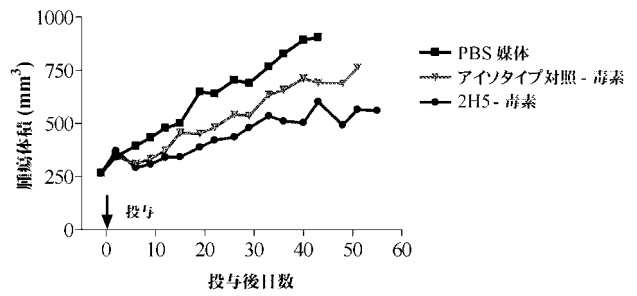
【 図 2 6 A 】

A498 腫瘍
(腫瘍体積中央値, 0.3μモルの毒素/kg)



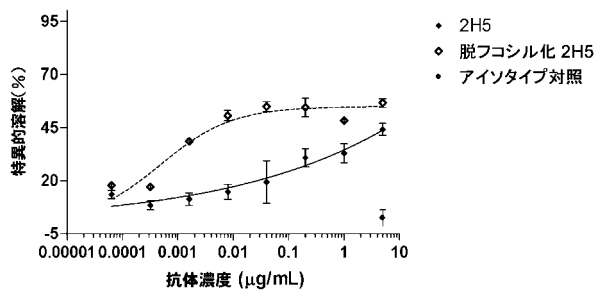
【 図 2 6 B 】

ACHN 腫瘍



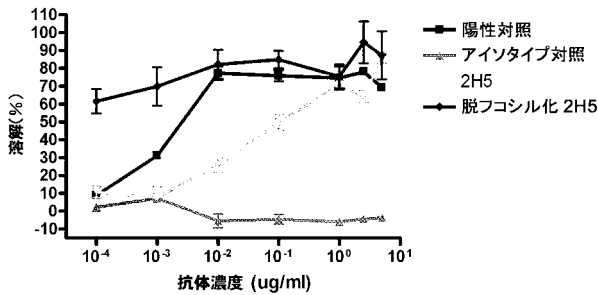
【 図 2 7 A 】

ARH77 細胞に対する ADCC



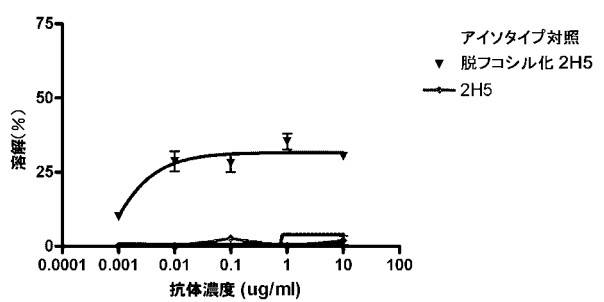
【 図 2 7 B 】

MEC-1 細胞に対する ADCC



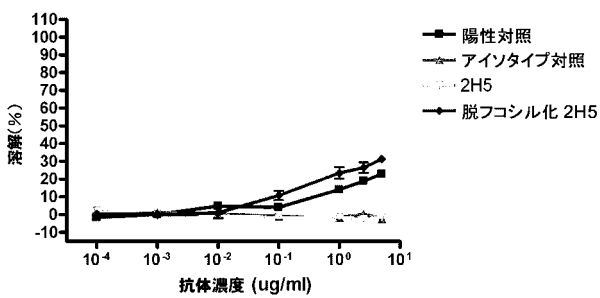
【 図 2 7 D 】

Su-DHL-6 細胞に対する ADCC



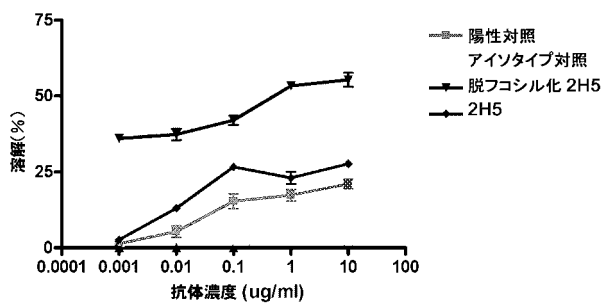
【 図 2 7 C 】

抗 CD16 での MEC-1 細胞に対する ADCC



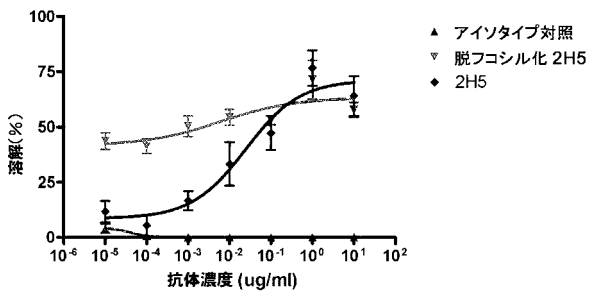
【 図 2 7 E 】

IM-9 細胞に対する ADCC



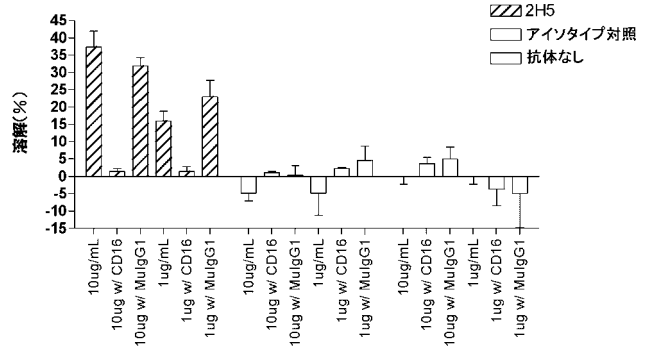
【 図 2 7 F 】

Hut78 細胞に対する ADCC



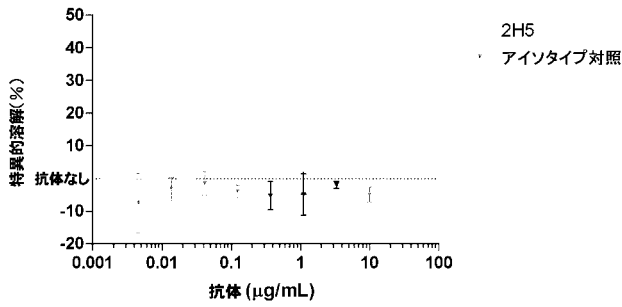
【 図 2 9 】

CD16 ブロックでの Raji 細胞に対する ADCC



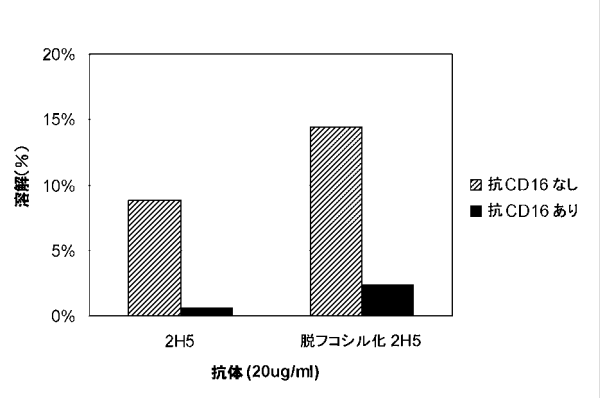
【 図 2 8 】

Raji 細胞に対する ADCC



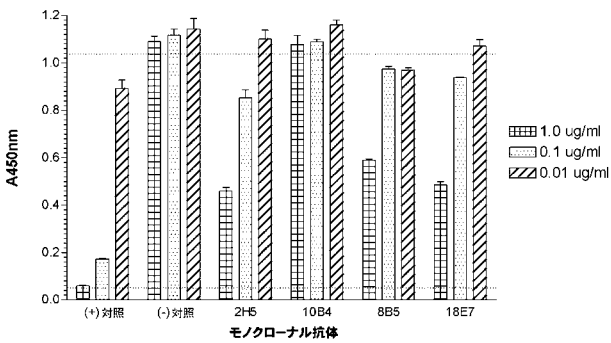
【 図 3 0 】

活性化 T 細胞に対する抗 CD70 抗体の ADCC



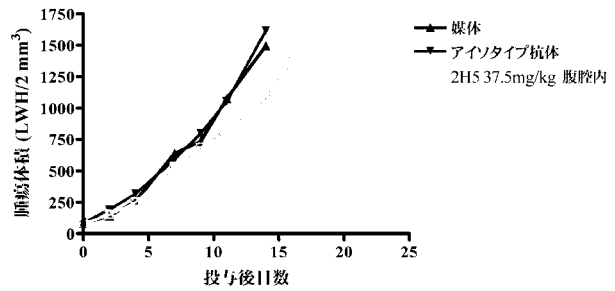
【 図 3 1 】

CD27-CD70 遮断アッセイ



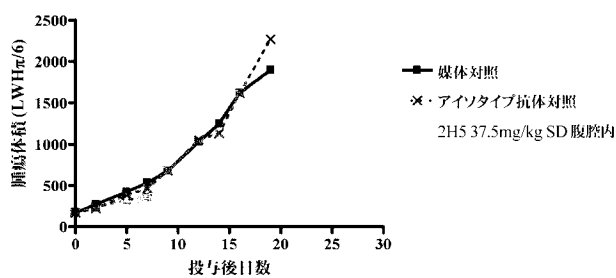
【 図 3 2 B 】

ARH77 腫瘍に対する裸抗体の単回投与の有効性



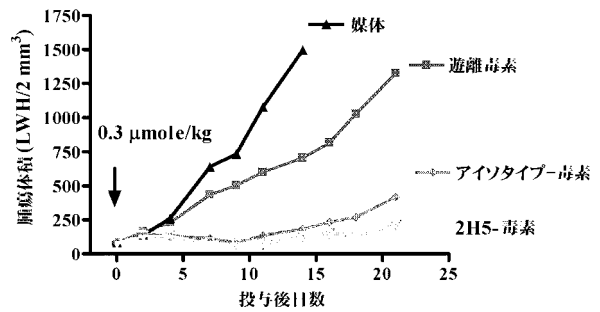
【 図 3 2 A 】

Raji モデル有効性試験



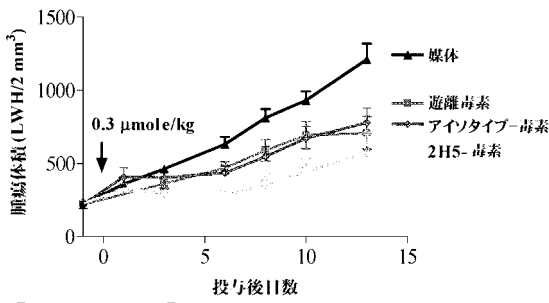
【 図 3 3 A 】

ARH77 の腫瘍成長中央値



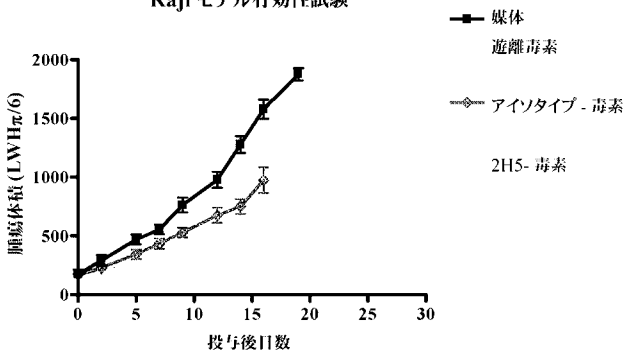
【 図 3 3 B 】

Granta519 腫瘍に対する
αCD70-毒素複合体の有効性



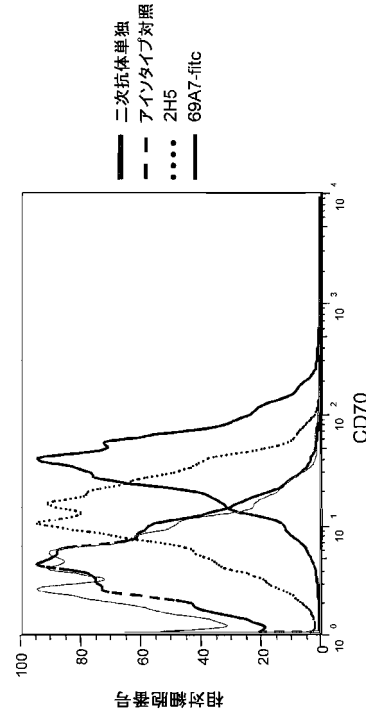
【 図 3 3 C 】

Raji モデル有効性試験



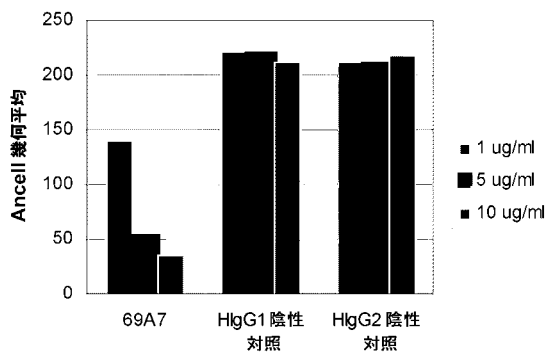
【 図 3 4 】

69A7 は CD70+アカカゲザルリンパ腫細胞系 (LCL) と交差反応する



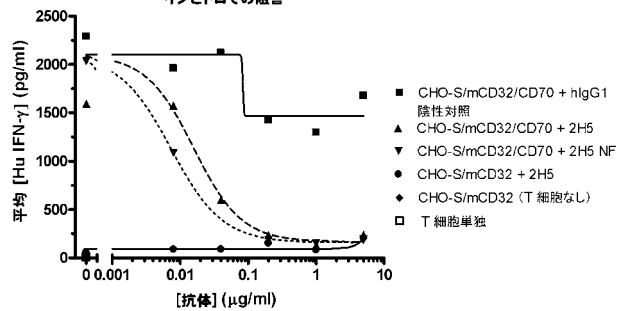
【 図 3 5 】

Ancell マウス抗 hCD70 786-O 細胞の遮断



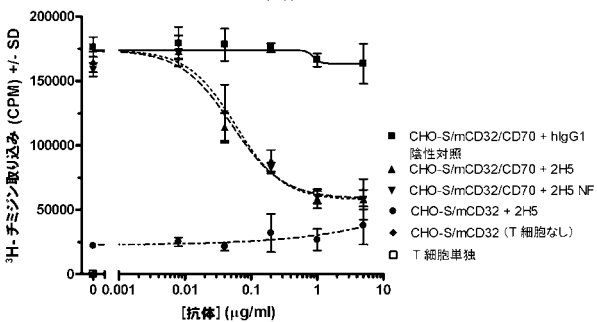
【 図 3 6 B 】

CD70 誘発性の T 細胞 INF-γ 分泌の
インビトロでの阻害



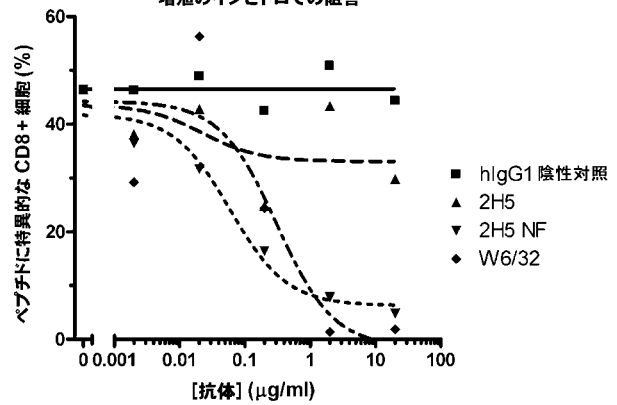
【 図 3 6 A 】

CD70 誘発性の T 細胞共刺激の
インビトロでの阻害

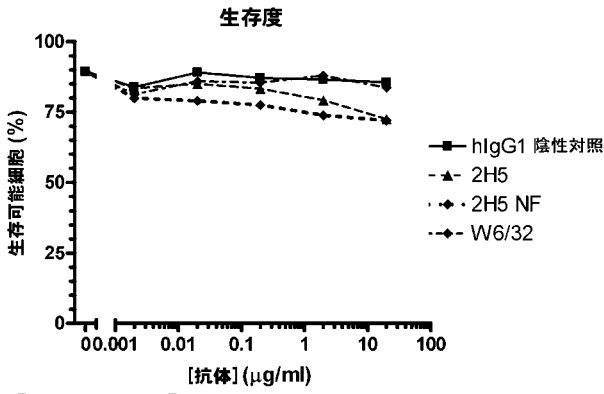


【 図 3 7 A 】

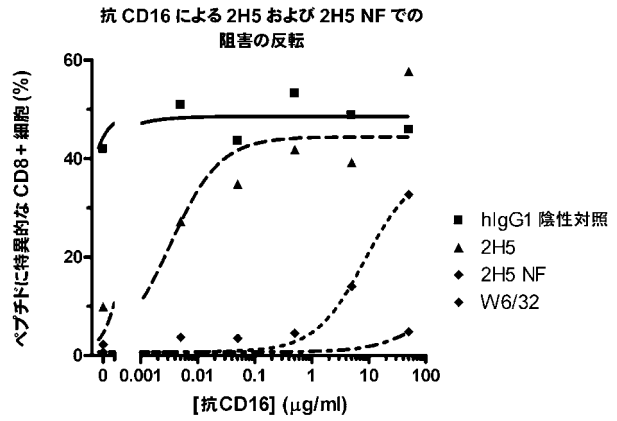
CMV ペプチドに特異的な CD8 T 細胞の
増殖のインビトロでの阻害



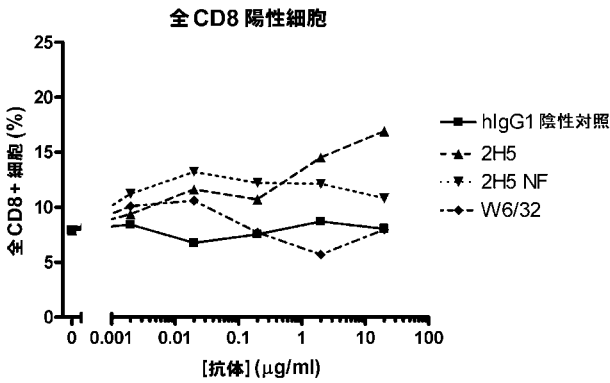
【 図 3 7 B 】



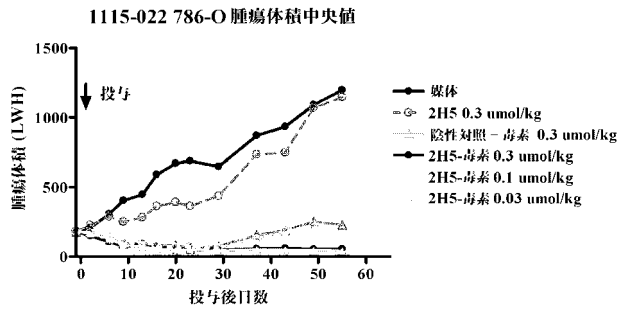
【 図 3 8 】



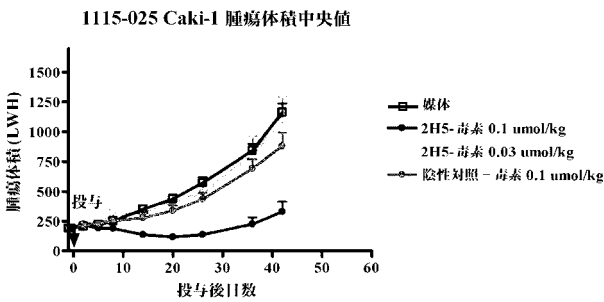
【 図 3 7 C 】



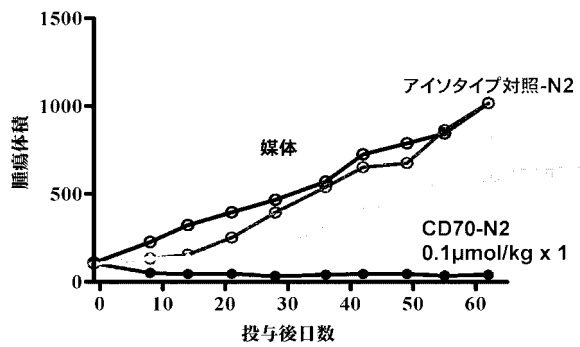
【 図 3 9 A 】



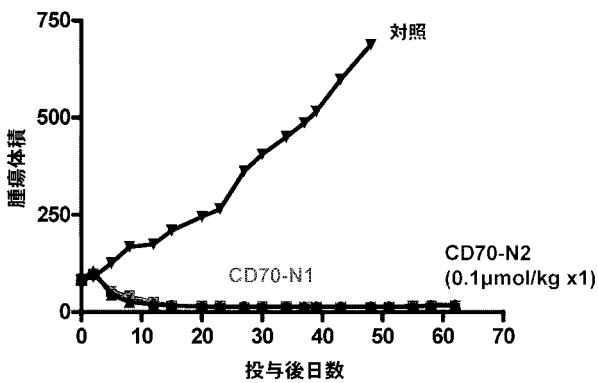
【 図 3 9 B 】



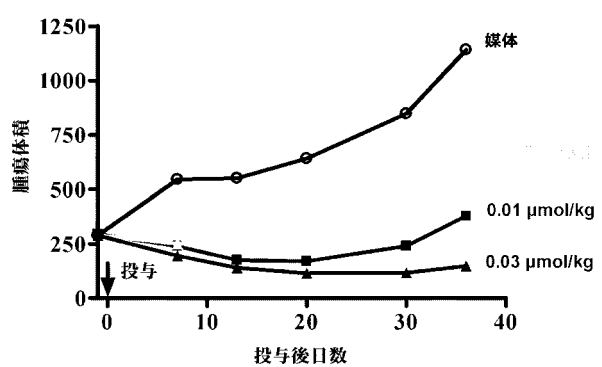
【 図 4 1 】



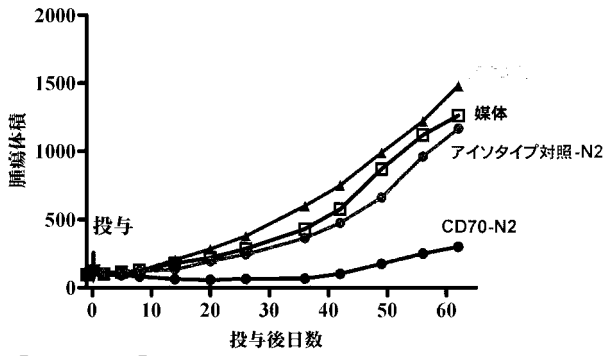
【 図 4 0 】



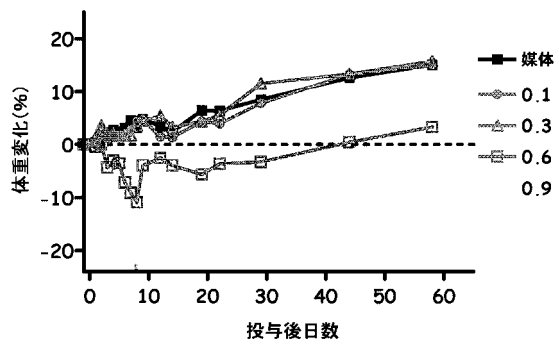
【 図 4 2 】



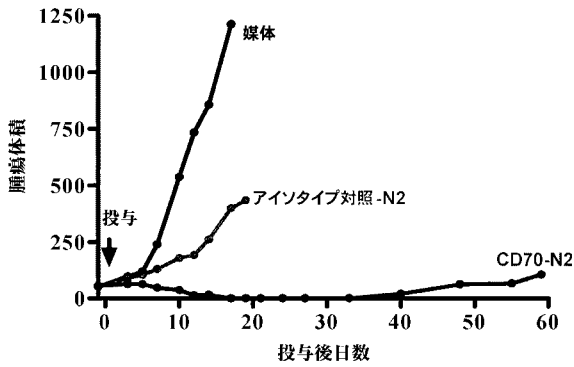
【 図 4 3 】



【 図 4 5 】

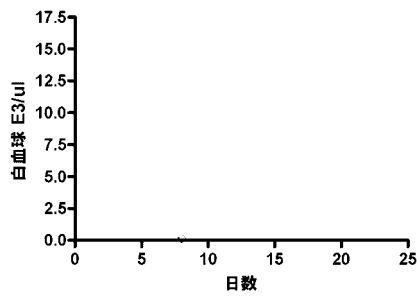


【 図 4 4 】



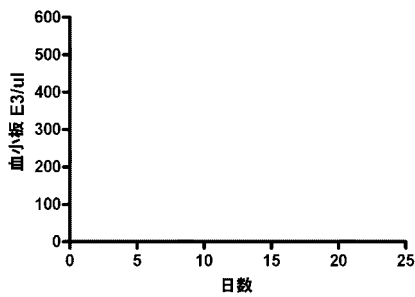
【 図 4 6 A 】

白血球数 - 遊離薬剤



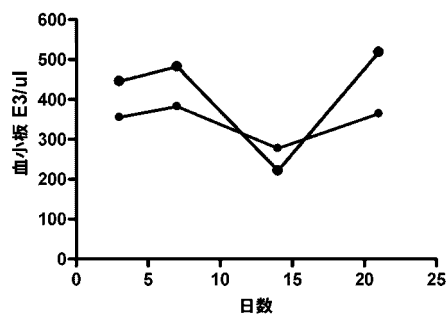
【 図 4 6 B 】

血小板 - 遊離薬剤



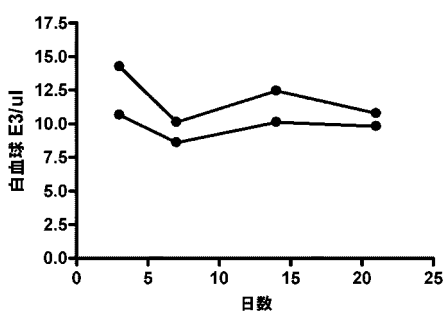
【 図 4 6 D 】

血小板 - 複合体

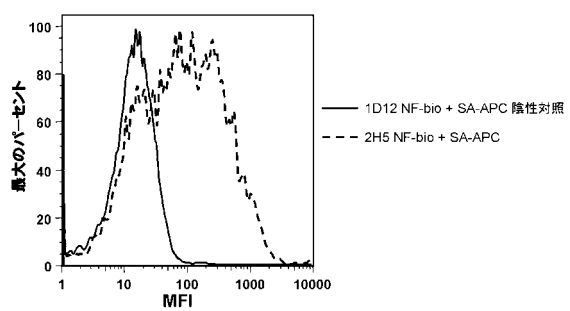


【 図 4 6 C 】

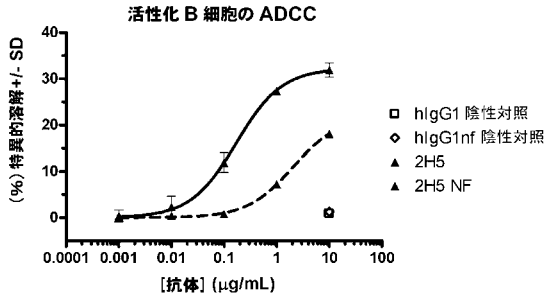
白血球数 - 複合体



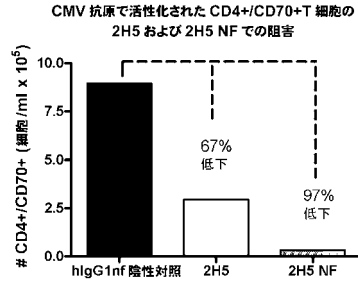
【 図 4 7 A 】



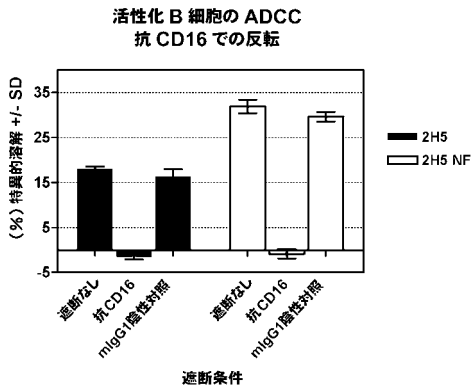
【 図 4 7 B 】



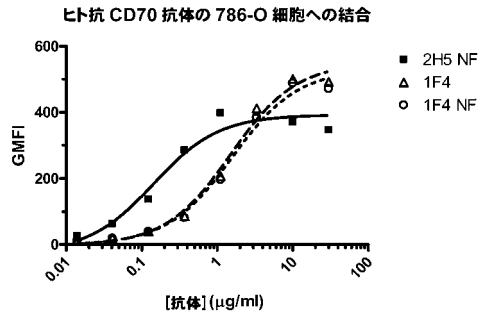
【 図 4 8 】



【 図 4 7 C 】

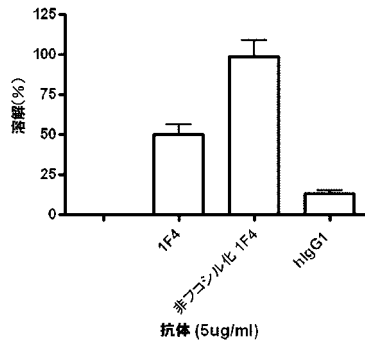


【 図 4 9 】

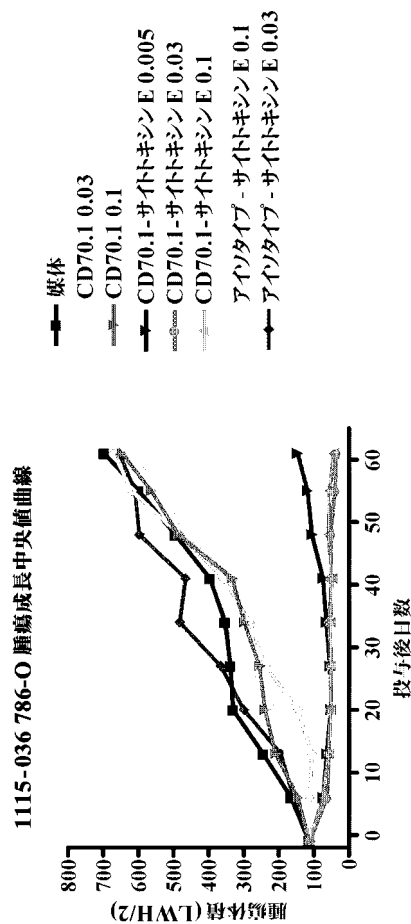


【 図 5 0 】

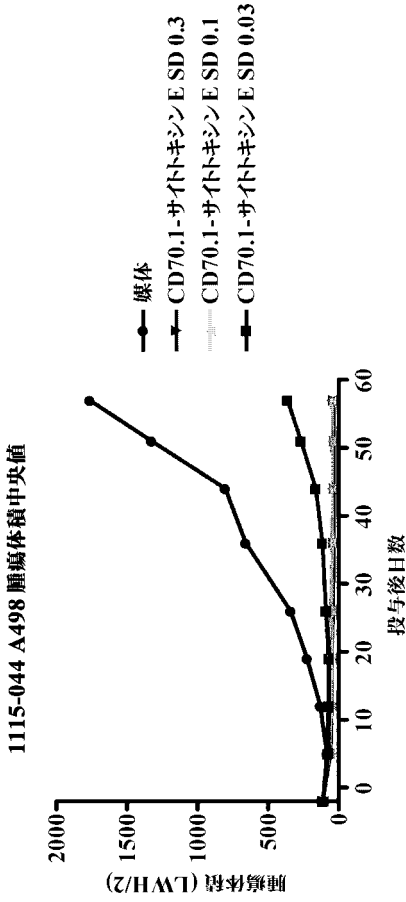
ARH-77 細胞に対する抗 CD70 HuMAb 1F4 の ADCC



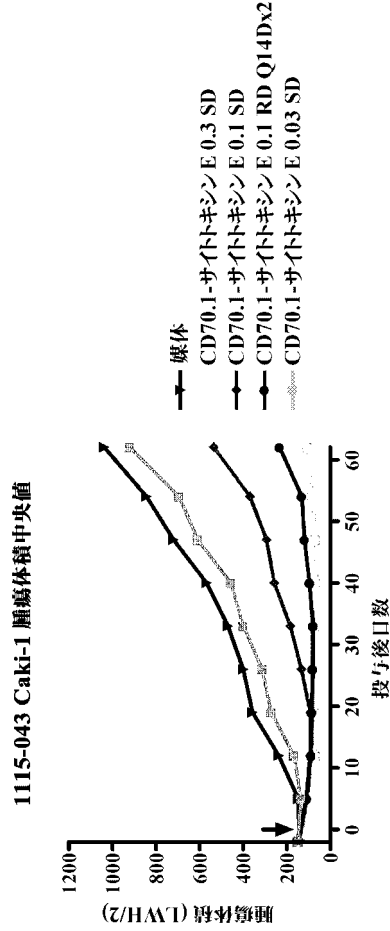
【 図 5 1 】



【 図 5 2 】



【 図 5 3 】



【 図 5 4 】

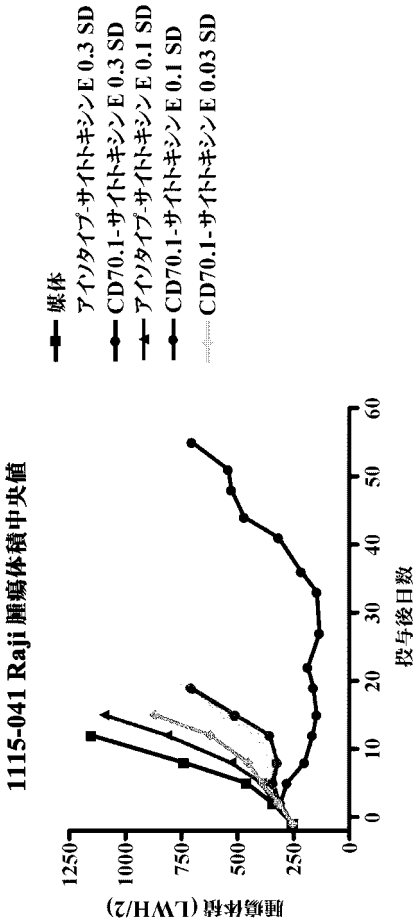
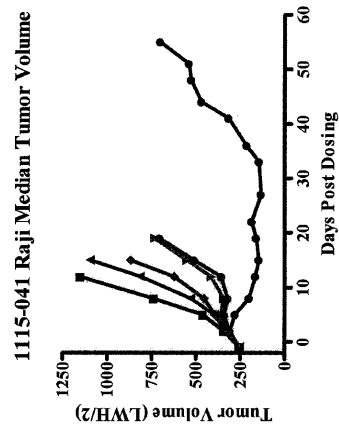
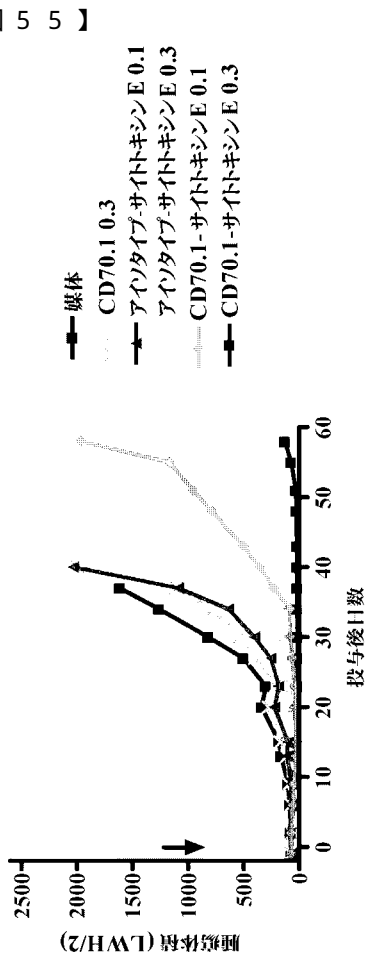


Figure 54

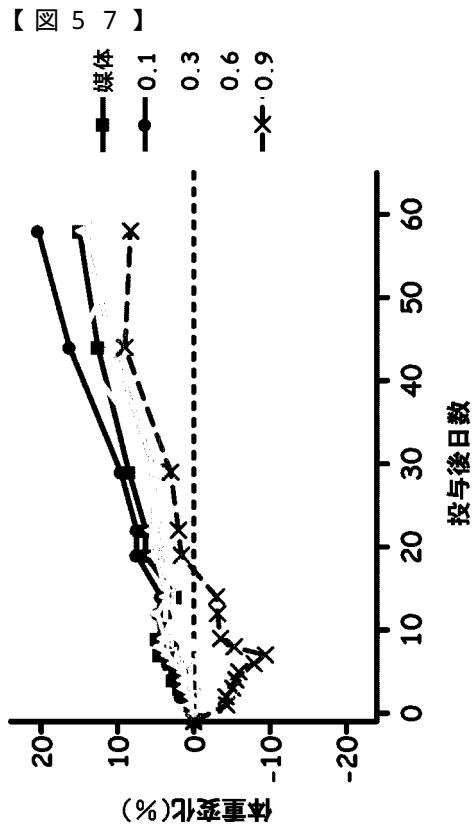


Carol Soderberg, Jerry Jiang, Orville Cortez and Chin Pan

1335-005 Daudi 腫瘍体積中央値

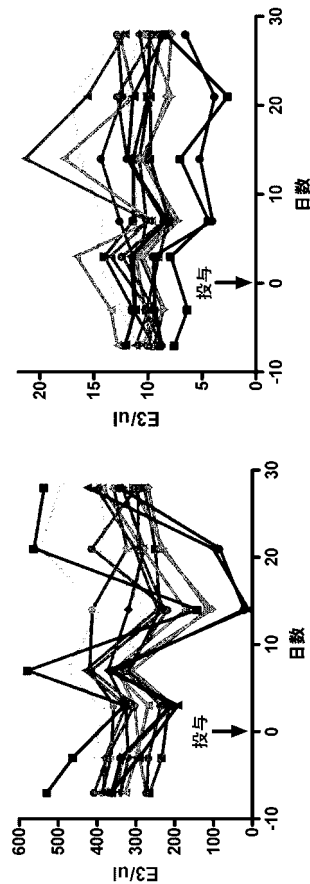


【図 5 5】

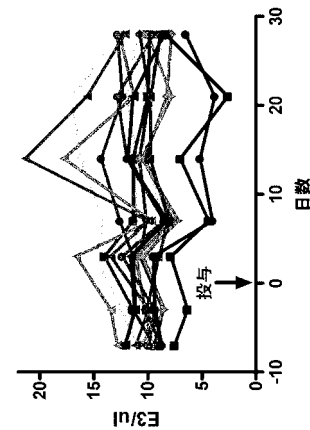


【図 5 7】

血小板

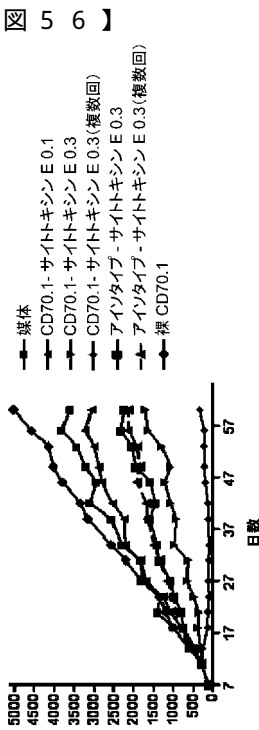


白血球



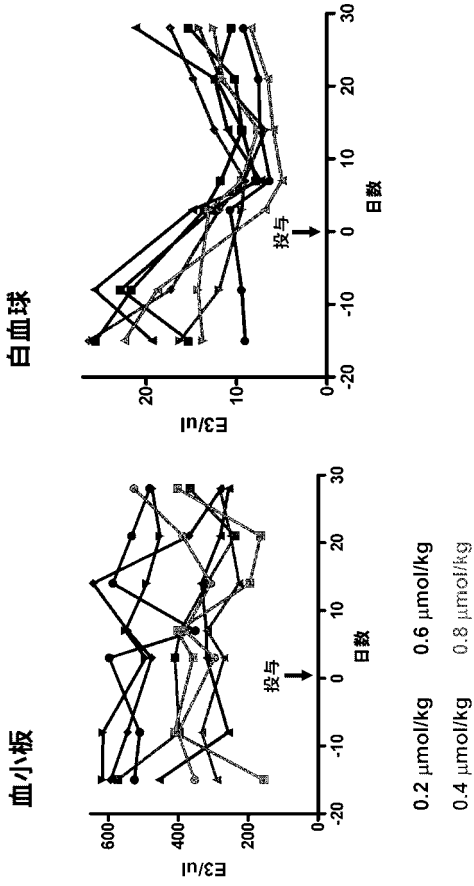
【図 5 8】

マドラット Caki-1

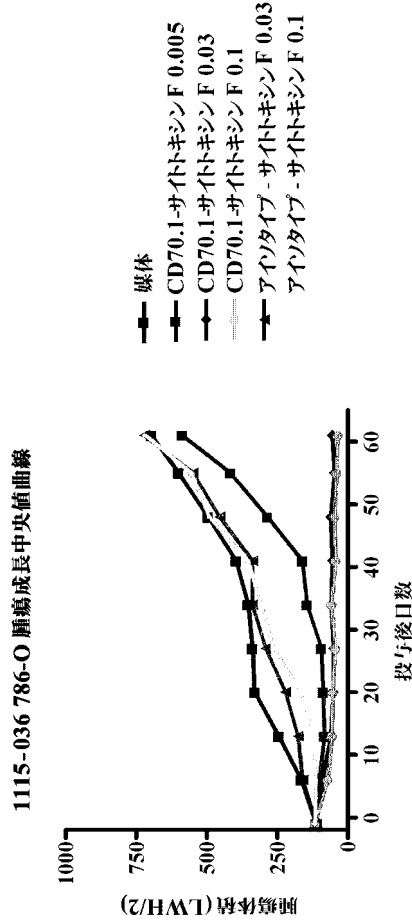


【図 5 6】

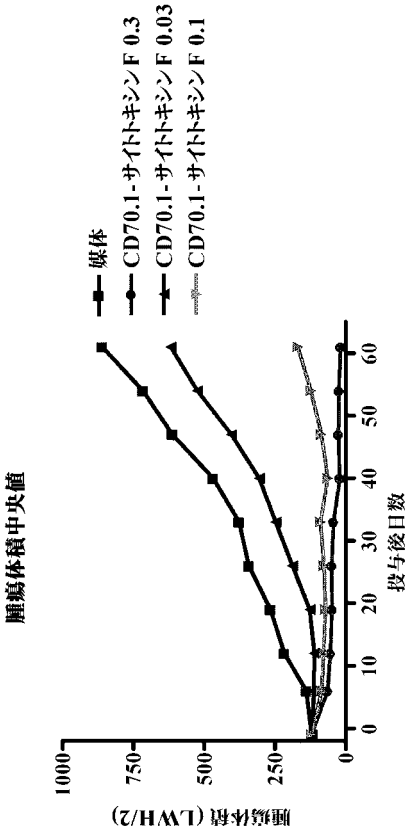
【 図 5 9 】



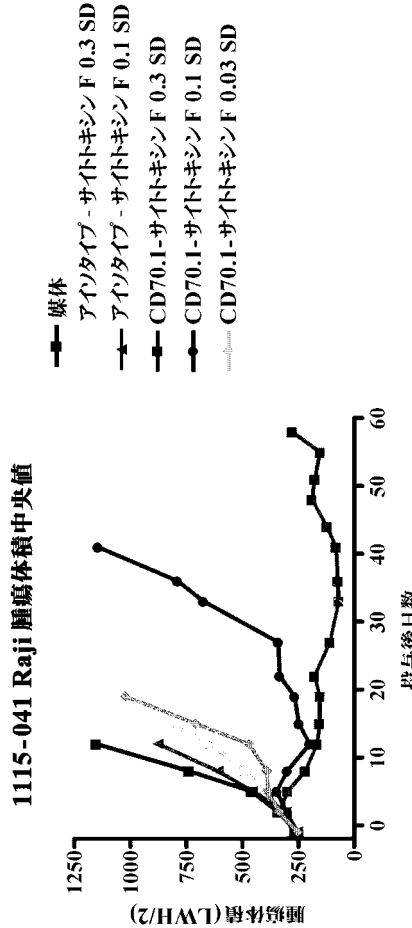
【 図 6 0 】



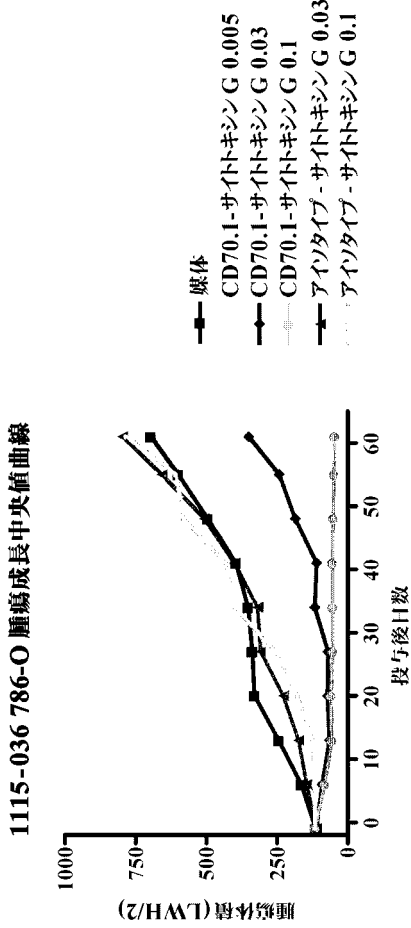
【 図 6 1 】



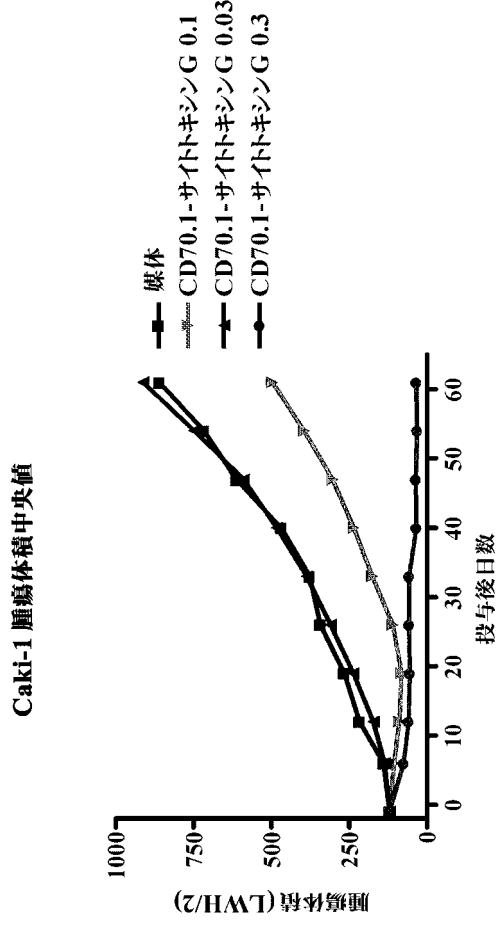
【 図 9 2 】



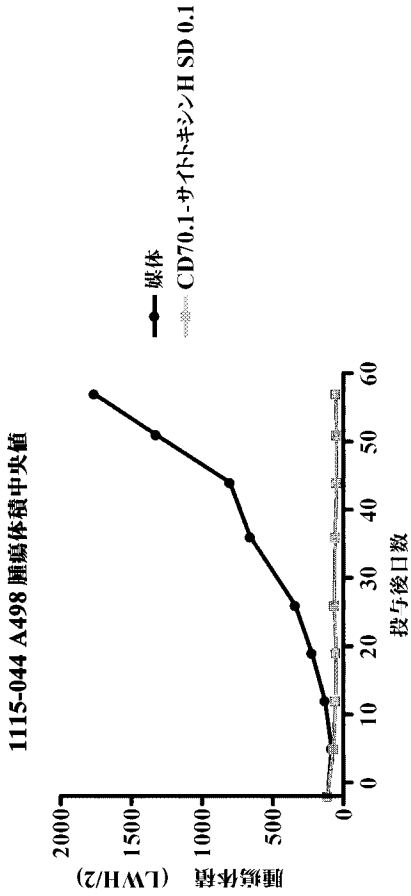
【 図 6 3 】



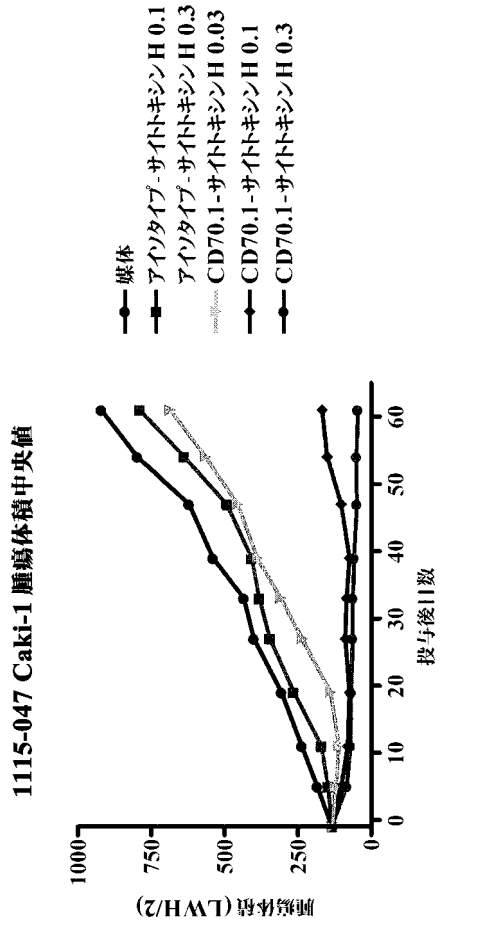
【 図 6 4 】



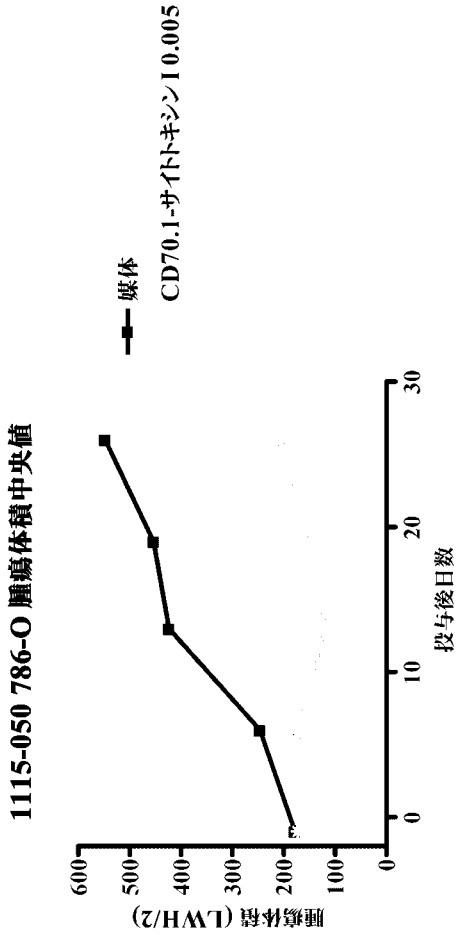
【 図 5 9 】



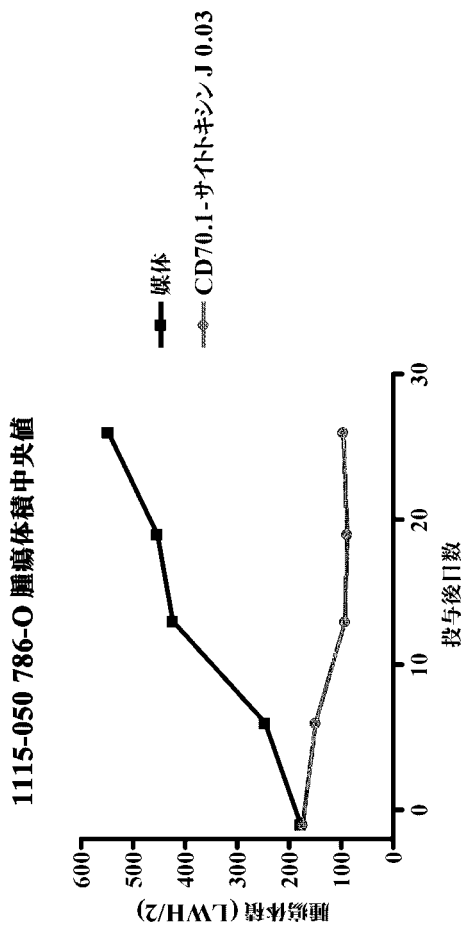
【 図 9 9 】



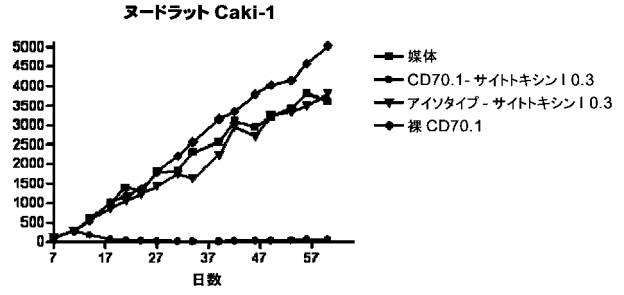
【 図 6 7 】



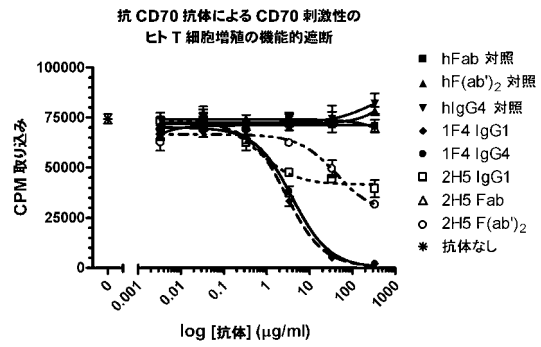
【 図 6 9 】



【 図 6 8 】

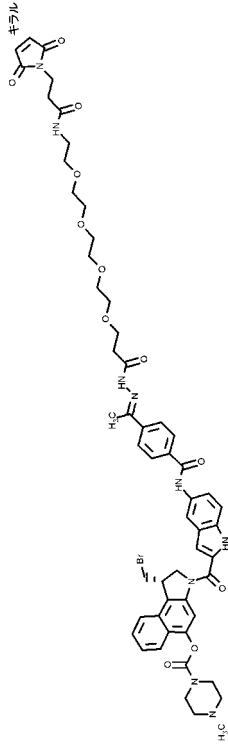


【 図 7 0 】



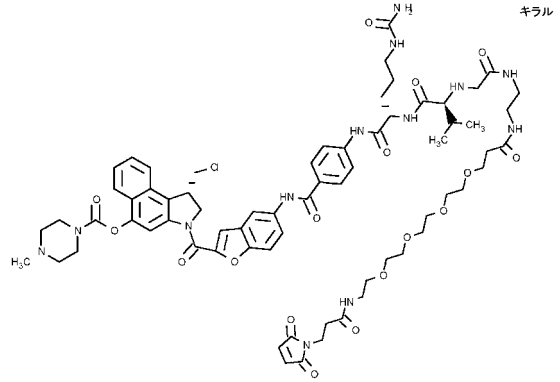
サイトキシン B

【 図 7 1 】



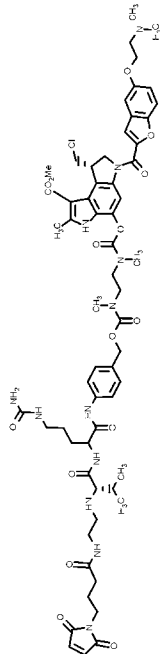
サイトキシン C

【 図 7 2 】



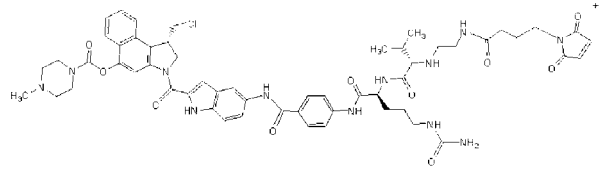
サイトキシン D

【 図 7 3 】



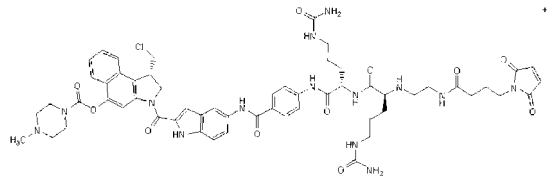
サイトキシン E

【 図 7 4 】



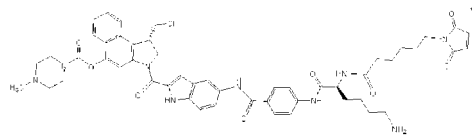
サイトキシン F

【 図 7 5 】



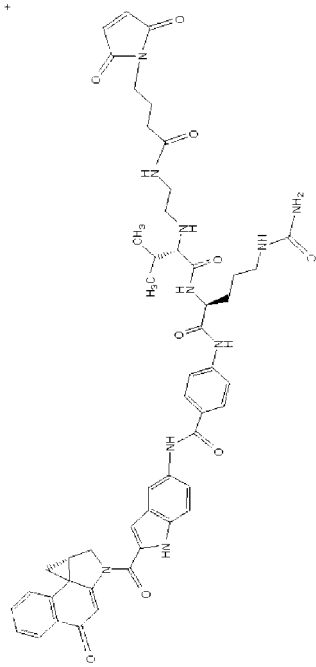
サイトキシン G

【 図 7 6 】



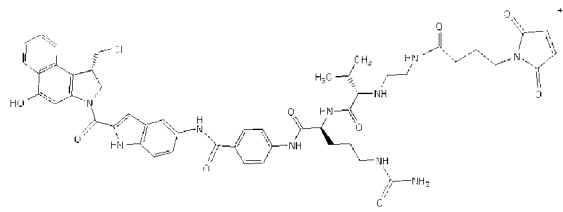
【 図 7 7 】

サイトキシン H



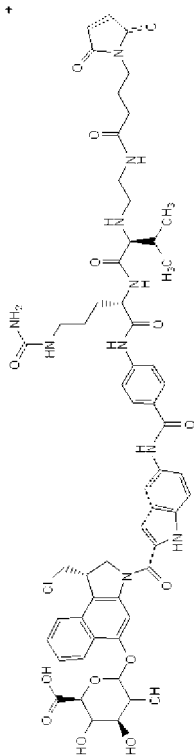
【 図 7 8 】

サイトキシン I



【 図 7 9 】

サイトキシン J



【配列表】

2010513306000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/87401
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12P 21/08(2006.01) USPC: 530/387.3 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) U.S. : 530/387.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2007/038637 A2 (Terrett et al) 5 April 2007 (5.04.2007) see SEQ ID NO:1 and 6	1-11, 18-21, 28, 29, 36-41 and 51-56
X	US 20060083736 A1 (Law et al) 20 April 2006 (20.04.2006) see entire document, e.g., pages 1-2, 4 and 8	1-10, 18-20, 36-41, 51-56
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 17 August 2008 (17.08.2008)		Date of mailing of the international search report 07 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer <i>Kevin W.</i> /Stephen L. Rawlings/ for BRADLEY DUFFY Telephone No. (571)272-0700

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/87401

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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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: Please See Continuation Sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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.: 1-11,18-21,28,29,36-41 and 51-56
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/87401**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claims 1-11, 18-21, 28, 29, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 13; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:25; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:31; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:37; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:43, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group II, claims 1-10, 12, 18-20, 22, 28, 30, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 14; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 20; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:26; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:32; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:38; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:44, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group III, claims 1-10, 13, 18-20, 23, 28, 31, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 15; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 21; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:27; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:33; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:39; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:45, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group IV, claims 1-10, 14, 18-20, 24, 28, 32, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 16; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 22; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:28; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:34; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:40; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:46, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group V, claims 1-10, 15, 18-20, 25, 28, 33, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 17; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 23; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:29; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:35; (e) a light chain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/87401

variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:41; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:47, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group VI, claims 1-10, 16, 18-20, 26, 28, 34, 36-41 and 51-56, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 17; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 23; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:75; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:35; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:41; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:47, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Group VII, claims 1-10, 17, 18-20, 27, 28, 35-41 and 51-60, insofar as the claims are drawn to an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:30; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:36; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:42; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:48, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof and an isolated human monoclonal antibody that comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:30; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:36; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:42; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:48.

Group VIII, claims 43-44, insofar as the claims are drawn to a method of inhibiting growth of a renal tumor cell expressing CD70 comprising contacting said renal tumor cell with the antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that growth of said renal tumor cell is inhibited.

Group IX, claims 42-44, insofar as the claims are drawn to a method of inhibiting growth of a lymphoma tumor cell expressing CD70 comprising contacting said lymphoma tumor cell with the antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that growth of said lymphoma tumor cell is inhibited.

Group X, claims 45-47, insofar as the claims are drawn to a method of treating renal cell carcinoma in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that said renal cell carcinoma is treated in the subject.

Group XI, claims 45-47, insofar as the claims are drawn to a method of treating lymphoma in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that said lymphoma is treated in the subject.

Group XII, claim 48, insofar as the claim is drawn to a method of treating an autoimmune disease in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that said autoimmune disease is treated in the subject.

Group XIII, claim 48, insofar as the claim is drawn to a method of preventing an autoimmune disease in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that said autoimmune disease is prevented in the subject.

Group XIV, claim 49, insofar as the claim is drawn to a method of treating inflammation in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that the inflammation is treated in the subject.

Group XV, claim 49, insofar as the claim is drawn to a method of preventing inflammation in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that the inflammation is prevented in the subject.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/87401

Group XVI, claim 50, insofar as the claim is drawn to a method of treating a viral infection in a subject comprising administering to the subject an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent such that the viral infection is treated in the subject.

Group XVII, claims 61-63, insofar as the claims drawn to isolated nucleic acid molecule encoding a monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising: a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, or expression vectors or host cells comprising said nucleic acid.

1. This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I-XVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

In this case, the special technical feature presented in claim 1 is an antibody-partner molecule conjugate comprising an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent. However, US 2006/0083736 A1 (Law et al., April 2006) teach such human antibodies which specifically bind to human CD70 conjugated to therapeutic agents; see entire document (e.g., paragraphs [0002]-[0018]). Accordingly, the technical feature recited in claim 1, does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.1, as it does not define a contribution over the prior art.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group I is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 13; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 19; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:25; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:31; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:37; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:43, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group II is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 14; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 20; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:26; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:32; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:38; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:44, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group III, is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 15; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 21; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:27; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:33; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:39; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:45, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group IV, is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 16; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 22; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:28; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:34; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:40; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:46, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group V is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 17; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 23; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:29; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:35; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:41; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:47, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VI is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 17; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 23; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:25; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:35; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/87401

NO:41; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:47, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VII is making an isolated human monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody binds human CD70 and comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:30; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:36; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:42; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:48, and a partner molecule, wherein the partner molecule is a therapeutic agent, or compositions thereof or making an isolated human monoclonal antibody that comprises (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 18; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:30; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO:36; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO:42; (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO:48.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VIII is inhibiting the growth of a renal tumor cell expressing CD70.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group IX is inhibiting the growth of a lymphoma tumor cell expressing CD70.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group X is treating renal cell carcinoma in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XI is treating lymphoma in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XII is treating an autoimmune disease in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XIII is preventing an autoimmune disease in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XIV is treating inflammation in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XV is preventing inflammation in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XVI is treating a viral infection in a subject.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XVII is making an isolated nucleic acid molecule encoding a monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising: a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, or expression vectors or host cells comprising said nucleic acid.

Accordingly, the inventions of Groups I- XVII do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST (PGPB, USPT, USOC, JPAB, EPAB, DWPI) and MEDLINE search terms CD70, humanized antibody
Sequence search of SEQ ID NO:13, 19, 25, 31, 37 and 43

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 コキア マルコ エー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スコッツ バレー ビーン クリーク ロード 3 5 0 5

(72)発明者 テレット ジョナソン エー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アルトス アリーシャ ウェイ 2 0 0

(72)発明者 キング デビッド ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ベルモント テラス ドライブ 1 7 4 4

(72)発明者 パン チン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アルトス ヘリテッジ コート 1 2 3 5

(72)発明者 カーダレリー ジョセフィーヌ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン カルロス レズリー ドライブ 1 2 6

(72)発明者 ヤマナカ マーク

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 プリーザントン アモロソ コート 2 9 5 3

(72)発明者 ヘニング カーラ アン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミルピタス カーティス アベニュー 1 3 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA45 BA54 CA02 DA02 EA04

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05

4B065 AA90X AB01 AB05 AC14 AC15 BA02 BA03 BA08 CA25 CA44

4C076 AA95 CC04 CC07 CC27 CC35 CC41 EE59 FF67 FF68

4H045 AA11 BA09 BA71 BA72 CA42 DA76 EA29 FA74

【要約の続き】

抗CD70 2H5 VH 領域

V セグメント : 3-30.3
 D セグメント : 未決定
 J セグメント : JH4b

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
 1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A S G F T F S S Y I M H W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTT ACC TTC AGT AGC TAT ATT ATG CAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

CDR2

G R N K Y Y A D S V K G R F T I S R
 163 GGA AGA AAC AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D T D G Y D F D Y W
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACG GAT GGC TAC GAT TTT GAC TAC TGG

└─→ JH4b

G Q G T L V T V S S
 325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA