

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-531031

(P2009-531031A)

(43) 公表日 平成21年9月3日(2009.9.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>C07K 16/30 (2006.01)</b>	C07K 16/30	4B065
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4C084
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4C085
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-501604 (P2009-501604)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月22日 (2007.3.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月20日 (2008.11.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/007382  
 (87) 国際公開番号 W02007/109376  
 (87) 国際公開日 平成19年9月27日 (2007.9.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/785,704  
 (32) 優先日 平成18年3月23日 (2006.3.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991  
 ノバルティス アーゲー  
 スイス国 ツェーハー 4002 バーゼル,  
 リヒトシュトラッセ 35  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-腫瘍細胞抗原抗体療法

## (57) 【要約】

腫瘍細胞抗原に結合する抗体または抗体断片を投与することによって、癌を診断し、検出し、または治療する方法であり、該癌は正常な隣接組織に対して上昇した腫瘍細胞抗原を発現する。該方法は、腫瘍細胞抗原 K I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F U 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、および S L C 1 A 5 に結合する抗体の使用を含む。さらなる局面において、本発明は、腫瘍細胞抗原を候補分子と接触させ、該腫瘍細胞抗原によって媒介され、あるいは該候補分子および該腫瘍細胞抗原の相互作用によって媒介される生物学的効果をモニターすることを含む、腫瘍細胞抗原に対するアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物において、正常な隣接組織試料またはプールされた正常な組織試料に対して少なくとも3倍上昇される腫瘍細胞抗原を発現する癌を診断し、検出し、または治療する方法であって、治療上有効量の該腫瘍細胞抗原に結合する抗体またはその断片を該哺乳動物に投与することを含み、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G R P 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される、方法。

## 【請求項 2】

前記抗体がヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片である、請求項 1 記載の抗体またはその断片。 10

## 【請求項 3】

前記断片がF v、F ( a b ' ) 2、F a b ' およびF a b からなる群より選択される請求項 1 記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 4】

前記抗体またはその断片が、前記腫瘍細胞抗原の細胞外ドメインに特異的に結合し、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 5】

前記抗体がK I A A 1 8 1 5の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインはおよそ位置1 ~ 408、およそ位置474 ~ 489、およそ位置545 ~ 581、およそ位置603 ~ 621、およそ位置642 ~ 653、およびおよそ位置674 ~ 904のアミノ酸の群から選択される請求項 4 記載の抗体またはその断片。 20

## 【請求項 6】

前記抗体がB C 0 1 7 8 8 1の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインは、およそ位置1 ~ 117、約140 ~ 148、約165 ~ 211、および約230 ~ 240のアミノ酸の群から選択される請求項 4 記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 7】

前記抗体がF L J 2 0 4 2 1の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインがおよそアミノ酸位置30 ~ 359である、請求項 4 記載の抗体またはその断片。 30

## 【請求項 8】

前記抗体がD S C D 7 5の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインはおよそアミノ酸位置20 ~ 208である、請求項 4 記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 9】

前記抗体がG P R 1 6 0の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインはおよそ位置1 ~ 15、およそ位置80 ~ 93、およそ位置157 ~ 182、およびおよそ位置263 ~ 276のアミノ酸の群から選択される、請求項 4 記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 10】

前記抗体がG P C R 4 1の細胞外ドメインに結合し、ここに、該細胞外ドメインがおよそ位置31 ~ 49、およそ位置104 ~ 112、およそ位置134 ~ 145、およそ位置170 ~ 195、およそ位置212 ~ 270、およそ位置299 ~ 307、およそ位置360 ~ 368、およそ位置390 ~ 403、およびおよそ位置427 ~ 445のアミノ酸の群から選択される、請求項 4 記載の抗体またはその断片。 40

## 【請求項 11】

前記抗体またはその断片が免疫結合体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法。

## 【請求項 12】

抗 - 腫瘍細胞抗原抗体またはその断片、または抗 - 腫瘍細胞抗原抗体融合蛋白質またはその断片を含む抗体を含み、ここに、該抗体の成分は少なくとも1つの診断 / 検出剤、ま 50

たは少なくとも1つの治療剤に結合する、請求項11記載の診断、検出または治療免疫結合体。

【請求項13】

前記診断/検出剤が少なくとも1つの光活性診断/検出剤を含み、ここに、該光活性診断剤が色素原(chromagen)または色素を含む、請求項12記載の診断/検出免疫結合体。

【請求項14】

前記免疫結合体が手術中、内視鏡、または血管内腫瘍検出/診断で用いられる、請求項12記載の診断/検出免疫結合体。

【請求項15】

前記治療剤が放射性核種、ホウ素、ガドリニウムまたはウラン原子、免疫モジュレーター、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、光活性治療剤、細胞傷害性薬物、トキシン、脈管形成阻害剤、異なる抗体、およびその組合せからなる群より選択される請求項12記載の治療免疫結合体。

【請求項16】

前記細胞傷害性薬物が薬物、プロドラッグ、酵素またはトキシンである請求項15記載の治療免疫結合体。

【請求項17】

前記細胞傷害性薬物がカリケアミシンまたはカリケアミシンアナログ、メイタンシンまたはメイタンシン誘導体、またはオーリスタチンEまたはオーリスタチンE誘導体である請求項15記載の治療免疫結合体。

【請求項18】

前記細胞傷害性薬物がトキシンまたはその断片であり、ここに、該トキシンが植物、微生物および動物トキシン、およびその合成変形物からなる群より選択される請求項15記載の治療免疫結合体。

【請求項19】

前記免疫モジュレーターがサイトカイン、幹細胞成長因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン(IFN)、幹細胞成長因子、エリスロポエチン、トロンプオエチン、抗体およびその組合せからなる群より選択される請求項15記載の治療免疫結合体。

【請求項20】

前記酵素がプロドラッグ-活性化酵素である請求項15記載の治療免疫結合体。

【請求項21】

前記プロドラッグ-活性化酵素がアルカリホスファターゼ、アリアルスルファターゼ、シトシンデアミナーゼ、プロテアーゼ、D-アラニルカルボキシペプチダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼのような炭水化物-切断酵素、ベータ-ラクタマーゼ、ペニシリンアミダーゼ;および酵素活性を持つ抗体の群から選択される請求項20記載の治療免疫結合体。

【請求項22】

腫瘍細胞抗原に対する親和性を有する1以上の抗原結合部位、およびエピトープに対して親和性を有する1以上のエピトープ結合部位を含む、多価、多特異的抗体またはその断片であって、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される、多価、多特異的抗体またはその断片。

【請求項23】

前記多価、多特異的抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、請求項22記載の多価、多特異的抗体またはその断片。

【請求項24】

さらに、診断剤/検出剤または治療剤を含む請求項22記載の多価、多特異的抗体またはその断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

少なくとも2つの抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片を含む、抗体融合蛋白質またはその断片であって、該抗体またはその断片が請求項1記載の抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片から選択される、抗体融合蛋白質またはその断片。

## 【請求項 26】

哺乳動物において癌を治療する方法であって、治療上有効量の請求項1～25のいずれか一項に記載の抗体またはその断片で治療することを含み、該抗体は治療上許容される処方物に処方される、方法。

## 【請求項 27】

哺乳動物において癌を診断/検出する方法であって、該哺乳動物に、医薬上許容されるピヒクルに処方された、請求項1～26いずれか記載の抗体またはその断片の診断上有効量を投与する工程を含む、方法。

10

## 【請求項 28】

哺乳動物において癌を治療、または診断/検出する方法であって、

(i) それを必要とする哺乳動物に、請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を投与する工程；

(ii) ある量の非-結合蛋白質が該哺乳動物の血流を浄化するのに十分な時間待機する工程；ならびに、

(iii) 該哺乳動物に、該抗体の結合部位に結合する、診断剤、治療剤、またはその組合せを含む担体分子を投与する工程を含む、方法。

20

## 【請求項 29】

請求項1～28のいずれか一項に記載の抗-腫瘍細胞抗原抗体、またはその断片、または免疫結合体をコードする核酸を含むDNA配列。

## 【請求項 30】

請求項29記載のDNA配列を含む発現ベクター。

## 【請求項 31】

請求項30記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 32】

診断剤/検出剤または治療剤、またはその組合せを標的に送達する方法であって、

(i) 請求項1～31のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を含む免疫結合体を含む組成物を提供する工程；および

(ii) それを必要とする哺乳動物に該組成物を投与する工程を含む、方法。

30

## 【請求項 33】

哺乳動物において癌を治療する方法であって、医薬上適当な賦形剤中に処方された、請求項1～32のいずれか一項に記載の抗体を含む、少なくとも2つの抗体またはその断片を含む治療上有効量の抗体またはその断片を該哺乳動物に投与することを含む、方法。

## 【請求項 34】

さらに、請求項1に記載されていない第二の抗体またはその断片を含む請求項33記載の方法。

40

## 【請求項 35】

さらに、請求項1記載の第二の抗体またはその断片を含む請求項33記載の方法。

## 【請求項 36】

前記第二の抗体が治療剤または診断剤/検出剤に結合体化されている、請求項33記載の方法。

## 【請求項 37】

前記抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片が、悪性疾患によって発現された第二の腫瘍細胞抗原と反応性である第二の結合体化された抗体が前記哺乳動物に投与される前にか、投与されるのと一緒にか、または投与された後に投与される請求項34記載の方法。

## 【請求項 38】

50

前記抗 - 腫瘍細胞抗原抗体が、用量あたり 10 ng / kg 哺乳動物の体重から最大 100 mg / kg 哺乳動物の体重までの投与量で投与される、請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記投与量が反復して投与される、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 39 のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体を用いることを含む、哺乳動物において乳癌、前立腺癌、または結腸癌を検出または診断する方法。

【請求項 41】

請求項 1 ~ 40 のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体を用いることを含む、哺乳動物において乳癌、前立腺癌または結腸癌を治療する方法。

10

【請求項 42】

哺乳動物において乳癌、前立腺癌または結腸癌を治療する方法であって、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体を用いることを含み、該腫瘍細胞抗原が KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、および SLC1A5 の群から選択される、方法。

【請求項 43】

哺乳動物において癌を診断または検出するためのキットであって、該キットは：

d) 請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片、免疫結合体またはその断片であって、該抗体または断片は腫瘍細胞抗原に特異的に結合することができ、該腫瘍細胞抗原は KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、および SLC1A5 の群から選択される、抗体またはその断片、免疫結合体またはその断片；

20

e) 該哺乳動物における該癌の診断または検出を可能とする検出方法；ならびに

該キットを使用するための説明書

を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、ヒト化抗 - 癌抗体を含めた、抗 - 腫瘍細胞抗原アゴニストまたはアンタゴニスト、およびこれらの抗体を利用する診断および / または治療の方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

抗 - 癌治療剤の開発におけるかなりの進歩にもかかわらず、癌は全人口の死亡の第二の主たる原因のままである（最も最近の入手可能な統計では 2002 年に 22.8%）。事実、(www.cancer.org からは)、アメリカ人の男性は自分の人生において癌の何らかの形態を発症する 1 / 2 の機会を有し、他方、アメリカ人の女性は 1 / 3 の機会を有すると見積られる。最も便宜な癌治療剤は、活発に増殖する細胞を殺すことによって作用し、その結果として、しばしば非 - 特異的であり、健康な組織を損傷しかねず、または全身毒性に導きかねない。代替アプローチは、身体中の正常な健康細胞から標的化癌細胞を分ける努力において腫瘍細胞に発現されたマーカーを同定し、利用することを求めている。腫瘍マーカーの結合パートナーとして作用し、次いで、腫瘍細胞それ自体に直接的に作用するか、あるいは癌性細胞に対する免疫学的応答を誘導し、または治療ペイロードのいくつかの方法を選択的に送達するアゴニスト / アンタゴニスト分子または抗体を開発することができる（レビュー、非特許文献 1 参照）。

40

【0003】

治療または診断用法で認められているか、あるいは前臨床および臨床開発下にあるいくつかの抗 - 癌抗体治療剤がある。現在入手可能な認可された治療抗 - 癌抗体は慢性リンパ性白血病 (CLL) のためのアレムツツマブ (カンパス (Campath)) (ILEX Oncology and Schering AG)、非 - ホジキンリンパ腫 (NH

50

L)のためのリツキシマブ(リツキサン(Rituxan))(IDEC and Hoffmann-La Roche)、および乳癌のためのトラスツツマブ(ヘルセプチン(Herceptin))(Genentech and Hoffmann-La Roche)を含む。現在臨床試験を受けている分子の少数の例は、小細胞肺癌のための抗体hUN901-DM1(Immunogen)、前立腺癌のためのピバツツマブメルタンシン(MLN2704)(Millennium)、および前立腺、卵巣および乳癌のためのベルツツマブ(オムニタルグ(Omnitarg))(Genentech)を含む。(レビュー:非特許文献2参照)。一般に、これらの抗体は腫瘍細胞の表面に見出される特異的蛋白質を標的とし、腫瘍細胞に対するいくつかの種類の免疫原性応答(例えば、補体-依存性細胞傷害性(CDC)、または抗体依存性細胞傷害性(ADCC))を誘導することによって働くか、あるいは抗体は、抗体と腫瘍細胞マーカーとの相互作用に従って結合体化細胞傷害性体を標的化細胞へ送達する。

10

#### 【0004】

認可されてきた抗-癌抗体治療剤の増加にもかかわらず、この領域におけるかなりの満たされていない要望が依然として存在する。認可された治療剤のいくつかは、かなりの関連した毒性を有することが知られている。悪影響を及ぼす反応の多くは、治療抗体と健康な非-腫瘍組織との非-特異的かつ望まない相互作用によるものである。加えて、全ての患者が、現在認可されている抗体治療剤を用いて所望の程度まで応答するものではない。かくして、癌細胞に対するより大きな選択性をもって腫瘍細胞抗原を標的とする治療剤の開発は、癌治療剤の領域ではかなりの進歩を見せている。

20

#### 【0005】

抗-癌抗体の開発で用いる腫瘍細胞マーカーを選択する場合、殆どの望ましいマーカーは、豊富であって、各主要タイプに対する患者の大部分において癌細胞のみで均一に発現され、かついずれかの他の組織において発現されないものである。あいにくと、このレベルの特異性を呈するマーカーは殆どなく、かくして、健康な組織および特異的な癌性組織の間の発現の差の許容される量を示すマーカーが開発されなければならない。例えば、現在認可された抗体治療剤が認識する蛋白質はCD52(カンパス(Campath))、(カンパス、CD20(リツキサン(Rituxan)、特許文献1)、Zevalin(ベキサール(Bexxar))、HER2(ヘルセプチン(Herceptin)、特許文献2)、EGFR(エルピツクス(Erbix))およびVEGF(アバスタチン(Avastatin))を含む。これらの細胞マーカーの多くは健康な組織ならびに癌細胞において発現されているが、正常な組織と比較した場合、しばしば、癌においてより高度に発現されている(非特許文献3)。これらの組織特異性の考慮は、優れた細胞傷害性薬物を運ぶことができる免疫結合体抗体構築体についての特に重要な論点である。

30

【特許文献1】米国特許第5,736,137号明細書

【特許文献2】米国特許第5,821,337号明細書

【非特許文献1】Houshmand and Zlotnik, Current Opinion in Cell Biology (2003) 15(5): 640-44

【非特許文献2】Krauss, Mol. Biotechnol (2003) 25(1): 1-17

40

【非特許文献3】Flynn and Byrd, Current Opinion in Oncology (2000) 12(6): 574

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

癌細胞の特異的標的化は、抗-癌治療剤の開発における有意な進歩を表す。いくつかのタイプの癌に関連するいくつかのマーカーの同定にもかかわらず、健康な組織を損なわない優れた抗-癌治療剤の開発のための個々の癌のタイプにより特異的なさらなるマーカーに対する顕著な要望が依然として存在する。身体中の正常な細胞を害することなく抗体由来癌治療剤を解する標的化剤の開発におけるこれらのマーカーの利用は、明瞭かつかなり

50

満たされていない医学的要望がある領域における重要な治療的進歩を表すであろう。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、哺乳動物において癌を診断および/または治療する方法を提供する。該方法は、有効量の抗-腫瘍抗原アゴニストまたはアンタゴニストを投与することを含み、ここに、該腫瘍抗原は正常な組織に対する発現において少なくとも3倍上昇すると定義され、ここに、腫瘍抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。特別な具体例において、該アゴニストまたはアンタゴニストは抗-腫瘍細胞抗原抗体または小分子である。

10

【0008】

さらなる具体例において、本発明は、腫瘍細胞抗原を候補分子と接触させ、該腫瘍細胞抗原によって媒介され、あるいは該候補分子および該腫瘍細胞抗原の相互作用によって媒介される生物学的効果をモニターすることを含む、腫瘍細胞抗原に対するアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法に関する。

【0009】

なおさらなる具体例において、本発明は、担体と組合せて、本明細書中に記載された腫瘍細胞抗原のアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは抗-腫瘍細胞抗原抗体を含む組成物に関する。所望により、担体は医薬上許容される担体である。

20

【0010】

種々の形態の抗体がここに考えられる。例えば、抗-腫瘍抗原抗体は(例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域を有する)全長抗体、あるいは(例えば、F(a b ' 2)、F v、または単一鎖抗体、あるいは標的に特異的に結合する他の機能的断片)であってよい。さらに、抗体は固相に固定化された検出可能な標識で標識されていてよく、および/または(細胞傷害性剤のような)異種化合物と結合体化していてもよい。該抗体はサブヒト霊長類抗-腫瘍細胞抗原抗体、ネズミモノクローナル抗-腫瘍細胞抗原抗体、キメラ抗-腫瘍細胞抗原抗体、ヒト抗-腫瘍細胞抗原抗体、およびヒト化抗-腫瘍細胞抗原抗体の群から選択することができる。

【0011】

本発明は、K I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍抗原に結合する有効量の抗体をヒトに投与することを含む、ヒトにおいて癌を診断し、または治療する方法を提供し、ここに、癌の好ましい形態は結腸癌、直腸癌または結直腸癌、乳癌および前立腺癌を含む。

30

【0012】

抗体の診断的使用が考えられる。1つの診断適用において、本発明は、腫瘍細胞抗原を含有することが疑われる試料を本発明の抗体に暴露し、抗体の試料への結合を決定することを含む、K I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍細胞抗原の存在を決定する方法を提供する。この使用では、本発明は、抗体、および腫瘍細胞抗原を検出するのに抗体を用いるための指示書を含むキットを提供する。

40

【0013】

さらなる具体例において、本発明は、前記方法において(とりわけ)用いる製品を提供する。例えば、本発明は、容器およびそこに含まれる組成物を含む製品を提供し、ここに、該組成物を用いて、本発明のアゴニスト/アンタゴニストまたは抗体によって結合される腫瘍細胞抗原の1つを発現する癌を治療することができ、該製品は、さらに、該組成物がK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍抗原の1つを発現する癌を治療するのに用いることができることを示す添付文書を含む。

50

## 【0014】

本発明は、さらに：該抗体をコードする単離された核酸；所望により、当該ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される対照配列に操作可能に連結されたその核酸を含むベクター；そのベクターを含む宿主細胞；核酸が発現されるように宿主細胞を培養し、所望により、宿主細胞培養から（例えば、宿主細胞培養基から）抗体を回収することをさらに含む抗体の生産方法を提供する。

## 【0015】

本発明は、さらに、1以上の異種分子に結合体化したK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍細胞抗原に結合する抗体を含む免疫結合体、およびヒトにおいて癌の治療用のそのような結合体の使用に関し、ここに、該癌性細胞はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5から選択される腫瘍抗原の1つを発現することができる。免疫結合体における抗体は無傷抗体（例えば、無傷I g G 1抗体）、または抗体断片（例えば、F a b、F ( a b ) 2、ダイアボディ等）であってよい。

10

## 【0016】

本発明は、さらに、多価多特異的抗体またはその断片を提供し、ここに、該多価抗体はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍細胞抗原に対して親和性を持つ結合部位、および1以上のさらなる結合部位を有する。

20

## 【0017】

また、本発明は、K I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍細胞に、診断剤/検出剤または治療剤を送達する方法に関する。この方法は、本発明の抗体または免疫結合体組成物を供し、それを必要とする患者に投与することを含む。

## 【0018】

本発明によって考えられるのは、癌の検出/診断または治療のための2つの抗体またはその断片の使用であり、ここに、抗体または断片の少なくとも1つはK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される腫瘍細胞抗原に結合する。

30

## 【0019】

本発明の1つの具体例は、腫瘍細胞高原に結合する治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含み、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法であり、ここに、癌は正常な隣接する組織試料またはプールされた正常な組織試料に対して少なくとも3倍上昇している腫瘍細胞抗原を発現し、ここに、腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

## 【0020】

好ましい具体例において、抗体またはその断片はヒト、ヒト化、キメラまたはその断片である。

40

## 【0021】

なおもう1つの具体例において、抗体またはその断片はF v、F ( a b ' ) 2、F a b ' およびF a b からなる群より選択される。

## 【0022】

特に好ましい具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法で用いる抗体またはその断片は、腫瘍細胞抗原の細胞外ドメインに特異的に結合し、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

## 【0023】

50

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体またはその断片はK I A A 1 8 1 5の細胞外ドメインに結合し、該細胞外ドメインはおよそ位置1～408、およそ位置474～489、およそ位置545～581、およそ位置603～621、およそ位置642～653、および約674～904のアミノ酸の群から選択される。

【0024】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体またはその断片はB C 0 1 7 8 8 1の細胞外ドメインに結合し、該細胞外ドメインはおよそ位置1～117、約140～148、約165～211、および約230～240のアミノ酸の群から選択される。

10

【0025】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体、またはその断片はF L J 2 0 4 2 1の細胞外ドメインに結合し、および細胞外ドメインはおよそアミノ酸位置30～359である。

【0026】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体またはその断片はD S C D 7 5の細胞外ドメインに結合し、および細胞外ドメインはおよそアミノ酸位置20～208である。

【0027】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体または断片はG P R 1 6 0の細胞外ドメインに結合し、該細胞外ドメインはおよそ位置1～15、およそ位置80～93、およそ位置157～182、およそ位置263～276のアミノ酸の群から選択される。

20

【0028】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法に用いる抗体またはその断片はG P C R 4 1の細胞外ドメインに結合し、該細胞外ドメインはおよそ位置31～49、およそ位置104～112、およそ位置134～145、およそ位置170～195、およそ位置212～270、およそ位置299～307、およそ位置360～368、およそ位置390～403、およびおよそ位置427～445のアミノ酸の群から選択される。

30

【0029】

なおさらなる具体例において、哺乳動物における癌を診断し、検出しまたは治療する方法に用いる抗体またはその断片は免疫結合体である。

【0030】

好ましい具体例において、抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片、あるいは抗-腫瘍細胞抗原抗体融合蛋白質またはその断片は少なくとも1つの診断/検出剤、または少なくとも1つの治療剤に結合する。

【0031】

もう1つの具体例において、診断/検出免疫結合体が少なくとも1つの光活性(photoactive)診断/検出剤を含む診断/検出剤を含み、ここに、該光活性診断剤は色素原または色素を含む。

40

【0032】

好ましい具体例において、診断/検出免疫結合体は手術中、内視鏡、または静脈内腫瘍検出/診断に用いる。

【0033】

さらなる具体例において、治療免疫結合体が放射性核種、ホウ素、ガドリニウムまたはウラン原子、免疫モジュレーター、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、光活性治療剤、細胞傷害薬物、トキシン、脈管形成阻害剤、異なる抗体、およびその組合せからなる群より選択される治療剤を含む。

【0034】

50

さらなる具体例において、治療免疫結合体は薬物、プロドラッグ、酵素またはトキシンである細胞傷害性薬物を含む。

【0035】

なおもう1つの具体例において、治療免疫結合体は、カリケアミシン (calicheamicin) またはカリケアミシンアナログ、メイタンシン (maytansine) またはメイタンシン誘導体、またはオーリスタチン (auristatin) E、またはオーリスタチン E 誘導体を含む。

【0036】

もう1つの具体例において、治療免疫結合体はトキシンまたはその断片である細胞傷害性薬物を含み、ここに、該トキシンは植物、微生物、および動物トキシン、およびその合成変種を含む。

【0037】

さらなる具体例において、治療免疫結合体はサイトカイン、幹細胞成長因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン (IFN)、幹細胞成長因子、エリスロポエチン、トロンプオエチン、抗体およびその組合せからなる群より選択される免疫モジュレーターを含む。

【0038】

好ましい具体例において、治療免疫結合体はプロドラッグ - 活性化酵素である酵素を含む。

【0039】

さらなる具体例において、治療免疫結合体はアルカリホスファターゼ、アリアルスルファターゼ、サイトカインデアミナーゼ、プロテアーゼ、D - アラニルカルボキシペプチダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼおよびニューラミニダーゼのような炭水化物 - 切断酵素、ベータ - ラクタム、ペニシリンアミダーゼ、および酵素活性を持つ抗体の群から選択されるプロドラッグ - 活性化酵素を含む。

【0040】

さらなる具体例において、多価多特異的抗体またはその断片は、腫瘍細胞抗原に対する親和性を有する1以上の抗原結合部位、およびエピトープに対する親和性を有する1以上のエピトープ結合部位を含み、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

【0041】

好ましい具体例において、多価多特異的抗体またはその断片は、ヒト、ヒト化または記メラである多価多特異的抗体またはその断片を含む。

【0042】

なおもう1つの具体例において、多価多特異的抗体またはその断片は診断剤 / 検出剤または治療剤を含む。

【0043】

もう1つの具体例において、抗体融合蛋白質またはその断片は少なくとも2つの抗 - 腫瘍細胞抗原抗体またはその断片を含み、ここに、抗体またはその断片はこれまでに記載された具体例による該抗 - 腫瘍細胞抗原抗体またはその断片から選択される。

【0044】

好ましい具体例において、哺乳動物において癌を治療する方法は、これまでの具体例のいずれか1つによる治療上有効量の抗体またはその断片で処置することを含み、ここに、該抗体は治療上許容される処方物に処方されている。

【0045】

もう1つの具体例において、哺乳動物において癌を診断 / 検出する方法は、医薬上許容されるビヒクル中に処方された、これまでの具体例のいずれかによる診断上有効量の抗体またはその断片を該哺乳動物に投与する工程を含む。

【0046】

10

20

30

40

50

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を治療し、または診断し/検出する方法は、(i)これまでの具体例のいずれか1つによる抗体またはその断片をそれを必要とする哺乳動物に投与する工程；(ii)ある量の非-結合蛋白質が哺乳動物の血流を浄化するのに十分な量の時間待機する工程；次いで、(iii)該抗体の結合部位に結合する、診断剤、治療剤、またはその組合せを含む担体分子を哺乳動物に投与する工程を含む。

【0047】

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法は、これまでの具体例のいずれかの1つによる抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片をコードする核酸を含むDNA配列を含む。

【0048】

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法は、これまでの具体例のいずれか1つによる抗-腫瘍細胞抗原抗体、またはその断片、または免疫結合体のDNA配列を含む発現ベクターを含む。

【0049】

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法は、発現ベクターを含む宿主細胞を含む。

【0050】

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を診断し、検出し、または治療する方法は、(i)これまでの具体例のいずれか1つによる抗体またはその断片を含む免疫結合体を含む組成物を供し、および(ii)該組成物をそれを必要とする哺乳動物に投与することを含む、診断剤/検出剤または治療剤、または、その組合せを送達する方法を含む。

【0051】

さらなる具体例において、治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物において癌を治療する方法は、少なくとも2つの抗体またはその断片を含み、および医薬上許容される賦形剤中に処方されたこれまでの具体例のいずれか1つによる該抗体の使用を含む。

【0052】

さらなる具体例において、治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物において癌を治療する方法は、さらに、腫瘍細胞抗原に結合しない第二の抗体または断片を含み、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

【0053】

さらなる具体例において、治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物において癌を治療する方法は、さらに、腫瘍細胞抗原に結合する第二の抗体または断片を含み、ここに、腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

【0054】

もう1つの具体例において、治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物において癌を治療する方法は、さらに、第二の抗体またはその断片を含み、ここに、該第二の抗体は治療剤または診断剤/検出剤に結合体化している。

【0055】

さらなる具体例において、哺乳動物において癌を治療する方法は治療上有効量の抗体またはその断片を哺乳動物に投与することを含み、ここに、該抗-腫瘍細胞抗原抗体またはその断片は、第二の腫瘍細胞抗原に対して反応性である第二の結合体化抗体が悪性疾患によって発現される前、同時に、または後に投与される。

【0056】

さらなる具体例において、これまでの具体例ののいずれか一項に記載の方法は、用量あたり10ng/kgないし100mg/kg哺乳動物体重の用量で投与される抗-腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞抗原抗体の使用を含む。

【0057】

なおさらなる具体例において、これまでの具体例のいずれか一項に記載の方法は、抗-腫瘍細胞抗原抗体の使用を含み、ここに、該用量は反復して投与される。

【0058】

好ましい具体例において、哺乳動物において乳癌、前立腺癌、または結腸癌を検出または診断する方法は、これまでの具体例のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体の使用を含む。

【0059】

好ましい具体例において、哺乳動物において乳癌、前立腺癌または結腸癌を治療する方法は、これまでの具体例のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体の使用を含む。

10

【0060】

なおさらなる具体例において、哺乳動物において乳癌、前立腺癌または結腸癌を治療する方法は、これまでの具体例のいずれか一項に記載の抗体または免疫結合体の使用を含み、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択される。

【0061】

もう1つの具体例において、該方法は哺乳動物において癌の診断または検出用のキットを含み、ここに、該キットは：

20

- a) これまでの具体例のいずれか1による、抗体またはその断片、または免疫結合体またはその断片、ここに、該抗体または断片は腫瘍細胞抗原に特異的に結合することができ、ここに、該腫瘍細胞抗原はK I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、およびS L C 1 A 5の群から選択され；
- b) 該哺乳動物において該癌の該診断または検出を可能とする検出方法；および
- c) 該キットの使用のための指示書；

を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0062】

I. 定義

30

特に断りのない限り、用語「K I A A 1 8 1 5」は、本明細書中で用いる場合、ヒトゲノムにおける未知の機能の蛋白質をいい、ここに、該蛋白質は元来F L J 2 3 3 0 9として知られていたものである。遺伝子座に対する別名はL L I D 7 9 9 5 6またはb A 2 0 7 C 1 6 . 3である。K I A A 1 8 1 5 遺伝子は仮定アミノペプチダーゼドメインを含有する。K I A A 1 8 1 5 はいずれかの哺乳動物から、好ましくは、ヒトから由来するものでよい。K I A A 1 8 1 5 は分子の天然源から単離することができるか、あるいは(例えば、組換えDNA技術を用いて)合成手段によって生産することができる。ヒトK I A A 1 8 1 5 についての核酸配列は、例えば、受託番号NM\_\_024896下でN I H N C B I 配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は受託番号NP\_\_079172を用いて見することができる。K I A A 1 8 1 5 は、癌細胞において専ら発現されるいずれのK I A A 1 8 1 5 変種もいうことができ、ここに、非-癌性細胞で発現されたK I A A 1 8 1 5 に対するアミノ酸相同性は80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であり得る。別の具体例において、K I A A 1 8 1 5 はD 1 9 W s u 1 2 eとして知られたヒトK I A A 1 8 1 5 のマウスをホモログであってよい。別名はF x n a、M G C 2 8 2 8 0、m F L J 2 3 3 0 9およびD 1 9 E r t d 4 1 0 eである。マウスD 1 9 W s u 1 2 eについての核酸配列は、受託番号X M \_\_358328下でN I H N C B I 配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。なお別の具体例において、K I A A 1 8 1 5 はF x n aとして知られたヒトK I A A 1 8 1 5 遺伝子のラットホモログであってよい。ラットF x n aについての配列は、受託番号NM 1 8 4 0 5 0を用いてN I H N C B I 配列ビューアーで見することができる。も

40

50

う1つの具体例において、K I A A 1 8 1 5 はヒトK I A A 1 8 1 5 遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、P a n t r o g l o d y t e s (チンパンジー)ホモログは、核酸配列については受託番号X M \_ 5 2 6 4 7 8、またはアミノ酸配列についてはX P 5 2 0 4 7 8を用いてN C B I配列ビューアーで見出すことができる。

【0063】

「K I A A 1 8 1 5 E C D」とは、K I A A 1 8 1 5 腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(E C D)をいう。K I A A 1 8 1 5 E C Dは、癌細胞において専ら発現され得るいずれのK I A A 1 8 1 5 E C D変種もいうことができる。K I A A 1 8 1 5 E C Dとは、アミノ酸ホモログが細胞の外側に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%出会うよいいずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、E C Dを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。別の具体例において、K I A A 1 8 1 5 E C Dは、ヒトK I A A 1 8 1 5 E C Dのマウス、ラットまたは霊長類ホモログに由来してもよい。

10

【0064】

特に断りのない限り、用語「B C 0 1 7 8 8 1」とは、本明細書中で用いる場合、名称L O C 1 5 7 3 7 8またはT M E M 6 5によって代替的に知られたヒトゲノムにおける未知の機能の膜貫通蛋白質をいう。B C 0 1 7 8 8 1はいずれかの哺乳動物、好ましくはヒトに由来するものでよい。該B C 0 1 7 8 8 1は分子の天然源から単離することができ、または(例えば、組換えDNA技術を用いて)合成手段によって生産することができる。ヒトB C 0 1 7 8 8 1についての核酸配列は、例えば、受託番号N M \_ 1 9 4 2 9 1下でN I H \_ N C B I配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は受託番号N P \_ 9 1 9 2 6 7を用いて同様に見ることができる。B C 0 1 7 8 8 1とは癌細胞でもっぱら発現されるいずれのB C 0 1 7 8 8 1変種もいうことができ、ここに、非-癌性細胞で発現されたB C 0 1 7 8 8 1に対する相同性は80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよい。別の具体例において、B C 0 1 7 8 8 1は4 9 3 0 4 3 8 D 1 2 R i kとして知られたヒトB C 0 1 7 7 8 1のマウスであってよい。4 9 3 0 4 3 8 D 1 2 R i kに対する別名は2 6 1 0 0 2 9 0 1 3 R i kである。マウス4 9 3 0 4 3 8 D 1 2 R i kに対する核酸配列は、受託番号N M \_ 1 7 5 2 1 2下でN I H \_ N C B I配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。なおさらなる具体例において、B C 0 1 7 8 8 1はL O C 5 0 0 8 7 4として知られたラットホモログとしても知られる。L O C 5 0 0 8 7 4についての核酸配列は、受託番号X M \_ 5 7 6 2 7 3を用いてN I H \_ N C B I配列ビューアーで見することができる。もう1つの具体例において、B C 0 1 7 8 8 1はヒトB C 0 1 7 8 8 1遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、P a n t r o g l o d y t e s (チンパンジー)ホモログは、核酸配列については受託番号X M \_ 5 2 8 2 2 8、またはアミノ酸配列についてはX P \_ 5 2 8 2 2 8を用いてN C B I配列ビューアーで見出すことができる。

20

30

【0065】

「B C 0 1 7 8 8 1 E C D」とは、B C 0 1 7 8 8 1 腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(E C D)をいう。B C 0 1 7 8 8 1 E C Dとは、癌細胞において専ら発現され得るいずれのB C 0 1 7 8 8 1 E C D変種もいうことができる。B C 0 1 7 8 8 1 E C Dとは、アミノ酸ホモログが、細胞の外側に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよいいずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、E C Dを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。別の具体例において、B C 0 1 7 8 8 1 E C DはヒトB C 0 1 7 8 8 1 E C Dのマウス、ラットまたは霊長類ホモログに由来するものであってよい。

40

【0066】

特に断りのない限り、用語「F L J 2 0 4 2 1」とは、本明細書中で用いる場合、名称B A A 9 1 1 5 8、I M P A 3およびI m p a d 1によって代替的に知られたヒトゲノム

50

における未知の機能のミオ - イノシトールモノホスファターゼ蛋白質をいう。FLJ 20421 は、約アミノ酸 62 ないしアミノ酸 349 に位置する推定 I P P a s e ドメインを有する。FLJ 20421 は、いずれかの哺乳動物、好ましくはヒトに由来してよい。FLJ 20421 は分子の天然源から単離することができ、あるいは（例えば、組換え DNA 技術を用いて）合成手段によって生産することができる。ヒト FLJ 20421 についての核酸配列は受託番号 BC067814 下で NIH N C B I 配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は、例えば、受託番号 AAH67814 を用いて同様に見ることができる。FLJ 20421 とは、癌細胞で専ら発現されるいずれの FLJ 20421 変種もいうことができ、ここに、非 - 癌性細胞で発現された FLJ 20421 との相同性は 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% であってよい。代替具体例において、FLJ 20421 は Impad1 として知られたヒト FLJ 20421 のマウスホモログであってよい。Impad1 は AA08880、AI451589、AL022796、B23027P20 または 1110001C29Rik としても知られている。マウス Impad1 についての核酸配列は、受託番号 NM\_\_177730 下で NIH N C B I 配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。なお別の具体例において、FLJ 20421 は、RGD1306455 として知られたヒト遺伝子 FLJ 20421 のラットホモログであってよい。RGD1306455 についての核酸配列は、受託番号 XM\_\_575759 下で NIH N C B I 配列ビューアーで見することができる。もう一つの具体例において、FLJ 20421 はヒト FLJ 20421 遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、Pan troglodytes (チンパンジー) ホモログは、核酸配列については受託番号 XM\_\_519770、またはアミノ酸配列については XP\_\_519770 を用いて N C B I 配列ビューアーで見出すことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0067】

「FLJ 20421 ECD」とは、FLJ 20421 腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン (ECD) をいう。FLJ 20421 ECD とは、癌細胞で専ら発現され得るいずれの FLJ 20421 ECD 変種もいうことができる。FLJ 20421 ECD とは、アミノ酸のホモログが、細胞の外側に存在する蛋白質の部分の 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% であってよい。いずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、ECD を含む蛋白質の領域を見積ることができる (実施例 2 参照)。別の具体例において、FLJ 20421 ECD FLJ 20421 ECD はヒト FLJ 20421 ECD のマウス、ラットまたは霊長類ホモログに由来するものでよい。

#### 【0068】

特に断りのない限り、用語「DSCD75」とは、本明細書中で用いる場合、間葉幹細胞で発現される未知の機能の蛋白質をいい、約アミノ酸 54 ないしアミノ酸 179 に位置したチオエステラーゼ機能を有すると予測される F c b C ドメインを含有する。DSCD75 遺伝子座についての別名は LOC51337 または C8orf55 である。DSCD75 はいずれかの哺乳動物、好ましくはヒトに由来するものであってよい。DSCD75 は分子の天然源から単離することができるか、あるいは（例えば、組換え DNA 技術を用いて）合成手段によって生産することができる。ヒト DSCD75 についてのアミノ酸配列は、例えば、受託番号 AF242773 下で NIH N C B I 配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は受託番号 AAF65450 を用いて同様に見ることができる。DSCD75 は癌細胞で専ら発現されるいずれの DSCD75 変種もいうことができ、ここに、非 - 癌性細胞で発現された DSCD75 に対する相同性は 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% であってよい。別の具体例において、DSCD75 は 4930572 J05Rik または MGC54796 として知られたヒト DSCD75 遺伝子のマウスホモログであってよい。マウス 4930572 J05Rik についての核酸配列は、受託番号 NM\_\_198607 下で NIH N C B I 配列ビューアーで見出すことができる。なお別の具体例において、DSCD

75は、MGC94661として知られたヒトDSCD75遺伝子のラットホモログであってよい。ラットDSCD75についての核酸配列は、受託番号NM\_\_001007658下でNIH NCBI配列ビューアーで見出すことができる。別の具体例において、DSCD75はヒトDSCD75遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、Pan troglodytes (チンパンジー)ホモログは、核酸配列については受託番号XM\_\_519991、またはアミノ酸配列についてはXP\_\_519991を用いてNCBI配列ビューアーで見出すことができる。

【0069】

「DSCD75 ECD」とは、DSCD75腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(ECD)をいう。DSCD75 ECDとは、癌細胞において専ら発現され得るいずれのDSCD75 ECD変種もいうことができる。DSCD75 ECDとは、アミノ酸相同性が細胞の外部に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよいいずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、ECDを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。別の具体例において、DSCD75 ECDはヒトDSCD75 ECDの Maus、ラットまたは霊長類ホモログに由来するものであってよい。

10

【0070】

特に断りのない限り、用語「GPR160」とは、本明細書中で用いる場合、未知の機能の推定G-プロテインカップルド受容体をいう。それは、多くの他の推定G-プロテイン受容体のシリーズと共にTakeda et al.によって記載された(FEBS Lett. 520(1-3), 97-101(2002))。それはGPCR1またはGPCR150ともいわれてきたが、GPCR1として知られた1を超えるユニークなヒト遺伝子座がある。GPR160はいずれかの哺乳動物、好ましくはヒトに由来してもよい。GPR160は分子の天然源から単離することができ、あるいは(例えば、組換えDNA技術を用いて)合成手段によって生産され得る。ヒトGPR160についての核酸配列は、例えば、受託番号NM\_\_014373下でNIH NCBI配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は、受託番号NP\_\_055188を用いて同様に見ることができる。GPR160は癌細胞で専ら発現されるいずれのGPR160変種もいい、そこでは、非-癌性細胞で発現されたGPR160に対する相同性は80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよい。別の具体例において、GPCR160は、Gpr160として知られたヒトGPCR160遺伝子の Mausホモログであってよい。MausGpr160についての核酸配列は、受託番号XM\_\_896590下でNIH NCBI配列ビューアーで見出すことができる。なお別の具体例において、GPR160はGpr160として知られたヒトGPCR160ラットホモログであってよい。ラットGpr160についての核酸配列は、受託番号NM\_\_001025147下でNIH NCBI配列ビューアーで見出すことができる。もう1つの具体例においてGPR160はヒトGPCR160遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、Pan troglodytes (チンパンジー)ホモログは、核酸配列については受託番号XM\_\_530685、あるいはアミノ酸配列についてはXP\_\_530685を用いてNCBI配列ビューアーで見出すことができる。

20

30

40

【0071】

「GPR160 ECD」とは、GPR160腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(ECD)をいう。GPR160 ECDとは、癌細胞で専ら発現され得るいずれのGPR160 ECD変種もいうことができる。GPR160 ECDとは、アミノ酸相同性が細胞の外側に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよいいずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、ECDを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。別の具体例において、GPR160 ECDはヒトGPCR160 ECDの Maus、ラットまたは霊長類ホモログに由来するものであってよい。

【0072】

50

特に断りのない限り、用語「GPCR41」とは、本明細書中で用いる場合、未知機能の推定G-プロテインカップルド受容体をいう。GPCR41はPAR1（プロテアーゼ-活性化受容体1）およびPERV-A受容体（ブタ内因性レトロウイルス受容体）、D15Ert d747eおよびGPR172Aとしても知られている。それは、ブタ内因性レトロウイルスについての受容体としてEricsson et al.によって記載された(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(11), 6759-6764(2003))。GPCR41は、アミノ酸265~371のDUF1011度メインを含有する。DUFドメインは、いくつかの蛋白質によって共有された未知機能のドメインである。GPCR41はいずれかの哺乳動物、好ましくは、ヒトに由来するのであってよい。GPCR41は分子の天然源から単離することができるか、あるいは(例えば、組換えDNA技術を用いて)合成手段によって生産することができる。ヒトGPCR41についての核酸配列は、例えば、受託番号BC002917下でNIH NCBI配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は、受託番号AAH02917を用いて同様に見出すことができる。GPCR41とは、癌細胞で専ら発現されるいずれのGPCR41変種もいうことができ、そこでは、非-癌性細胞で発現されたGPCR41に対する相同性は80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよい。別の具体例において、GPCR41とは、Gpr172bとして、あるいはその別名GPCR、PAR2、GPCR42、D15Ert d747eまたは2010003P03Rikによって知られたヒトGPCR41遺伝子のマウスホモログをいうことができる。マウスGPCR41ホモログについての配列は、例えば、受託番号NM\_029643を用いてNIH NCBI配列ビューアーで見出すことができる。なおもう1つの具体例において、GPCR41とはLOC362942として知られたヒトGPCR41遺伝子のラットホモログについてもいうことができる。ラットGPCR41についての配列は、例えば、受託番号XM\_343272を用いてNIH NCBI配列ビューアーで見出すことができる。別の具体例において、GPCR41はヒトGPCR41遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、Papio hamadryas(オナガザル)ホモログは、核酸配列については受託番号AY070778、アミノ酸配列についてはAAL59884を用いてNCBI配列ビューアーで見出すことができる。

10

20

30

#### 【0073】

「GPCR41 ECD」とは、GPCR41腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(ECD)をいう。GPCR41 ECDは、癌細胞において専ら発現され得るいずれのGPCR41 ECD変種もいうことができる。GPCR41 ECDとは、アミノ酸相同性が細胞の外側に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよい。いずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジー予測プログラムを用いて、ECDを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。代替具体例において、GPCR41 ECDは、ヒトGPCR41 ECDのマウス、ラットまたは霊長類ホモログに由来することができる。

#### 【0074】

特に断りのない限り、用語「SLC1A5」とは、本明細書中で用いる場合、ASC T-2またはATBOという中性アミノ酸トランスポーターをいい、アラニン、セリンおよびシステインのような中性アミノ酸を輸送するナトリウム依存性アミノ酸トランスポーターとして機能する。加えて、SLC1A5はネコ内因性ウイルス、オナガザル内因性ウイルス、ヒト内因性ウイルスタイプWおよびタイプD霊長類または感染性免疫不全に関連するサルレトロウイルスのような多数のウイルスに対する受容体として働く。それは広い範囲の中性アミノ酸トランスポーターBoとしてKekuda et al.によって記載されており、ヒト胎盤細胞系から単離された(J. Biol. Chem. 271(31), 18657-18661(1996))。SLC1A5は、約アミノ酸54および485からの保存されたナトリウムカルボキシラーゼシンポーター(SDF)ドメインを含有する。SLC1A5についての他の名称はR16、AAAT、M7V1、RDRC、およ

40

50

びM7V S1を含む。SLC1A5はいずれかの哺乳動物、好ましくはヒトに由来してもよい。SLC1A5は分子の天然源から単離することができ、あるいは(例えば、組換えDNA技術を用いて)合成手段によって生産することができる。ヒトSLC1A5についての核酸配列は、例えば、受託番号BC000062下でNIH NCB I配列ビューアーウェブサイトで見出すことができる。アミノ酸配列は、受託番号AAH00062.1を用いて同様に見出すことができる。SLC1A5とは、癌細胞において専ら発現されるいずれのSLC1A5変種もいうことができ、そこでは、非-癌性細胞で発現されたSLC1A5に対する相同性は80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよい。別の具体例において、SLC1A5とは、Slc1a5、あるいはR16、AAAT、ATBO、M7V1、RDRC、ASCT2、M7V S1、Slc1a7またはMGC46952としても知られたヒトSLC1A5遺伝子のマウスホモログをいうことができる。マウスSlc1a5についての配列は、例えば、受託番号NM\_009201を用いるNIH NCB I配列ビューアーで見出すことができる。なお別の具体例において、Slc1a5とは、Slc1a5、あるいはAsc t2、Slc1a7またはH4-ASCT2としても知られたヒトSLC1A5のラットホモログをいう。ラットSlc1a5配列は、例えば、受託番号NM\_175758を用いてNIH NCB I配列ビューアーで見出すことができる。もう1つの具体例において、SLC1A5はヒトSLC1A5遺伝子の霊長類ホモログであってよい。例えば、Macaca fascicularis(尾長マカクザル)ホモログは、核酸配列については受託番号AB168329、あるいはアミノ酸配列についてBAE00453.1を用いてNCBI配列ビューアーで見出すことができる。

#### 【0075】

「SLC1A5 ECD」とは、SLC1A5腫瘍細胞抗原の細胞外ドメイン(ECD)をいう。SLC1A5 ECDとは、癌細胞で専ら発現され得るいずれのSLC1A5 ECD変種もいうことができる。SLC1A5 ECDとは、アミノ酸相同性が細胞の外側に存在する蛋白質の部分の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%であってよいいずれの蛋白質またはペプチドもいう。トポロジ-予測プログラムを用いて、ECDを含む蛋白質の領域を見積ることができる(実施例2参照)。別の具体例において、SLC1A5 ECDはヒトSLC1A5 ECDのマウス、ラットまたは霊長類ホモログに由来することができる。

#### 【0076】

「天然配列」ポリペプチドは、天然に由来するポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するものである。そのような天然配列ペプチドは天然から単離することができるか、あるいは組換えまたは合成手段によって生産することができる。かくして、天然配列ポリペプチドは天然に生じるヒトポリペプチド、ネズミポリペプチド、あるいはいずれかの他の哺乳動物種からのポリペプチドのアミノ酸配列を有することができる。

#### 【0077】

用語「アミノ酸配列変種」とは、天然配列ポリペプチドから幾分異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。通常、アミノ酸配列変種は、天然リガンドの少なくとも1つの受容体結合ドメインに対して、あるいは天然受容体の少なくとも1つのリガンド結合ドメインに対して少なくとも約70%相同性を保有し、好ましくは、それらはそのような受容体またはリガンド結合ドメインに対して少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%相同性であろう。アミノ酸配列変種は、天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内のある位置において、置換、欠失、および/または挿入を保有する。

#### 【0078】

「相同性」は、配列を整列させ、もし必要であれば、ギャップを導入して、最大パーセント相同性を達成した後に、同一であるアミノ酸配列変種における残基のパーセンテージと定義される。整列のための方法およびコンピュータープログラムは当該分野で良く知られている。

#### 【0079】

10

20

30

40

50

用語「アンタゴニスト」は最も広い意味で用いられ、本明細書中に開示された腫瘍細胞抗原の生物学的活性を部分的にまたは十分にブロックし、阻害し、または中和するいずれの分子も含む。同様に、用語「アゴニスト」は最も広い意味で用いられ、本明細書中で開示された腫瘍細胞抗原の生物学的活性を模倣するいずれの分子も含む。適当なアゴニストまたはアンタゴニスト分子は、具体的には、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体または抗体断片、腫瘍細胞抗原の断片またはアミノ酸配列変種、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小さな有機分子等を含む。腫瘍細胞抗原のアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法は、注目する抗原を発現する腫瘍細胞を候補アゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させ、腫瘍細胞抗原と通常関連する1以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含むことができる。アンタゴニストは、合理的な設計によって、またはファージ提示によって生じたペプチドであってもよい（例えば、1998年8月13日に公開されたWO 98/35036参照）。1つの具体例において、選択した分子は、抗体のCDRに基づいて設計された「CDRミミック」または抗体アナログであってよい。そのようなペプチドはそれ自体が拮抗し得るが、該ペプチドは、所望により、細胞傷害性剤と融合させ、ペプチドの拮抗特性を加え、または増強することができる。

10

## 【0080】

「小分子」は、本明細書中においては、約500ダルトン未満の分子量を有する。

## 【0081】

用語「抗体」は、本明細書中においては、最も広い意味で用いられ、具体的には、無傷モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成された多価抗体（例えば、二価抗体）、単一鎖抗体、修飾されたFcを持つ抗体、および抗体断片を、それらが所望の生物学的活性を呈する限りはカバーし、ここに、所望の生物学的活性は、所望の標的に対する結合特異性を有するものと定義することができる。

20

## 【0082】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書中で用いるように、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に生じる突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して向けられている。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して向けられる。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体によって汚染せずに合成できる点で有利である。修飾後（モノクローナル）は、抗体の実質的に均質な集団から得られた抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法によって抗体の生産の要求に応じて解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いるべきモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製することができるか、あるいは組換えDNA方法によって作製することができる（例えば、米国特許第4,816,567号参照）。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら、Nature, 352:624-628(1991)およびMarksら、J.Mol.Biol.222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

30

40

## 【0083】

モノクローナル抗体は、本明細書中においては、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来し、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する後退中の対応する配列と同一であるか、または相同であり、他方、鎖の残りはもう1つの種に由来し、またはもう1つの抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同である「キメラ」抗体、ならびにそれらが所望の生物学的活性を呈する限りはそのような抗体の断片を含む（（米国特許第4,816,567号；およびMorrissonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855(1984)）。注目するキメラ抗体は、本明細書中においては、非-ヒト霊長類（例えば、旧世界のサル、類人猿等）に由来する可変ドメイン抗原-結合配列、およ

50

び腓と定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

【0084】

「抗体断片」は、好ましくは、その抗原 - 結合または可変領域を含む無傷抗体の一部を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片；ダイアボディ；線状抗体（Zapataら、Protein Eng. 8(10)：1057-1062 [1995]）；単一 - 鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多価抗体を含む。

【0085】

「無傷」抗体は、抗原 - 結合可変領域、ならびに軽鎖定常ドメイン（C<sub>L</sub>）および重鎖定常ドメイン、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変種であつてよい。好ましくは、無傷抗体は1以上のエフェクター機能を有する。

【0086】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域（天然配列Fc領域、またはアミノ酸配列変種Fv領域）に帰される生物学的活性をいう。抗体エフェクター機能の例はC1q結合；補体依存性細胞傷害性；Fc受容体結合；抗体 - 依存性細胞 - 媒介細胞傷害性（ADCC）；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーション等をいう。

【0087】

「抗体 - 依存性細胞 - 媒介細胞傷害性」または「ADCC」とは、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原 - 担持標的細胞に特異的に結合し、引き続いて、サイトキシンで標的細胞を殺すのを可能とする細胞傷害性の形態をいう。抗体は細胞傷害性細胞を「武装し」、そのような殺傷に絶対的に必要である。ADCCを媒介する主な細胞、NK細胞はFcγRIIのみを発現し、他方、単球はFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9：457-92（1991）の464ページの表3にまとめられている。注目する分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5,500,362号および第5,821,337号に記載されたもののようなイン・ビトロADCCアッセイを行うことができる。そのようなアッセイで有用なエフェクター細胞は末梢血液中単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む。別法として、あるいは加えて、注目する分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al. (USA) 95：652-656（1998）に開示されたもののような動物モデルにおいて評価することができる。

【0088】

「ヒトエフェクター細胞」は、1以上のFcRを発現し、エフェクター機能を行う白血球である。好ましくは、該細胞は少なくともFcガンマRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を行う。ADCCを媒介するヒト白血球の例は末梢血液中単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球を含み；PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞はその天然源から、例えば、本明細書中に記載されたように血液またはPBMCから単離することができる。

【0089】

用語「Fc受容体」または「FcR」を用いて、抗体のFc領域に結合する受容体を記載するのに用いる。好ましいFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRはIgG抗体に結合するものであり（ガンマ受容体）、FcガンマRI、FcガンマRII、およびFcガンマの受容体を含む。対立遺伝子変種、およびこれらの受容体の別法としてスプライスされた形態を含めたRIIIサブクラス。FcガンマRII受容体は、主としてその細胞質ドメインが異なる同様なアミノ酸配列を有する、FcガンマRIIA（「活性化受容体」）およびFcガンマRIIB（「阻害性受容体」）を含む。活性化受

10

20

30

40

50

容体FcガンマRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン-ベースの活性化モチーフ(ITAM)を含有する。阻害性受容体FcガンマRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン-ベースの阻害モチーフ(ITIM)を含有する(レビューM. in Daron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997) 参照)。FcRはRavetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capelら、Immunomethods 4: 25-34 (1994); およびde Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995) にレビューされている。将来同定されるべきものを含めた他のFcRは本明細書中においては用語「FcR」によって含まれる。該用語は、母性IgGの胎児への移動を担う新生受容体FcRnを含む(Guyerら、J. Immunol. 117: 587 (1976) およびKimら、J. Immunol. 24: 249 (1994))。

10

#### 【0090】

「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」とは、補体の存在下において標的を溶解する分子の能力をいう。補体活性化経路は、同族抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への、補体系の第一の成分(C1q)の結合によって開始される。補体活性化を評価するためには、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202: 163 (1996) に記載されたCDC化アッセイを行うことができる。

20

#### 【0091】

「細胞死滅を誘導する」抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、生きた細胞が活力がないようにするものである。該細胞は癌細胞特異的抗原を発現するもの、好ましくは、同一組織タイプの正常な細胞と比較して癌抗原を過剰発現する細胞である。好ましくは、該細胞は癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓または膀胱細胞である。イン・ビトロ細胞死滅は、補体および免疫エフェクター細胞の不存在下で決定して、抗体-依存性細胞-媒介細胞傷害性(ADCC)または補体依存性細胞傷害性(CDC)によって誘導される細胞死滅を区別することができる。かくして、細胞死滅についてのアッセイは加熱不活化血清を用い、(すなわち、機能的補体の不存在下において)、および免疫エフェクター細胞の不存在下で行うことができる。抗体、オリゴペプチド、または他の有機分子が細胞死滅を誘導することが否かを決定するために、ヨウ化プロピジウム(PI), トリバンブルー-Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11 (1995) 参照) または7AADの取込によって評価した膜一体性の喪失は、未処理細胞に対して評価することができる。好ましい細胞死滅-誘導性抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、標的細胞の少なくとも20%におけるPI取込アッセイにおいてPI取込を誘導するものである。

30

#### 【0092】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の膨張、細胞断片化、および/または(アポトーシス体と呼ばれる)膜小胞の形成によって決定されるプログラムされた細胞の死滅を誘導するものである。好ましくは、該細胞は腫瘍細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓または膀胱細胞である。種々の方法が、アポトーシスに関連する細胞事象を評価するのに利用可能である。例えば、ホスファチジルセリン(PS)トランスロケーションはアネキシン結合によって測定することができ; DNA断片化はDNAラダリングを介して評価することができ; およびDNA断片化を伴う核/クロマチン凝縮はハイポジプロイド細胞のいずれかの増加によって評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、BT474細胞(後記参照)を用いるアネキシン結合アッセイにおいて未処理細胞に対してアネキシン結合の約2~50倍、好ましくは約5~50倍、最も好ましくは約10~50倍、あるいは50倍を超える誘導をもたらすものである。

40

#### 【0093】

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽鎖(L)および2つの同一の重鎖(H)から構

50

成される約150,000ダルトンのヘテロテトラマー糖蛋白質である。各軽鎖は1つの共有ジスルヒド結合によって重鎖に連結され、他方、ジスルヒド結合の数は異なる免疫グロブリンイソタイプの重鎖の間で変化する。各重鎖および軽鎖は規則的に間隔が設けられた鎖内ジスルフィドブリッジも有する。各重鎖は、1つの端部において、可変ドメイン(V<sub>H</sub>)、続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、1つの端部における可変ドメイン(V<sub>L</sub>)、およびその他の端部において定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメインの間で界面を形成すると考えられる。

【0094】

「裸の抗体」は、通常、いずれかの化学、生物学的または放射性核種部位と連結または結合体化していない抗体またはその断片であるが、グリコシル化のような天然修飾を含むことができる。

【0095】

用語「可変」とは、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列がかなり異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性で用いられるという事実をいう。しかしながら、変動性は、抗体の可変ドメインを通じて均一に分布していない。それは、軽鎖および重鎖双方の可変ドメインにおいて超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々、ベータ-シート構造に連結し、ある場合には、該構造の一部を形成するループを形成する、3つの超可変領域によって連結された、ベータ-シート立体配置をかなり採用する4つのFRを含む。各鎖における超可変領域はFRによって近接して一緒に保持され、他の鎖からの超可変領域とで、抗体の抗原-結合部位の形成に寄与する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)参照)。定常ドメインは抗体を抗原に結合させるにおいて直接的には関与していないが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)における抗体の参画のような種々のエフェクター機能を呈する。

【0096】

用語「超可変領域」とは、本明細書中で用いる場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、一般には、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおいては残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)、および重鎖可変ドメインにおける31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))、および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)、および重鎖可変ドメインにおける26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中で定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0097】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原-結合断片を生じ、各々は単一の抗原-結合部位、およびその名称が容易に結晶化するその能力を反映する残存(Fc)断片を持つ。パパイン処理は2つの抗原-結合部位を有し、依然として、抗原を架橋することができるF(ab')<sub>2</sub>断片を生じる。

【0098】

10

20

30

40

50

「Fv」は、完全な抗原 - 認識および抗原 - 結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、密に非 - 共有結合会合した、1つの重鎖および1つの軽鎖可変領域のダイマーからなる。各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、 $V_H - V_L$ ダイマーの表面の抗原 - 結合部位を規定するのはこの立体配置においてである。集合的に、6つの超可変領域は抗原 - 結合特異性を抗体に付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的なただ3つの超可変領域を含むFvの半分）さえ、全結合部位よりも低い親和性におけるものであるが、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【0099】

Fab断片は軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の最初の定常ドメイン（CH1）を含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において少数の残基を付加することによってFab断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書中においては、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つの遊離チオール基を担うFab'についての表示である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片の一部として元来は生産された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

10

【0100】

いずれかの脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」には、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる2つの明瞭に区別されるタイプのうちの1つを割り当てることができる。

【0101】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、無傷抗体には異なる「クラス」を割り当てることができる。5つの主なクラスの無傷抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうちのいくつかはさらに「サブクラス」（イソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2に分けることができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、各々、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置はよく知られている。

20

【0102】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体の $V_H$ および $V_L$ ドメインを含み、ここに、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、さらに、scFvが抗原結合用の所望の構造を形成するのを可能とする $V_H$ および $V_L$ ドメインの間のポリペプチドリンカーを含む。scFvのレビューについては、Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994) 参照。抗-ErbB2抗体scFv断片はWO93/16185；米国特許第5,571,894号；および米国特許第5,587,458号に記載されている。

30

【0103】

用語「ダイアボディ」とは、2つの抗原 - 結合部位を持つ小さな抗体断片をいい、その断片は、同一ポリペプチド鎖（ $V_H - V_L$ ）中の可変軽鎖ドメイン（ $V_L$ ）に連結された可変重鎖ドメイン（ $V_H$ ）を含む。同一鎖上の同一ドメインの間の対合を可能とするには余りにも短いリンカーを用いることによって、ドメインはもう1つの鎖の相補的ドメインと対合し、2つの抗原 - 結合部位を作り出せるように強いられる。ダイアボディは、例えば、EP404,097；WO93/11161；およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) により十分に記載されている。

40

【0104】

「多価抗体」は少なくとも2つの結合部位を含む抗体または抗体断片であり、ここに、結合部位は同一エピトープに対する、あるいは、2つの異なるエピトープに対する特異性

50

を有することができる。

【0105】

非-ヒト(例えば、げっ歯類)抗体の「ヒト化」形態は、非-ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。殆どの場合において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン(受容体抗体)であり、ここでは、受容体の超可変領域からの残基は、所望の特異性、親和性および容量を有する、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類のような非-ヒト種の超可変領域からの残基によって置換えられている(ドナー抗体)。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非-ヒト残基によって置換えられている。さらに、ヒト化抗体は、受容体抗体において、またはドナー抗体において見出されないが、例えば、他のヒト抗体において見出すことができる残基を含むことができる。これらの修飾(「超ヒト化」)は、抗体性能をさらに改良するようにする。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的全てを含み、ここでは、超可変ループの全て、または実質的に全てが非-ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、FRの全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のそれである。ヒト化抗体は、所望により、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含むであろう。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature 332:323-329(1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992) 参照。

10

【0106】

「単離された」抗体は、その天然の環境の成分から、同定され、および分離され、および/または回収されたものである。その天然環境の汚染成分は、抗体についての診断または治療的使用に干渉するであろう物質であり、酵素、ホルモン、および他の蛋白質性または蛋白質性または溶質を含むことができる。好ましい具体例において、抗体は、(1) Lowry方法によって決定して95重量%を超える抗体、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2)回転カップセケネーターの使用によってN-末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クマシブルー、好ましくは、銀着色剤を用いて還元または非還元条件下でSDS-PAGEによって均質まで精製されるであろう。単離された抗体は、組換え細胞内のイン・サイチュでの抗体を含む。というのは、抗体の天然環境の少なくとも1つ成分は存在しないからである。しかしながら、通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製されるであろう。

20

30

【0107】

注目する抗原に「結合する」抗体は、該抗体が抗原を発現する細胞を標的化するにおいて治療剤または診断剤として有用なように、十分な親和性をもってその抗原に結合することができるものである。

【0108】

特定のポリペプチド、または特定のポリペプチド上のエピトープ「二特異的に結合する」または「それに対して特異的な」抗体は、いずれかの他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなくその特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合するものである。好ましくは、注目する標的に対して特異的な抗体は、他の非-特異的エピトープに対するよりは標的細胞上の抗原に対して1.5-倍、2-倍、5-倍、10-倍、100-倍、 $10^3$ -倍、 $10^4$ -倍、 $10^5$ -倍、 $10^6$ -倍またはそれ以上の結合をもって結合する。所望により、抗体は、霊長類、マウスおよび/またはラットにおけるオルソログを含めた、いずれかの公知の標的腫瘍細胞抗原オルトログに対して特異性または特異的非-結合を示すことができる。所望により、抗原は注目する腫瘍細胞抗原、および同一種内の公知のホモログの間を区別することができる。区別はもう1つのホモログよりは1つのホモログに対する結合の特性によって決定することができる。ここに、注目するホモログに対する抗体の結合は、抗体の非-所望のホモログへの結合と比較して、1.5-倍、2-倍、5-倍、10-倍、100-倍、 $10^3$ -倍、 $10^4$ -倍、 $10^5$ -倍、 $10^6$ -倍またはそれ以上の結合をもって結合する。抗体

40

50

は、解離浄水が1 μM未満、好ましくは100 nM未満、最も好ましくは10 nM未満である場合に、エピトープに特異的に結合するといわれる。

【0109】

本発明の抗-腫瘍細胞抗原抗体は、アミノ酸-残基-特異的-エピトープ、炭水化物-特異的エピトープ、または標的担持腫瘍細胞によって発現される、アミノ酸残基、および分子の炭水化物部分によって形成されたエピトープに結合することができる。もし抗-腫瘍細胞抗原抗体が細胞傷害性または静性細胞剤を担うならば、抗体は、抗体-標的受容体複合体を内部化するエピトープに結合するのが好ましいであろう。もし抗-標的抗体がADCおよびCDCを通じて働くべきであれば、抗-標的抗体は、抗体のFc領域がエフェクター細胞に結合するまで、標的腫瘍細胞の表面に留まるのが好ましい。同族細胞表面抗原に結合した抗体が細胞表面に留まるか、または内部化されるかを決定する方法は当該分野で良く知られている。

10

【0110】

用語「エピトープ」とは、抗体の可変端部が結合する抗原上の特異的結合部位または抗原決定基という。エピトープは線状であり、すなわち、主なボルミン配列で見出されたアミノ酸残基の配列で構成され得る。エピトープは、抗体が、認識されるアミノ酸が一次配列において必ずしも連続しないように、ボルミン発現細胞の表面に発現された折畳まれたボルミン分子で見出される3-D構造を認識するような立体配座とすることができる。エピトープは、線状および立体配座エレメントの組合せでもあり得る。さらに、標的担持腫瘍細胞によって発現される分子の炭水化物部分もまたエピトープとなり得る。

20

【0111】

用語「腫瘍細胞抗原」とは、いずれかの蛋白質、炭水化物、または免疫応答を誘導することができる他の成分をいう。該定義は、限定されるものではないが、抗原としてのその会合した抗原の全てと共に全腫瘍細胞を、ならびに原形質膜、細胞表面または膜から精製された蛋白質、または細胞表面に会合したユニークな炭水化物部位のような細胞のボディから分離されたいずれかの成分を含むつもりである。該定義は、アクセスすべき細胞の特殊な処理を必要とする細胞の表面からの抗原を含む。「マーカー」とは、同等な正常な細胞と比較して、腫瘍細胞においてより高度に発現された腫瘍細胞抗原をいう。

【0112】

用語「標識」とは、本明細書中で用いる場合、抗体に直接的にまたは間接的に結合体化して、「標識された」抗体を生じる検出可能な化合物または組成物をいう。標識はそれ自体によって検出可能であるか（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、あるいは酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物または組成物の化学的改変を触媒することができる。

30

【0113】

「固相」は、本発明の抗体が接着することができる非-水性マトリックスを意味する。本明細書中で含まれる固相の例はガラス（例えば、制御されたポアガラス）、多糖（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンから部分的にまたは全体的に形成されたものを含む。ある具体例において、文脈に依存して、固相はアッセイプレートのウェルを含むことができ；他の場合には、それは精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）である。この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたもののような、区別される粒子の不連続な固相も含む。

40

【0114】

「アンタゴニスト抗体」または「拮抗的抗体」は、本明細書中に開示された腫瘍細胞抗原の生物学的活性をブロックし、阻害し、または中和する抗体である。注目する腫瘍細胞抗原の拮抗的抗体を同定する方法は、注目する腫瘍細胞抗原を発現する腫瘍細胞を候補抗体と接触させ、次いで、腫瘍細胞におけるその腫瘍細胞抗原と正常に会合した生物学的活性の変化を測定することを含むことができる。例えば、腫瘍細胞抗原は、腫瘍細胞増殖を誘導するものであってよく、効果的な拮抗的抗体は、腫瘍細胞抗原と特異的も相互作用し

50

、その結果、細胞増殖の減少をもたらすものであろう。好ましいアンタゴニスト抗体は、注目する生物学的活性の30～75%低下をもたらすものであり、最も好ましいのは注目する生物学的活性の75～99.9%低下以上をもたらすものである。

【0115】

リガンド活性化を「ブロックする」抗体、または「ブロッキング」抗体は、抗体が結合するリガンドの活性化を低下させ、または妨げる拮抗的活性の1つのタイプである。好ましくは、ブロッキング抗体は、リガンド活性化アッセイが推定ブロッキング抗体の存在または不存在下で並行して測定する場合のリガンド活性化の30～75%をブロックするものであり、最も好ましくはリガンド活性化の75～99.9%以上である。リガンド活性化の妨げは、受容体リン酸化の減少、または例えば、注目するリガンドの下流のシグナル変換経路の他の成分の活性化の喪失のような現象を観察することによって測定することができる。

10

【0116】

「アンタゴニスト抗体」は、抗体が結合するリガンドの活性化を誘導するものである。好ましくは、アゴニスト抗体は、リガンド活性化アッセイにおいて、候補抗体を非-特異的抗体対照と並べて比較した場合に、2倍、4倍、10倍、50倍以上リガンド活性化を増加させるものである。リガンド活性化は、例えば、受容体リン酸化の増加、または注目するリガンドの下流にあるシグナル変換経路の他の成分の活性化の増加のような現象を観察することによって測定することができる。

20

【0117】

命名された抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、それを、同一抗原に結合する他の抗体から区別するその抗体の生物学的特徴の1以上を保有するものである。

【0118】

「成長阻害剤」とは、本明細書中で用いる場合、細胞、特に癌細胞の成長をイン・ビトロまたはイン・ビボで阻害する化合物または組成物をいう。かくして、成長阻害剤は、S相にある細胞のパーセンテージを有意に低下させるものであり得る。成長阻害剤の例は、G1阻止およびM-相阻止を誘導する剤のような、(S相以外の箇所において)細胞周期の進行をブロックする剤を含む。古典的なM-相ブロッカーはビンカ(ピンクリスチンおよびビンブラスチン)、タキサン、ならびにトリソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびプレオマイシンのようなトポII阻害剤を含む。G1を阻止する剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロベタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびara-CのようなDNAアルキル化剤もまたS-相阻止へ溢れる。さらなる情報は、Murakami et al. (W B Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁による、「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」と題された、Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1に見出すことができる。好ましい成長阻害剤は、成長阻害剤の存在下で細胞成長の20%を超えて、あるいは25%を超えて、30%を超えて、35%を超えて、40%を超えて、45%を超えてブロックするものであり、より好ましいのは細胞成長の50%を超えて、または55%を超えて、60%を超えて、65%を超えて、70%を超えて、75%を超えて、80%を超えて、85%を超えて、90%を超えてブロックするものであり、最も好ましいのは細胞成長の95%、または99.9%を超えてブロックするものである。

30

40

【0119】

「静細胞剤」とは、本明細書中で用いる場合、細胞死滅を引き起こすことなく細胞分裂を阻害する化合物または組成物をいう。静細胞剤は細胞周期を通じての細胞進行を阻害することができる、例えば、S相に先立つような細胞周期における特定の地点において分裂阻止を引き起こすことができる。好ましい静細胞剤は、細胞の30～50%において阻止を引き起こすものであり、より好ましくは細胞の50～95%において阻止を引き起こすも

50

のであって、最も好ましいのは集団において細胞の95～99.9%以上において阻止を引き起こす剤である。

【0120】

用語「処置」、「処置している」、「処置する」等は、本明細書中においては、一般には、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることをいう。「処置」とは、治療的処置および予防的または予防尺度を共にいう。処置を必要とする者は、障害を既に持つ者、ならびに障害が予防されるべき者を含む。よって、ここに、処置すべき哺乳動物は障害を有すると診断された者であり得、あるいは障害の素因がある、またはそれに罹患性であり得る。

【0121】

本明細書中に開示されたポリペプチド、またはそのアンタゴニストまたはアゴニストの「有効量」は、具体的に述べられた目的を行うのに十分な量である。「有効量」は、述べられた目的との関係で、経験的におよびルーチン的方法で決定することができる。

【0122】

処置の目的での「哺乳動物」とは、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ等のような、ヒト、家畜および農場動物、および動物園の動物、およびスポーツ動物、またはペット動物を含めた、哺乳動物として分類されるいずれの動物もいう。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0123】

「障害」は、本発明のアゴニスト/アンタゴニスト、または標的化抗体または免疫結合体での処置から利益を受けるいずれかの疾患である。これは、哺乳動物を問題とする障害の素因があるようにする病理学的疾患を含めた慢性および急性障害または病気を含む。ここに処置すべき障害の非限定的例は、良性および悪性腫瘍；白血病およびリンパ系悪性疾患；ニューロン、神経膠、星状神経膠、視床下部および他の腺、マクロファージ、上皮、間質および胞胚腔障害；および炎症、脈管形成および神経学的障害を含む。

【0124】

用語「治療上有効量」とは、哺乳動物において病気または障害を治療するのに有効な薬物の量をいう。癌の場合において、薬物の治療上有効量は癌細胞の数を低下させることができ；腫瘍のサイズを低下させることができ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害する（すなわち、幾分遅くする、好ましくは停止する）ことができ；腫瘍転移を阻害する（すなわち、幾分遅くし、好ましくは停止させる）ことができ；腫瘍成長をある程度阻害することができる；および/または癌に関連する兆候の1以上を幾分軽減することができる。薬物が成長を抑制し、および/または現存の癌細胞を殺傷することができる程度まで、それは静細胞性および/または細胞傷害性であり得る。癌療法では、効率は、例えば、病気進行への時間(TTP)を評価し、および/または応答速度(RR)を決定することによって測定することができる。

【0125】

「過剰増殖性病または障害」は、悪性または良性を問わず、全ての形質転換された細胞および組織および全ての癌性細胞および組織を含めた、全ての新形成細胞成長および増殖を意味する。過剰増殖病または障害は、限定されるものではないが、前癌性病巣、異常な細胞成長、良性腫瘍、悪性腫瘍、および「癌」を含む。過剰増殖病、障害および/または疾患のさらなる例は、限定されるものではないが、良性または悪性を問わず：前立腺、結腸、腹部、骨、乳房、消化系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、目、頭および首、神経（中枢および末梢）、リンパ系、胎盤、皮膚、柔軟組織、非像、喉、および泌尿器系管に位置する新生物を含む。

【0126】

用語「癌」、「新生物」、「腫瘍」、「癌性」および「癌腫」とは、調節されない細胞成長によって典型的には特徴付けられる哺乳動物における生理学的疾患をいい、またはそれを記載する。一般に、本出願における検出または処置のための注目する細胞は前癌性（例えば、良性）、悪性、転移性、および非-転移性細胞を含む。癌性細胞の検出は特に興味深いものである。癌の例は、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、

10

20

30

40

50

肉腫、および白血病またはリンパ系悪性疾患を含む。そのような癌のより特別な例は扁平細胞癌（例えば、上皮扁平細胞癌）、小-細胞肺癌、非-小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平癌腫を含めた肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含めた胃癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌腫、肛門癌腫、陰茎癌、ならびに頭部および頸部癌を含む。

【0127】

腫瘍細胞抗原を「過剰発現」する癌は、同一組織タイプの非癌性細胞と比較して有意により高いレベルのその抗原を生産するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅によって、または増大した転写または翻訳によって引き起こすことができる。抗原の過剰発現は、患者において、例えば、腫瘍バイオプシーにおいてリガンド（またはそれをコードする核酸）のレベルを評価することによって、あるいはIHC、FISH、サザンブロッティング、PCR、または前記したイン・ビボアッセイのような種々の診断アッセイによって、診断的に決定することができる。

10

【0128】

用語「予後」は当該分野で認識されており、治療的介入に対する応答のありそうなコース、および特に病気寛解、病気再発、腫瘍再発、転移、および死滅の尤度に関連する病気または病気進行のありそうなコースについての予測を含む。本発明のエクス・ビボ予後アッセイを用いて、候補対象の、特定の抗-腫瘍細胞抗原治療剤、または抗-腫瘍細胞抗原治療剤のクラスに対する応答を予測し、あるいはADCを調製することができる。「候補対象の応答を予測する」とは、問題とする対象が特定の抗-腫瘍細胞抗原治療剤との陽性または陰性結果を経験するであろう尤度を評価することを意図する。本発明の目的では、本発明のエクス・ビボ予後アッセイの関係において「陽性治療結果を示す」とは、候補対象が考慮中の抗-腫瘍細胞抗原治療剤での処置に応答して有益な結果を経験する増大した尤度を意味することを意図し、かくして、その抗-腫瘍細胞抗原治療剤との処置介入は証明されるであろう。対照的に、「陰性処置結果を示す」は、考慮中の抗-腫瘍細胞抗原治療剤との処置介入から利益を受けないであろう増大した尤度を意味することを意図し、かくして、その抗-腫瘍細胞抗原治療剤との処置介入は証明されないであろう。

20

【0129】

抗-腫瘍細胞抗原治療剤との処置的介入で達成することができる利益結果は、いずれかの要請治療応答を含む。癌処置に関連する「陽性治療応答」とは、抗-腫瘍細胞抗原治療剤の抗-腫瘍活性と関連する病気の改善、および/または注目する病気に関連する兆候の改善を意図する。すなわち、抗-増殖効果、さらなる腫瘍発芽後成長の予防、腫瘍サイズの低下、癌細胞の数の低下、および/または腫瘍細胞抗原-発現細胞の刺激によって媒介される1以上の兆候の増加を観察することができる。かくして、例えば、陽性治療的応答とは、病気における以下の改善：(1)腫瘍サイズの低下；(2)癌（すなわち、新形成）の細胞の数の低下；(3)新形成細胞死滅の増加；(4)新形成細胞生存の阻害；(4)腫瘍成長の阻害（すなわち、幾分の遅延、好ましくは停止）；(5)末梢器官への癌細胞浸潤の阻害（すなわち、幾分の遅延、好ましくは停止）；(6)腫瘍転移の阻害（すなわち、幾分の遅延、好ましくは停止）；(7)さらなる腫瘍発芽後成長の防止；(8)増大した患者生存率；および(9)癌に関連する1以上の兆候からの救済のある程度の1以上をいうであろう。いずれかの与えられた悪性疾患における陽性治療応答は、その悪性疾患に特異的な標準化された応答基準によって決定することができる。

30

40

【0130】

腫瘍応答は、磁気共鳴イメージング(MRI)走査、x-ラジオグラフィイメージング、コンピュータトモグラフィ(CT)走査、骨走査イメージング、内視鏡測定、および骨髄吸引(BMA)および循環における腫瘍細胞のカウンティングのようなスクリーニング技術を用いて腫瘍形態（すなわち、総じての腫瘍負荷、腫瘍サイズ等）の変化について評価することができる。これらの陽性治療応答に加えて、抗-腫瘍細胞抗原治療剤での療法を受けている対象は、病気に関連する兆候の改善の有益な効果を経験することがで

50

きる。かくして、B細胞腫瘍では、対象はいわゆるB兆候、すなわち、夜の発汗、発熱、体重喪失、および/または蕁麻疹の増加を経験することができる。前悪性疾患では、抗-腫瘍細胞抗原治療剤での療法は、関連する悪性疾患の発症前の時間をブロックし、および/または延長することができる。

#### 【0131】

いくつかの具体例において、本発明の方法で用いられるエクス・ピボ予後アッセイは、本明細書中で述べた抗-腫瘍細胞抗原治療剤での処置介入についての予後を必要とする候補対象からのテスト生物学的試料および対照生物学的試料を供し、ここに、テストおよび対照生物学的試料は、イン・ピボまたはエクス・ピボいずれかで、腫瘍細胞リガンドで刺激してきた腫瘍細胞抗原-発現新形成細胞を含み；テスト生物学的試料を、注目する抗-腫瘍細胞抗原治療剤の有効量と接触させ；このテスト生物学的試料中の少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを検出し、ここに、バイオマーカーは、注目する抗-腫瘍細胞抗原治療剤の作用の態様に依存して、細胞アポトーシスのバイオマーカー、および細胞生存のバイオマーカーからなる群より選択され；次いで、テスト生物学的試料中のバイオマーカーのレベルを、抗-腫瘍細胞抗原治療剤と接触させていない、対照生物学的試料中のバイオマーカーのレベルと比較することを含む。抗-腫瘍細胞抗原治療剤は、シグナリングをブロックし、またはそれと干渉し、またADCCを変調するアンタゴニストである場合、細胞増殖および生存、アポトーシス、およびシグナリングのこれらのバイオマーカーのいずれかまたは全てについての本明細書中に開示されたエクス・ピボ予後アッセイを用いて、単独で、あるいはシグナリングによってアップレギュレートされるサイトカインマーカーについてのアッセイ、および/または本明細書中に記載された腫瘍細胞抗原-関連因子の1以上についてのアッセイと組合せて、治療剤の潜在的有益な効果を評価して、その抗-腫瘍細胞抗原治療剤での処置に対して応答的である癌または前-悪性疾患を有する対象を同定することができる。抗-腫瘍細胞抗原治療剤が、ADCC活性の変調を介してその作用態様を有する場合、例えば、抗-腫瘍細胞抗原抗体、アポトーシスの1以上のマーカーについてのエクス・ピボ予後アッセイを用いて、単独で、あるいは本明細書中に記載された腫瘍細胞抗原-関連因子の1以上についてのアッセイと組合せて、治療剤の潜在的有益な効果を評価して、その抗-腫瘍細胞抗原治療剤での処置に応答性であろう癌または前-悪性疾患を有する対象を同定することができる。

10

20

30

#### 【0132】

本発明のエクス・ピボ予後アッセイによると、注目する抗-腫瘍細胞抗原治療剤と接触させたテスト生物学的試料中の、1以上のバイオマーカーおよび、所望により、1以上のサイトカインマーカーの発現レベルを、対照生物学的試料中のバイオマーカーおよび、所望により、サイトカインマーカーについての発現レベルと比較する。「テスト生物学的試料」は、候補対象から得られたCD40-発現新形成細胞を含む生物学的試料を意図し、これは、候補対象の処置について考慮中の抗-腫瘍細胞抗原治療剤と接触されるであろう。「対照生物学的試料」は、それもまたほぼ同一の数および周囲の腫瘍細胞抗原-発現新形成細胞を含み、同一タイムフレームにて、かつテスト生物学的試料を得るのに用いたのと同様な方法にて候補対象から得られた点で、テスト生物学的試料と匹敵し、かつテスト試料と同一の実験条件に付されたが、注目する抗-腫瘍細胞抗原治療剤と接触されない生物学的試料を意図する。テスト生物学的試料および対照生物学的試料は、対照から得られた単一生物学的試料から供することができ、かつその1つがテスト生物学的試料と命名され、そのもう1つが対照生物学的試料と命名されるサブ試料に分割することができる。あるいは、テスト生物学的試料および対照生物学的試料は、プールし、次いで、前記したサブ試料に細分することができ、あるいは個々にテストおよび対照生物学的試料を表すことができる2以上の生物学的試料から供することができる。

40

#### 【0133】

用語「細胞傷害性剤」とは、本明細書中で用いる場合、細胞の機能を阻害し、または妨げ、および/または細胞の破壊を引き起こす基質をいう。これらの剤は抗分裂剤、アルキル化剤、抗代謝産物、脈管形成阻害剤、アポトーシス剤、アルカロイド、COS-2阻

50

害性および抗生物質化合物、およびその組合せであってよい。該用語は放射性同位体（例えば、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{86}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、および $^{211}\text{At}$ ；他の放射性核種もまた診断および治療剤として利用することができ、特に、20～10,000keVのエネルギー範囲のもの）、化学治療剤、および小分子トキシン、またはその断片および/または変種を含めた、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素活性トキシンのようなトキシンを含むことを意図する。

#### 【0134】

「化学治療剤」は、癌の治療で有用な化学化合物である。化学治療剤の例はチオテパおよびサイクロスホスファミド（CYTOXAN.TM.）のようなアルキル化剤；ムスルファン、イムプロスルファンおよびピボスルファンのようなアルキルスルホネート；ベンゾドパ、カルボキオン、メツレドパ、およびウレドパのようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスファミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンを含めたエチレンイミンおよびメチルアメラミン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロルエタミン、メクロルエタミンオキサイド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネステリン、クレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラミムスチンのようなニトロソ尿素；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オトラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアミシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロムマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドトルピシン、6-ジアザ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ニクフェノール酸、ノガラマイシン、オリゴマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニゲリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、シノスタチン、ゾルピシンのような抗生物質；メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）のような抗-代謝産物；デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートのような葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、シアミプリン、チオグアニンのようなプリンアナログ；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスリジン、5-FUのようなピリミジンアナログ；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンのようなアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗-アドレナリン剤；フロリン酸のような葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルニチン；エリプチニウム酢酸；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；マイトクアゾン；マイトキサントロン；モピダモル；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメト；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK.RTM.；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジキオン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；マイトプロニトール；マイトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン、例えば、パクリタキセル（TAXOL.RTM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）およびドセタキセル（TAXOTERE.RTM., Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチンのような白金アナログ；ピンブラスチン；白金；エトボシド（V

10

20

30

40

50

P - 16) ; イフォスファミド ; マイトマイシン C ; マイトキサントロン ; ピンクリスチン ; ビノレルピン ; ナベルピン ; ノバントロン ; テニポシド ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; キセロラ ; イバンドロネート ; CPT - 11 ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイン酸 ; エスペラミシン ; カベシタピン ; および前記のいずれかの医薬上許容される塩、酸または誘導体を含む。また、この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性 4 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストン、およびトレニフェン (Fareston) を含めた項 - エストロゲンのような腫瘍に対するホルモン作用を調節し、または阻害するように作用する抗 - ホルモン剤 ; およびフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレシンのような抗 - アンドロゲン ; および前記のいずれかの医薬上許容される塩、酸または誘導体も含まれる。

10

## 【0135】

「抗 - 脈管形成剤」とは、血管の発達を幾分ブロックし、またはそれを干渉する化合物をいう。抗 - 脈管形成因子は、例えば、脈管形成の促進に關与する成長因子または成長因子受容体に結合する小分子または抗体であり得る。

## 【0136】

用語「サイトカイン」は、細胞間メディエーターとしてもう1つの細胞に作用する1つの細胞集団によって放出される蛋白質についての上位概念的用語である。そのようなサイトカインの例はリンホカイン、モノカイン、および伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンのような成長ホルモン ; 副甲状腺ホルモン ; チロキシン ; インスリン ; プロインスリン ; レラキシン ; プロレラキシン ; 濾胞刺激ホルモン (FSH) 、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 、および黄体ホルモン (LH) のような糖蛋白質ホルモン ; 肝臓成長因子 ; 繊維芽細胞成長因子 ; プロラクチン ; 胎盤ラクトーゲン ; 腫瘍壊死因子 - アルファおよび - ベータ ; ムレリアン - 阻害性物質 ; マウスゴナドトロピン - 関連ペプチド ; インヒピン ; アクチピン ; 血管内非成長因子 ; インテグリン ; トロンボポエチン (TPO) ; NGF - ベータのような神経成長因子 ; 血小板 - 成長因子 ; TGF - アルファおよび TGF - ベータのような形質転換成長因子 (TGF) ; インスリン - 様成長因子 - I および - II ; エリスロポエチン (EPO) ; 骨誘導因子 ; インターフェロン - アルファ、 - ベータ、および - ガンマのようなインターフェロン ; マクロファージ - CSF (M-CSF) のようなコロニー刺激因子 (CSF) ; 顆粒球 - マクロファージ - CSF (GM-CSF) ; および顆粒球 - CSF (G-CSF) ; IL - 1、IL - 1 アルファ、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12 のようなインターロイキン (IL) ; TNF - アルファまたは TNF - ベータのような腫瘍壊死因子 ; および LIF および キットリガンド (KL) を含めた他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書中で用いるように、用語サイトカインは天然源からのまたは組換え細胞培養からの蛋白質および天然配列サイトカインの生物学的に活性な同等物を含む。

20

30

## 【0137】

蛋白質またはヌクレオチドレベルにおける注目するバイオマーカーの検出は、当業者に公知のいずれかの検出方法を用いて達成することができる。「発現を検出する」または「のレベルを検出する」は、生物学的試料中のバイオマーカー蛋白質または遺伝子の量または存在を決定することを含む。かくして、「発現を検出する」は、バイオマーカーが発現されない、検出可能に発現されない、低レベルで発現される、正常なレベルで発現される、または過剰発現されると決定される場合を含む。抗 - 腫瘍細胞抗原治療剤の効果を決定するためには、腫瘍細胞抗原 - 発現新形成細胞を含むテスト生物学的試料を、治療剤が細胞応答を発揮するのを可能とするのに十分な時間の間、抗 - 腫瘍細胞抗原治療剤と接触させ、次いで、そのテスト生物学的試料中の注目する1以上のバイオマーカーの発現レベルを、抗 - 腫瘍細胞抗原治療剤と接触されなかった対照生物学的試料における発現レベルと

40

50

比較する。いくつかの具体例において、新形成細胞の対照生物学的試料を中性物質または陰性対照と接触させる。例えば、1つの具体例において、腫瘍細胞抗原に結合しない非-特異的免疫グロブリン、例えば、IgG1は陰性対照として働く。検出は、経時的にバイオマーカーの変化をモニターすることを可能とする時間に渡って起こり得る。また、検出は、異なる濃度の抗-腫瘍細胞抗原治療剤への曝露に伴って起こって、注目するいずれかの与えられたバイオマーカーについての(容量-応答曲線)を生じさせることができる。

【0138】

本発明出願で用いる用語「プロドラッグ」とは、親薬物と比較して腫瘍細胞に対して細胞傷害性が低く、酵素的に活性化され、またはより活性な親形態に変換され得る医薬上活性な物質の前駆体または誘導形態をいう。例えば、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) および Stellaら, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardら, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)。本発明のプロドラッグは、限定されるものではないが、ホスフェート-含有プロドラッグ、チオフォスフェート含有プロドラッグ、スルフェート-含有プロドラッグ、ペプチド-含有プロドラッグ、D-アミノ酸-修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ベータ-ラクタン-含有プロドラッグ、所望により置換されていてもよいフェノキシアセタミド-含有プロドラッグ、または所望により置換されていてもよいフェニルアセタミド-含有プロドラッグ、より活性な細胞傷害性遊離薬物に変換することができる5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。本発明で用いるプロドラッグ形態に誘導体化することができる細胞傷害性薬物の例は、限定されるものではないが、前記した化学治療剤を含む。

10

20

【0139】

「リポソーム」は、(本明細書中に開示された抗-腫瘍細胞抗原抗体および、所望により、化学治療剤のような)薬物の哺乳動物への送達で有用な種々のタイプの脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成される小胞である。リポソームの成分は、生物学的膜の脂質配置と同様に、通常、二層形成に配置される。

30

【0140】

用語「添付文書」は、治療剤製品の使用に関する適応症、用法、用量、投与、禁忌および/または警告に関する情報を含む、治療剤製品の商業的パッケージに慣用的に含まれた指示書をいうのに用いられる。

【0141】

「単離された」核酸分子は、それが通常は抗体核酸の天然源に関連する少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され、分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、それが天然で見出される形態または状況における以外のものである。従って、単離された核酸分子は、それが天然細胞に存在する場合の核酸分子から区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、通常は、例えば、核酸分子が天然細胞とそれとは異なる染色体位置にある場合、抗体を発現する細胞に含まれた核酸分子を含む。

40

【0142】

表現「対照配列」とは、特定の宿主生物における操作可能に連結されたコーディング配列の発現に必要なDNA配列をいう。原核生物に適した対照配列は、例えば、プロモーター、所望によりオペレーター配列、およびリポソーム結合部位を含む。原核生物細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【0143】

核酸は、それがもう1つの核酸配列と機能的な関係に入った場合に「操作可能に連結されている」。例えば、プレ配列または分泌リーダーについてのDNAは、もしそれがポリ

50

ペプチドの分泌に参画するプレ蛋白質として発現されるならば、ポリペプチドに対するDNAに操作可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響するならば、コーディング配列に操作可能に連結されており；あるいはリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように位置するならば、コーディング配列に操作可能に連結されている。一般に、「操作可能に連結された」は、連結されているDNA配列は連続的であり、分泌リーダーの場合には、連続的かつリーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続的である必要はない。連結は、便宜な制限部位における連結によって達成される。もしそのような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは慣用的なプラクティスに従って用いられる。

#### 【0144】

本明細書中で用いるように、表現「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養」は、相互交換可能に用いられ、全てのそのような命名は子孫を含む。かくして、用語「形質転換体」および「形質転換された細胞」は、導入の数に関することなくそれから誘導された一次対象細胞および培養を含む。また、全ての子孫は、慎重なまたは不意の突然変異のため、DNA含有量が正確に同一でなくてもよいと理解される。元来形質転換された細胞において分泌されるのと同じの機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫が含まれる。区別される命名が意図される場合、それは文脈から明らかであろう。

#### 【0145】

##### II. 腫瘍細胞抗原のアゴニストまたはアンタゴニストについてのスクリーニング

アンタゴニストについてアッセイするには、腫瘍細胞抗原は、特定の抗体についてスクリーニングされるべき化合物と一緒に細胞に加えることができ、腫瘍細胞抗原の存在下において注目する活性を阻害する化合物の能力は、化合物が腫瘍細胞抗原に対してアンタゴニストであることを示す。別法として、アンタゴニストは、腫瘍細胞抗原および潜在的なアンタゴニストを、競合阻害アッセイについての適当な条件下で膜-結合腫瘍細胞抗原受容体または組換え受容体と組み合わせることによって検出することができる。腫瘍細胞抗原は、受容体に結合した腫瘍細胞抗原分子の数を用いて、潜在的アンタゴニストの有効性を決定することができるように、放射能によるなどして標識することができる。受容体をコードする遺伝子は、当業者に知られた多数の方法、例えば、リガンドバニングおよびFACSソーティングによって同定することができる。Coliganら、*Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが使用され、ポリアデニル化RNAは腫瘍細胞抗原に対して応答性の細胞から調製され、このRNAから作り出されたcDNAライブラリーをプールに分割し、それを用いて、腫瘍細胞抗原に対して応答性でないCOA細胞または他の細胞をトランスフェクトする。スライドガラス上で成長させるトランスフェクトされた細胞を、標識された腫瘍細胞抗原に曝露する。腫瘍細胞抗原は、ヨウ素化、あるいは部位-特異的プロテインキナーゼについての認識部位を含めることを包含する、種々の手段によって標識することができる。固定およびインキュベーションに続いて、スライドをオートラジオグラフィ分析に付す。陽性プールが同定され、サブ-プールを調製し、相互作用サブ-プーリングおよび再-スクリーニングプロセスを用いて再度トランスフェクトされ、結局は、推定受容体をコードする単一クローンが得られる。

#### 【0146】

受容体同定に対する代替アプローチとして、標識された腫瘍細胞抗原は、受容体分子を発現する細胞膜または抽出物調製物と光アフィニティー-連結させることができる。架橋された物資はPAGEによって解像され、X-線フィルムに曝露される。受容体を含む標識された複合体を切り出し、ペプチド断片に解像し、蛋白質マイクロ-配列決定に付される。マイクロ配列決定から得られたアミノ酸配列を用いて、変性オリゴヌクレオチドプローブの組を設計して、cDNAライブラリーをスクリーニングして推定受容体をコードする遺伝子を同定する。

#### 【0147】

アンタゴニストについてのもう1つのアッセイにおいて、受容体を発現する哺乳動物細

10

20

30

40

50

胞または膜調製物を、候補化合物の存在下で標識された腫瘍細胞抗原と共にインキュベートする。次いで、この相互作用を増強させるまたはブロックする化合物の能力を測定することができる。

【0148】

潜在的アンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンと腫瘍細胞抗原との融合に結合するオリゴヌクレオチド、および特に、限定されるものではないが、ポリ-およびモノクローナル抗体および抗体断片、単一鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、およびそのような抗体または断片のキメラまたはヒト化バージョン、ならびにヒト抗体および抗体断片を含めた抗体を含む。別法として、潜在的なアンタゴニストは密接に関連した蛋白質、例えば、受容体を認識するが、効果を付与せず、それにより、腫瘍細胞抗原の作用を競合的に阻害する、腫瘍細胞抗原の突然変異した形態であり得る。

10

【0149】

もう1つの潜在的腫瘍細胞抗原アンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNAまたはDNA構築体であり、ここに、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子は、標的化されたmRNAにハイブリダイズし、蛋白質翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接的にブロックするように作用する。アンチセンス技術を用いて、三重-ラセン形成またはアンチセンスDNAまたはRNAを介して遺伝子発現を制御することができ、その方法の双方は、ポリヌクレオチドのDNAまたはRNAへの結合に基づく。例えば、成熟腫瘍細胞抗原を本明細書中においてコードするポリヌクレオチド配列の5'コーディング部分を用いて、長さが約10~40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域(三重ラセン Leeら、Nucl. Acids Res., 6:3073(1979); Cooneyら、Science, 241:456(1988); Der vanら、Science, 251:1360(1991)参照)に対して相補的であり、それにより、腫瘍細胞抗原の転写および生産を妨げるように設計される。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはイン・ビボでmRNAでハイブリダイズし、mRNA分子の腫瘍細胞抗原への翻訳をブロックする(アンチセンス-Okano, Neurochem., 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, Fla., 1988))。前記したオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAまたはDNAをイン・ビボで発現させて、腫瘍細胞抗原の生産を阻害することができるように、細胞に送達することもできる。アンチセンスDNAを用いる場合、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10および+10位置の間の、翻訳-開始部位から由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

20

30

【0150】

腫瘍細胞抗原拮抗作用のもう1つの方法はsiRNA技術の使用であり、ここでは、一本鎖小干渉性RNA(sRNA:長さが19~29ヌクレオチド)を用いて、遺伝子を沈黙させ、ここに、siRNAは標的抗原のmRNAの切断をガイドするように働く(Martinezら、Cell(2002)110(5):563-74参照)。

【0151】

潜在的なアンタゴニストは活性部位に結合する小分子、受容体結合部位、または腫瘍細胞抗原の成長因子、または他の関連結合部位に結合し、それにより、腫瘍細胞抗原の正常な生物学的活性をブロックする小分子を含む。小分子の例は、限定されるものではないが、小ペプチド、またはペプチド-様分子、好ましくは、可溶性ペプチド、および合成非-ペプチジル有機または無機化合物を含む。

40

【0152】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列-特異的ハイブリダイゼーション、続いてのエンドヌクレオ分解放切断によって作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、公知の技術によって同定することができる。さらなる詳細については、例えば、(

50

1997年9月18日に公表された) Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994), およびPCT公開番号WO 97/133551参照。

【0153】

転写を阻害するのに用いられる三重-ラセン形成における核酸分子は一本鎖であって、デオキシヌクレオチドから構成されているべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成物は、それが、一般には、デュプレックスの1つのストランド上のプリンまたはピリミジンのサイズ調製可能ストレッチを必要とするHoogsteen塩基-対合規則を介して三重-ラセン形成を促進するように設計される。さらなる詳細については、例えば、PCT公開番号WO 97/133551, supra参照。

【0154】

これらの小分子は、前記で議論したスクリーニングアッセイのいずれかの1以上によって、および/または当業者によく知られたいずれかの他のスクリーニング技術によって同定することができる。

【0155】

III. 抗-腫瘍細胞抗原抗体の生産

記載は、本発明に従って用いる抗体の生産のための例示的技術に従う。抗体の生産で用いるべき腫瘍細胞抗原は、例えば、所望のエピトープを含有する、腫瘍細胞抗原の細胞外ドメインの可溶性形態、またはその部分であってよい。別法として、それらの細胞表面における腫瘍細胞抗原を発現する細胞を用いて、抗体を生じさせることができる。もう1つの具体例において、腫瘍細胞抗原をコードする遺伝子を用いるDNA-ベースの免疫化を用いて、抗体を生じさせることができる(Ramos J. D. A et al Allergy, Volume 59, Number 5, May 2004, pp. 539-547 (9)参照)。抗体を生じさせるのに有用な腫瘍細胞抗原の他の形態は当業者に明らかであろう。

【0156】

(i) ポリクローナル抗体

抗-腫瘍細胞抗原抗体はポリクローナル抗体を含むことができる。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に知られている。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫化剤および、所望であれば、アジュバントの1以上の注射によって哺乳動物において生起させることができる。典型的には、免疫化剤および/またはアジュバントは、多数の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射されるであろう。免疫化剤は、腫瘍細胞抗原またはその融合蛋白質を含むことができる。免疫化剤を、免疫化すべき哺乳動物において免疫原性であることが知られている蛋白質に結合体化するのには有用であろう。そのような免疫原性蛋白質の例は、限定されるものではないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、および大豆トリプシン阻害剤を含む。使用することができるアジュバントの例はフロイントの完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコルノミコレート)を含む。免疫化プロトコルは、過度な実験なくして当業者によって選択され得る。

【0157】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナルは実質的に均質な抗体の集団から得られたものであり、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、微量に存在し得る可能な天然に生じる突然変異を除いて同一である。かくして、修飾語「モノクローナル」は、区別される抗体の混合物ではない抗体の特徴を示す。

【0158】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975)によって記載されたもののようなハイブリドーマ方法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ方法においては、マウス、ハムスター、または他の適当な宿主動物は、典型的には、免疫化剤で免疫化して、免疫化剤に特異的に結合するであろう抗体を生産し、または生産することができるリンパ球を誘導する。別法として、

10

20

30

40

50

リンパ球はイン・ビトロにて免疫化することができる。

【0159】

免疫化剤は、典型的には、腫瘍細胞抗原ポリペプチドまたはその融合蛋白質を含む。一般に、末梢血液リンパ球（「PBL」）は、もしヒト起源の細胞が望まれるならば用いられ、あるいはもし非-ヒト哺乳動物源が望まれるならば、脾臓細胞またはリンパ節細胞が用いられる。次いで、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用い、リンパ球を不滅化細胞系と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する「Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103」。不滅化細胞系は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスミエローマ細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない不滅化細胞の成長または生存を阻害する1以上の物質を含有する適当な培養基中で培養することができる。例えば、もし親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR TまたはHPR<sup>T M</sup>）を欠如するならば、ハイブリドーマ培養基は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテン、およびチミジン（「HAT培地」）を含む、その物質はHGPR T-欠乏細胞の成長を妨げる。

10

【0160】

好ましい不滅化細胞系は、効果的に融合し、選択された抗体-生産細胞による抗体の安定な高レベル発現を支持し、かつHAT培地のような培地に対して感受性であるものである。より好ましい不滅化細胞系は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. および the American Type Culture Collection, Manassas, Va. から得ることができるネズミミエローマ系である。ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系もまた、ヒトモノクローナル抗体の生産について記載されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

20

【0161】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養基を、次いで、腫瘍細胞抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈澱によってあるいはラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素-結合免疫吸着検定法（ELISA）のようなイン・ビトロ結合アッセイによって決定される。そのような技術およびアッセイは当該分野で知られている。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスカチャード分析によって決定することができる。

30

【0162】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような慣用的な免疫グロブリン精製手法によって培養基または腹水液から単離し、または精製することができる。

40

【0163】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されたもののような組換えDNA方法によって作製することもできる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）慣用的な手法を用いて容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい源として働く。一旦単離されたならば、DNAを発現ベクターに入れ

50

ることができ、次いで、これをサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、あるいはそうでなければ免疫グロブリン蛋白質を生産しないミエローマ細胞のような宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得ることができる。DNAは、例えば、非-免疫グロブリンポリペプチドについてのコーディング配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコーディング配列に共有結合連結させることによって相同ネズミ配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインについてコーディング配列を置換することによって修飾することができる「米国特許第4,816,567号；Morrisson et al.」。そのような非-免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインの代わりに置換することができるか、あるいは本発明の抗体の1つの抗原-組合せ部位の可変ドメインの代わりに置換して、キメラ二価抗体を作製することができる。

10

## 【0164】

抗体は一価抗体であってよい。一価抗体を調製するための方法は当該分野で良く知られている。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、一般には、Fc領域中のいずれかの地点で切形されて、重鎖架橋を妨げる。別法として、関連システイン残基をもう1つのアミノ酸残基で置換するか、あるいは欠失して、架橋を妨げる。

## 【0165】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは限界希釈方法によってサブクローンし、標準的な方法によって成長させることができる [ Goding, supra ]。この目的での適当な培養基は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびRPMI-1640培地を含む。別法として、ハイブリドーマ細胞を哺乳動物において腹水としてイン・ピボで成長させることができる。ハイブリドーマ細胞が成長している培養基を、抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の生産についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈澱によって、あるいはラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素-結合免疫吸着検定法（ELISA）のようなイン・ピボ結合アッセイによって決定される。所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈方法によってクローンをサブクローンすることができ、標準的な方法によって成長させることができる ( Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 ( Academic Press, 1986 ) )。この目的のための適当な培養基は、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞を哺乳動物において腹水腫瘍としてイン・ピボで成長させることができる。

20

30

## 【0166】

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

## 【0167】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような慣用的な抗体精製手法によって培養基、腹水、または血清から適切に分離される。

40

## 【0168】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）慣用的な手法を用いて容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい源として働く。一旦単離されれば、DNAは発現ベクターに入れることができ、次いで、これをE. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または抗体蛋白質をそうでなければ生産しないミエ

50

ローマ細胞のような宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現についてのレビュー論文はSkerraら、*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 - 262 (1993)およびPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 - 188 (1992)を含む。

【0169】

さらなる具体例において、McCaffertyら、*Nature*, 348: 552 - 554 (1990)に記載された技術を用いて生じた抗体ファージライブラリーから、モノクローナル抗体または抗体断片を単離することができる。Clacksonら、*Nature*, 352: 624 - 628 (1991)およびMarksら、*J. Mol. Biol.*, 222: 581 - 597 (1991)は、各々、ファージライブラリーを用い、ネズミおよびヒト抗体の単離を記載する。引き続いての公表は、鎖シャフリング(Marksら、*Bio/Technology*, 10: 779 - 783 (1992))による高親和性(nM範囲)ヒト抗体の生産、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびイン・ビボ組合せ(Waterhouseら、*Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265 - 2266 (1993))を記載する。かくして、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマに対する生きた代替法である。

10

【0170】

DNAは、例えば、相同ネズミ配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインについてのコーディング配列で置換えることによって(米国特許第4,816,567号;およびMorrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984))、あるいは非-免疫グロブリンポリペプチドについてのコーディング配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコーディング配列に共有結合を連結することによって修飾することができる。

20

【0171】

典型的には、そのような非-免疫グロブリンポリペプチドは抗体の定常ドメインに代えて置換されるか、あるいはそれらは抗体の1つの抗原-組合せ部位の変域ドメインに代えて置換して、抗原に対する特異性を有する1つの抗原-組合せ部位、および異なる抗原に対する特異性を有するもう1つの抗原-組合せ部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

30

【0172】

(iii) ヒト化抗体

本発明の抗-腫瘍細胞抗原抗体は、さらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含むことができる。非-ヒト(例えば、ネズミ)抗体、のヒト化形態はキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、あるいは非-ヒト免疫グロブリンから由来する最小配列を含有する(Fv、Fab、Fab'、F(ab'))<sup>2</sup>または抗体の他の抗原-結合サブ配列のような)その断片である。ヒト化抗体は、受容体の相補性決定領域(CDR)からの残基は、所望の特異性、親和性および容量を有するマウス、ラットまたはウサギのような非-ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基によって置換えられているヒト免疫グロブリン(受容体抗体)を含む。いくつかの場合においては、ヒト免疫グロブリンFvフレームワーク残基は、対応する非-ヒト残基によって置換えられる。ヒト化抗体は、受容体抗体において、または輸入されたCDRまたはフレームワーク配列において見出されない残基も含むことができる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そこでは、CDR領域の全てまたは実質的に全ては非-ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも部分、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含むであろう[Jonesら、*Nature*, 321: 522 - 525 (1986); Riechmannら、*Nature*, 332: 323 - 329 (1988); およびPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593 - 596 (1992)]。

40

50

## 【0173】

非-ヒト抗体をヒト化する方法は当該分野で記載されている。一般に、ヒト化抗体は、非-ヒトである源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非-ヒトアミノ酸残基は、しばしば、残基を「輸入する」といい、これは、典型的には、「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に代えて超可変領域配列で置換えることによって、Winterおよび共同研究者の方法(Jonesら、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536(1988))に従って実質的に行うことができる。従って、そのような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり米国特許第4,816,567号、そこでは、無傷ヒト可変ドメインより実質的に未満は、非-ヒト種からの対応する配列によって置換えられている。現実には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基および、恐らくは、いくつかのFR残基がげっ歯類抗体において同様の部位からの残基によって置換えられたヒト抗体である。

10

## 【0174】

ヒト化抗体を作製するのに用いるべきヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖双方)の選択は、抗原性を低下させるのに非常に重要である。いわゆる「ベスト-フィット」方法に従い、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変-ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類のそれに最も近いヒト配列は、ヒト化抗体についてヒトフレームワーク領域(FR)として許容される(Simsら、J. Immunol., 151:2296(1993); Chothiaら、J. Mol. Biol., 196:901(1987))。もう1つの方法は、軽鎖または重鎖の特定の亜群の全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特別なフレームワーク領域を用いる。同一のフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体で用いることができる(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Prestaら、J. Immunol., 151:2623(1993))。

20

## 【0175】

抗体が、抗原に対する高い親和性、および他の好都合な生物学的特性を維持しつつヒト化されるのはさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親およびヒト化配列の三次元モデルを用い、親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析のプロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは通常入手でき、当業者が精通している。選択された候補免疫グロブリン配列の可能な三次元立体配座構造を示し、表示するコンピュータプログラムが入手可能である。これらの表示の精査は、候補免疫グロブリン配列の機能発揮における残基のありそうな役割の分析、すなわち、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響する残基の分析を可能とする。このように、標的抗原に対する増大した親和性のような所望の抗体特徴が達成されるように、FR残基は受容体および輸入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合の影響に直接的かつほとんど実質的に関与する。

30

## 【0176】

抗体ヒト化の代替方法は、異種の種に関する抗体の免疫原性を低下させつつ、抗原についてのドメインの天然親和性を減少することなく修飾することができる抗体可変ドメイン中のアミノ酸の同定に依拠する。修飾されるアミノ酸は、抗原結合に対して臨界的ではないが、免疫原性-刺激因子に曝露することができるものである(例えば、WO931179)。

40

## 【0177】

抗体は、前記した公知の選択および/または突然変異誘発方法を用いてアフィニティー突然変異させることもできる。好ましいアフィニティー突然変異抗体は、突然変異した抗体がそれから調製される出発抗体(一般に、ネズミ、ヒト化またはヒト)の5倍、より好ましくは10倍、なおより好ましくは20または30倍大きな親和性を有する。

## 【0178】

50

ヒト化抗体または親和性突然変異抗体の種々の形態が考えられ、例えば、ヒト化抗体または親和性突然変異抗体は、所望により、1以上の細胞傷害性剤と結合体化して、免疫結合体を生じさせるFabのような抗体断片であってよい。別法として、ヒト化抗体またはアフィニティー突然変異抗体は無傷IgG1抗体のような無傷抗体であってよい。

【0179】

(iv) ヒト抗体

ヒト化に対する代替法として、ヒト抗体を生じさせることができる。今日、ヒト化に際して、内因性免疫グロブリンの生産不存在下でヒト抗体の十分なレパートリーを生産することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を生産するのが可能である。例えば、キメラおよび生殖系突然変異体マウスにおける抗体重鎖接合領域( $J_H$ )遺伝子のホモ接合性欠失の結果、内因性抗体生産の完全な阻害がもたらされる。ヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子のそのような生殖系突然変異体マウスの導入の結果、抗原挑戦に際してヒト抗体の生産がもたらされるであろう。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovitsら、Nature, 362:255-258(1993); Bruggermannら、Year in Immunol., 7:33(1993); および米国特許第5,591,669号、第5,589,369号、および第5,545,807号参照。

10

【0180】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCaffertyら、Nature 348:552-553(1990))を用いて、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体および抗体断片をイン・ビトロで生産することができる。この技術に従い、抗体Vドメイン遺伝子が、M13またはfdのようなフィラメント状バクテリオファージの主なまたは従たるコート蛋白質遺伝子いずれかにイン・フレームクローン化され、ファージ粒子の表面に機能的抗体断片として提示される。フィラメント状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有する故に、抗体の機能的特性に基づく選択の結果、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらされる。かくして、ファージはB-細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは種々の様式で行うことができる;それらのレビューについては、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)参照。V-遺伝子セグメントのいくつかの源をファージディスプレイで用いることができる。Clacksonら、Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化マウスの脾臓から由来するV遺伝子の小さなランダムなコンビナトリアルライブラリーから抗-オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。未免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築し、(自己-抗原を含めた)抗原の多様なアレイに対する抗体は、Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991), またはGiffithら、EMBO J. 12:725-734(1993)によって記載された技術に実質的に従って単離することができる。また、米国特許第5,565,332号および第5,573,905号参照。

20

30

【0181】

前記で議論したように、ヒト抗体はイン・ビトロ活性化B細胞によって生じさせることもできる(米国特許第5,567,610号および第5,229,275号参照)。

40

【0182】

(v) 抗体断片

種々の技術が、抗体断片の生産のために開発されてきた。伝統的には、これらの断片は無傷抗体の蛋白質分解消化を介して誘導された(例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992); およびBrennanら、Science, 229:81(1985)参照)。しかしながら、これらの断片は組換え宿主細胞によって今日では直接的に生産することができる。例えば、抗体断片は、先に議論した抗体ファ

50

ージライブラリーから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片はE.coliから直接的に回収することができ、化学的にカップリングして、F(ab')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992))。もう1つのアプローチに従うと、F(ab')<sub>2</sub>断片は組換え宿主細胞培養から直接的に単離することができる。抗体断片の生産のための他の技術は当業者にとって明らかであろう。他の具体例において、選択する抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。WO 93/16185; 米国特許第5,571,894号; および米国特許第5,587,458号参照。抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載された、例えば、「線状抗体」であってもよい。そのような線状抗体断片は一特異的または二特異的であってよい。

10

## 【0183】

結合ドメイン-免疫グロブリン融合蛋白質も考えられる。これらの構築体において、抗体ヒンジ領域に融合した注目する抗原に対する結合ドメイン、およびジスルフィド-連続マルチマーを形成する損なわれた能力のため圧倒的にモノマーとして存在しつつ、ADCおよび/またはCDCが可能な免疫グロブリンCH<sub>2</sub>およびCH<sub>3</sub>ドメインを含む融合蛋白質が構築される(US 20030118592参照)。これらの融合蛋白質は、組換えにより高いレベルで生産することができる。

## 【0184】

## (vi) 二特異性抗体

二特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二特異性抗体は、腫瘍抗原蛋白質の2つの異なるエピトープに結合することができる。別法として、抗-腫瘍細胞抗原アームは、T-細胞受容体分子(例えば、CD2またはCD3)のような白血球、またはFcガンマRI(CD64)、FcガンマRII(CD32)およびFcガンマRIII(CD16)のようなIgGに対するFc受容体(FcガンマR)上のトリガリング分子に結合するアームと組合せて、腫瘍抗原-発現細胞に対する細胞防御メカニズムに焦点を合わせることができる。二特異性抗体を用いて、腫瘍抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性剤を局所化することもできる。これらの抗体は腫瘍抗原-結合アーム、および細胞傷害性剤(例えば、サポリン、抗-インターフェロン-アルファ、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセートまたは放射性同位体ハプテン)に結合するアームを保有する。二特異性抗体は、全長抗体または抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二特異性抗体)として調製することができる。

20

30

## 【0185】

二特異性抗体を作製する方法は当該分野で知られている。全長二特異性抗体の伝統的な生産は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、そこでは、2つの鎖は異なる特異性を有する(Millsteinら、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類のため、これらのハイブリドーマ(クワドローマ)は、そのうち1つのみが正しい二特異的構造を有する10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じる。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる正しい分子の精製はむしろわずらわしく、生成物収率は低い。同様な手法がWO 93/08829、およびTraunckerら、EMBO J., 10:3655-3659(1991)に開示されている。

40

## 【0186】

所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメイン(抗体-抗原組合せ部位)は、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合される。融合は、好ましくは、少なくともヒンジの部分、CH<sub>2</sub>、およびCH<sub>3</sub>領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。融合の少なくとも1つの存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域(CH<sub>1</sub>)を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合および、もし所望であれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に共トランスフェクトする。二特異性抗体を生じさせるさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210(1986)

50

参照。

【0187】

WO 96/27011に記載されたもう1つのアプローチによると、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するように作製することができる。好ましい界面は、少なくとも、抗体定常ドメインのCH3領域の一部を含む。この方法においては、第一の抗体分子の界面からの1以上の小さなアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換えられている。大きな側鎖に対して同一または同様なサイズの補償的「キャビティ」が、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置換えることによって第二の抗体分子の界面に作り出される。これは、ホモダイマーのような他の望まない最終-産物よりもヘテロダイマーの収率を増大させるメカニズムを供する。

10

【0188】

二特異性抗体は架橋されたまたは「ヘテロ結合体」抗体を含む。ヘテロ結合体抗体は2つの共有結合連結抗体から構成される。そのような抗体は、例えば、望まない細胞に対する（米国特許第4,676,980号、およびHIV感染の治療のために（WO 91/00360、WO 92/200373、およびEP 03089）免疫系細胞を標的化することを提案している。抗体は、架橋剤に関連するものを含めた、合成蛋白質化学における公知の方法を用いてイン・ビトロで調製できると考えられる。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を用い、またはチオエーテル結合を形成することによって構築してもよい。この蛋白質のための適当な試薬の例は、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、および例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものを含む。

20

【0189】

二特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えば、 $F(ab')_2$  二特異性抗体）として調製することができる。抗体断片から二特異性抗体を生じさせるための技術もまた文献に記載されている。例えば、二特異性抗体は化学結合を用いて調製することができる。Brennanら、Science, 229:81(1985)は、無傷抗体を蛋白質分解により切断して、 $F(ab')_2$ 断片を生じさせる手法を記載する。これらの断片は、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で低下して、隣接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を妨げる。次いで、生じたFab'断片をチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、Fab'-TNB誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-チオールに再度変換され、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合して、二特異性抗体を形成する。生じた二特異性抗体を酵素の選択的免疫化のための剤として用いることができる。

30

【0190】

Fab'-SH断片は、E.coliから直接的に回収することができ、これは、化学的にカップリングさせて、二特異性抗体を形成することができる。Shalabyら、J. Exp. Med., 175:217-225(1992)は、十分にヒト化された二特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の生産を記載する。各Fab'断片はE.coliから別々に分泌され、イン・ビトロにて指向性化学カップリングに付されて、二特異性抗体を形成した。各形成された二特異性抗体は、ErbB2受容体を過剰発現する細胞、および正常なヒトT細胞に結合することができ、ならびに、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性をトリガーすることができた。

40

【0191】

組換え細胞培養から二特異性抗体断片を直接的に作製し、単離するための種々の技術もまた記載されてきた。例えば、二特異性抗体はロイシンジッパーを用いて生産されてきた。Kostelnyら、J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)。FosおよびJun蛋白質からのロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に連結した。抗体ホモダイマーをヒンジ領域において還元して、モノマーを形成し、次いで再度酸化して、抗体ヘテロダイマーを形成した

50

。この方法は抗体ホモダイマーの生産のために利用することもできる。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) によって記載された「ダイアボディ」技術は、二特異性抗体断片を作製するための別のメカニズムを提供している。断片は、同一鎖上の2つのドメインの間の対合を可能とするには余りにも短いリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に連結された重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む。従って、1つの断片のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインはもう1つの断片の相補的V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインと対合させられ、それにより、2つの抗原-結合部位を形成する。単一鎖Fv(sFv)ダイマーの使用によって二特異性抗体断片を作製するためのもう1つの戦略も報告されている。Gruberら、J. Immunol., 152: 5368 (1994) 参照。

10

## 【0192】

2を超える価数を持つ抗体が考えられる。例えば、三特異的抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991)

例示的な二特異性抗体は、ここに、与えられた腫瘍細胞抗原ポリペプチド上の2つの異なるエピトープに結合することができる。別法として、抗-腫瘍細胞抗原アームは、T-細胞受容体分子(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)のような白血球、またはFCRI(CD64)、FCRII(CD32)およびFCRIII(CD16)のようなIgG(FCR)に対するFc受容体上のトリガリング分子に結合するアームと組合せて、特定の腫瘍細胞抗原を発現する細胞に対する細胞防御メカニズムに集中することができる。二特異性抗体を用いて、特定の腫瘍細胞抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性剤を局所化することもできる。これらの抗体は腫瘍細胞抗原-結合アーム、およびEOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETAのような、細胞傷害性剤または放射性核種キレーターに結合するアームを保有する。注目するもう1つの二特異性抗体は腫瘍細胞抗原に結合し、さらに、組織因子(TF)に結合する。

20

## 【0193】

(vii) 他のアミノ酸配列修飾

本明細書中に記載された抗-腫瘍細胞抗原抗体のアミノ酸配列の修飾が考えられる。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改良するのが望ましいであろう。抗-腫瘍細胞抗原抗体のアミノ酸配列変種は、適当なヌクレオチドの変化を抗-腫瘍細胞抗原抗体核酸に導入することによって、あるいはペプチド合成によって調製される。そのような修飾は、例えば、抗-腫瘍細胞抗原抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはそれへの挿入、および/またはその置換を含む。欠失、挿入、および置換のいずれの組合せも、最終構築体に到達するようになされ、但し、最終構築体は所望の特徴を保有することを条件とする。アミノ酸の変化は、グリコシル化部位の数または位置の変更のような、抗-腫瘍細胞抗原抗体の翻訳後プロセッシングを改変することもできる。

30

## 【0194】

突然変異誘発のための好ましい位置である抗-腫瘍細胞抗原抗体のある種の残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244: 1081 - 1085 (1989) によって記載されたように「アラニン走査突然変異誘発」と呼ばれる。ここに、残基または標的残基の群が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、およびgluのような荷電残基)、中性または負に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)によって置換えて、腫瘍細胞抗原とアミノ酸との相互作用に影響させる。次いで、置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置を、置換の部位における、またはそのためのさらなるまたは他の変種を導入することによって改良する。かくして、アミノ酸配列変動を導入するための部位を予め決定しつつ、突然変異の性質は、それ自体予め決定する必要がない。例えば、与えられた部位における突然変異の性能を分析するために、ala走査またはランダム突然変異誘発は標的コドンまたは領域で行い、発現された抗-腫瘍細胞抗体変種を所望の活性についてスクリーニングする。

40

## 【0195】

50

アミノ酸配列挿入は、1つの残基、ないし100以上の残基を含有するポリペプチドの長さの範囲であるアミノ-および/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗-腫瘍細胞抗原抗体、または細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗-腫瘍細胞抗原抗体分子の他の挿入変種は、(例えば、ADEPTのための)酵素に対する抗-腫瘍細胞抗原抗体のN-またはC-末端への融合、または抗体の血清中半減期を増加させるポリペプチドを含む。

## 【0196】

もう1つのタイプの変種はアミノ酸置換の変種である。これらの変種は、異なる残基によって置換えられた抗-腫瘍細胞抗原抗体分子において少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異誘発のための最も興味がある部位は超可変領域を含むが、FR改変も考えられる。保存的な置換を、「好ましい置換」の見出しのもとに表1に示す。もしそのような置換の結果、生物学的活性が変化すれば、表1に「例示的な置換」で示された、あるいはアミノ酸クラスへの参照においてさらに以下に記載されたようなより実質的な変化を導入し、産物をスクリーニングすることができる。

## 【0197】

## 【表1】

表 1

元来の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノロイシン	leu
Leu (L)	ノロイシン ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノロイシン	leu

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a)例えば、シートまたはラセン立体配座としての、置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖の嵩の維持に対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に生じる残基が、共通の側鎖特性に基づいてグループに分けられる。

## 【0198】

- 1) 疎水性: ノロイシン、met、ala、val、leu、ile;
- 2) 中性親水性: cys、ser、thr;

10

20

30

40

50

- 3) 酸性: asp、glu;
- 4) 塩基性: asn、gln、his、lys、arg;
- 5) 鎖の向きに影響する残基: gly、pro; および
- 6) 芳香族: trp、tyr、phe。

## 【0199】

非 - 保存的置換は、もう1つのクラスに代えてこれらのクラスの1つのメンバーを交換することを含むであろう。

## 【0200】

そのような実質的残基は、保存的置換部位、またはより好ましくは、残存する(非 - 保存的)部位に導入してもよい。

## 【0201】

抗 - 腫瘍細胞抗原抗体の適切な立体配座の維持に関与しないいずれのシステイン残基も一般には、セリンで置換して、分子の酸化的安定性を改良し、および異常な架橋を妨げることもできる。逆にシステイン結合を抗体に加えて、(特に、抗体がFv断片のような抗体断片である場合に)その安定性を改良することができる。

## 【0202】

特に好ましいタイプの置換変種は、親抗体(例えば、ヒト化またはヒト抗体)の1以上の超可変領域の残基を置換することを含む。一般には、さらなる開発のために選択された得られた変種は、それからそれらが生じる親抗体に対して改良された生物学的特性を有するであろう。そのような置換変種を生じさせるための便宜な方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟を用いる。簡単に述べれば、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7の部位)を突然変異させて、各部位において全ての可能なアミノ置換を生じさせる。かく生じた抗体変種を、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物に対する融合としてフィラメント状ファージ粒子から一価様式で表示される。ファージ - 表示変種を、次いで、本明細書中に開示されたように、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。修飾のための超可変領域部位を同定するためには、アラニン走査突然変異誘発を行って、抗原結合に対して有意に貢献する超可変領域残基を同定することができる。別法としてまたは加えて、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体およびヒト腫瘍細胞抗原の間の接触点を同定するのが有益であろう。そのような接触残基および隣接する残基は、本明細書中で工夫された技術に従って置換のための候補である。一旦そのような変種が生じたならば、変種のパネルを本明細書中に記載されたようにスクリーニングに付し、1以上の関連アッセイにおける優れた特性を持つ抗体をさらなる開発のために選択することができる。

## 【0203】

抗体のもう1つのタイプのアミノ酸変種は、抗体の元来のグリコシル化パターンを改変する。改変とは、抗体に見出される1以上の炭水化物部位の欠失、および/または抗体に存在しない1以上のグリコシル化部位の負荷を意味する。

## 【0204】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N - 結合またはO - 結合している。N - 結合とは、炭水化物部位のアスパラギン残基の側鎖への付着をいう。トリペプチド配列アスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - スレオニン(ここに、Xはプロリンを除いたいずれかのアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への炭水化物部位の酵素付着のための認識配列である。かくして、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的グリコシル化部位を生じさせる。O - 結合グリコシル化とは、糖N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの内の1つの、ヒドロキシアミノ酸への付着をいい、最も普通にはセリンまたはスレオニンであるが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリシンを用いることもできる。

## 【0205】

抗体に対するグリコシル化部位の負荷は、便宜には、それが(N - 結合グリコシル化部位のための)前記したトリペプチド配列の1以上を含有するように、アミノ酸配列を改変

10

20

30

40

50

することによって達成される。改変は、(O-結合グリコシル化部位のための)元来の抗体の配列に対する1以上のセリンまたはスレオニン残基の負荷、またはそれでの置換によってなすこともできる。

【0206】

抗-腫瘍細胞抗原抗体のアミノ酸配列変種をコードする核酸分子は、当該分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は限定されるものではないが、(天然に生じるアミノ酸配列の場合には)天然源からの単離、またはオリゴヌクレオチド-媒介(または部位-特異的)突然変異誘発、PCR突然変異および先に調製した変種、または抗-腫瘍細胞抗原抗体の非-変種バージョンのカセット突然変異誘発による調製を含む。

【0207】

抗体の血清中半減期を増加させるためには、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されたように、サルベージ受容体結合エピトープを抗体(特に、抗体断片)に取り込むことができる。本明細書中で用いるように、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」とは、IgG分子のイン・ビボ血清中半減期を増加させることを担うIgG分子(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、またはIgG<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープをいう。

【0208】

(viii) 親和性成熟

本発明の抗体の親和性を増大させる必要があり、この仕事を達成するのに当該分野で知られた多くの方法がある。例えば、集中された工程ごとの突然変異誘発を、ファージ発現抗体ライブラリーを用いて行うことができ、ここでは、単一の突然変異を含有する全ての6つの重鎖および軽鎖CDRを増大した抗原親和性について発現させ、スクリーニングさせる(Wuら、(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(11):6037-42参照)。もう1つの集中したアプローチは「ホット-スポット突然変異誘発」といわれ、ここでは、ランダムに導入された突然変異は、改良された親和性を最も生じさせるような部位に導入される(Hoら、(2005)J. Biol. Chem. 280:607-17参照)。これらのような集中されたアプローチは、小さなライブラリーのみがスクリーニングが必要であるが、後に、全ての変種組合せの広範なスクリーニングが最良のクローンを得るのに必要な点で不利を有する。

【0209】

抗体親和性成熟を行うための第二の一般的なアプローチはいくつかの異なるタイプのディスプレイ技術の1つの使用に依拠する。これらの技術においては、数百万の抗体変種を、改良された親和性を持つ変種に好都合な条件下で表示させ、選択する。表示システムは、しばしば、誤差-傾向PCR突然変異誘発のようなランダム突然変異体を導入するためのいくつかの方法と対とする。用いることができるディスプレイ技術は、限定されるものではないが、リボソーム-、酵母-、ファージ-、マクロビーズ-、蛋白質-DNA結合-、細菌-およびレトロウイルスディスプレイを含む。これらの技術を用い、抗体親和性における1000x改良が報告されており、48fM程低い親和性を持つ抗体を生じる。レビューについては、Hoogenboom(2005)Nature Biotechnology 23:1105-16を参照されたし。

【0210】

「ルック-スルー突然変異誘発」と呼ばれる別のアプローチは、CDRドメイン内の化学の分布を調べ、アミノ酸側鎖化学のシネルジー寄与に取り組むことによって、コンビナトリアル突然変異を同時に評価し、最適化する多次元突然変異誘発アプローチである(Rajpal et al(2005)Proc Natl Acad Sci USA 102(24):8466-71)。

【0211】

(ix) エフェクター機能エンジニアリング

エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾して、例えば、抗体の抗原-依存性細胞-媒介細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)を増強させるのが望ましいであろう。これは、1以上のアミノ酸置換を抗体のFc領域に導入する

10

20

30

40

50

ことによって達成することができる。別法として、あるいは加えて、システイン残基をFc領域に導入することができ、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能とする(レビューについては: Weiner and Carter (2005) Nature Biotechnology 23(5): 556-557)。かく作製されたホモダイマー抗体は、改良された内部化能力および/または増大した補体-媒介細胞殺傷および抗体-依存性細胞傷害性(ADCC)を有することができる。Caronら、J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。増強された抗-腫瘍活性を持つホモダイマー抗体は、Wolf et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されたヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。別法として、デュアルFc領域を有し、それにより、補体溶解性およびADCC能力を有する抗体を作製することができる。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。Fc領域内に修飾されたグリコシル化を持つ抗体を生産することができる。例えば、炭水化物鎖におけるフコース含有量を低下させることは、抗体の固有のADCC活性を改良することができる(例えば、WO0061739に記載された、BioWa's Potillegent<sup>TM</sup> ADCC Enhancing Technology 参照)。別法として、二等分された非-フコシル化オリゴ糖鎖を加える抗体を細胞系で生産することができる(US 6,602,684 参照)。これらの技術の双方は、エフェクター細胞上のFcガンマIIa受容体に対する増大された親和性を持つ抗体を生じさせ、その結果、増大したADCC効率がもたらされる。Fc領域を作製して、本発明の抗体の血清中半減期を改変することもできる。AbdegはFcRnサルベージ受容体に対する増大した親和性を持つ作製されたIgGであり、従って、慣用的なIgGよりも短い半減期を有する(Vaccaroら、(2005) Nature Biotechnology 23(10): 1283-1288 参照)。血清中半減期を増加させるためには、FcRnでもって親和性を減少させるように見える、特異的突然変異をFc領域に導入することができる(Hintonら、(2004) J Biol Chem 297(8): 6213-6216 参照)。本発明の抗体を修飾して、血清中半減期を改変する他のメカニズムを用いることもでき、これは、血清中アルブミン結合ドメイン(dAb)を含めること等である(例えば、WO05035572 参照)。作製されたFcドメイン(例えば、XmAB<sup>TM</sup>、WO05077981)を本発明の抗体に組み込んで、改良されたADCC活性、改変された血清中半減期または増大した抗体蛋白質安定性に導くこともできる。

#### 【0212】

##### (x) イムノ結合体

また、本発明は、化学治療剤、トキシン(例えば、酵素的に活性なトキシン、または細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性なトキシン; その断片および/または変種を含む)、プロドラッグのような細胞傷害性剤、あるいは免疫モジュレーター、ホルモンまたはホルモンアゴニスト、および酵素または酵素阻害剤のようなもう1つの剤、色素原または色素のような光活性治療剤、脈管形成阻害剤、その代替抗体または断片、または放射性同位体(例えば、放射性結合体)に結合体化された抗体を含む免疫結合体にも関する(レビューについては、Schramaら、(2006) Nature Reviews 5: 147-159 参照)。

#### 【0213】

そのような免疫結合体の作製で有用な化学治療剤は先に記載されている。抗体、およびカリケアミシン、メイタンシン(米国特許第5,208,020号)、トリコテン、ドゥオカルマイシン(「Ultra Potent Toxins」としても知られている; 一般に、Lilloら、(2004) Chemistry and Biology 11; p. 897-906 参照) およびCC-1065のような1以上の小分子トキシンの結合体もまた本明細書中において考えられる。

## 【0214】

本発明の1つの好ましい具体例において、抗体は、1以上のメイタンシン分子（例えば、抗体分子当たり約1ないし約10のメイタンシン分子）に結合体化される。メイタンシンは、例えば、May-SS-Meに変換することができ、これはMay-SH3に還元し、修飾された抗体（Charl et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)）と反応させて、メイタンシノイド-抗原免疫結合体を生じさせることができる。別法として、選択された薬物は、ほぼ $10^{-11}$  MのIC50を有する（レビューについては、Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212 参照）高度に優れたメイタンシン誘導體DM1（N2'-デアセチル-N2'-（3-メルカプト-1-オキソプロピル）-メイタンシン）（例えば、2002年12月12日に公開されたWO02/098883参照）、またはDM4（N2'-デアセチル-N2'（4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル）メイタンシン）（例えば、2004年12月2日に公開されたWO2004/103272参照）であってよい。

10

## 【0215】

注目するもう1つの免疫結合体は、1以上のカリケアミシン分子に結合体化した抗-腫瘍細胞抗原抗体を含む。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、サブ-ピコモル濃度において二本鎖DNA破壊を生じさせることができる。使用することができるカリケアミシンの構造的アナログは、限定されるものではないが、ガンマ. . sub. 1. sup. I、アルファ. . sub. 2. sup. I、アルファ. . sub. 3. sup. I、N-アセチル-ガンマ. . sub. 1. sup. I、PSAGおよびシーター. . sup. I. sub. 1（Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993) および Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998)）を含む。また、米国特許第5,714,586号；第5,712,374号；第5,264,586号；および第5,773,001号を明示的にここに引用して援用する。

20

## 【0216】

なおもう1つのアプローチは、多くの癌において過剰生産される酵素によって、腫瘍細胞抗原抗体を、活性な形態で放出され得るプロドラッグに結合体化することを含む。例えば、抗体結合体はドキシソリシンのプロドラッグ形態でなすことができ、ここに、活性な成分はプラスミンによって結合体から放出される。プラスミンは、多くの癌性組織において過剰生産されることが知られている（Decyら、(2004) FASEB Journal 18(3):565-567参照）。

30

## 【0217】

用いることができる酵素的に活性なトキシンおよびその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、（Pseudomonas aeruginosaからの）エキソトキシンA鎖、Pseudomonasエンドトキシン、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordii蛋白質、ジアンチン蛋白質、Phytolacca americana蛋白質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、リボヌクレアーゼ（Rnase）、デオキシリボヌクレアーゼ（Dnase）、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス蛋白質、ニガウリ（momordica charantia）阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシンおよびトリコセセンを含む、例えば、1993年10月28日に公開されたWO 93/21232参照。特に好ましいのは、低い固有の免疫原性、および癌性細胞に対する機会を低下させて、トキシンに対して耐性となる作用メカニズム（例えば、細胞傷害性メカニズム-vs-生細胞メカニズム）を有するトキシンである。

40

## 【0218】

本発明の抗体および免疫モジュレーターの間で作製された結合体が考えられる。例えば、免疫刺激オリゴヌクレオチドを用いることができる。これらの分子は、抗原-特異的抗

50

体応答を誘導することができる優れた免疫原である (D a t t a ら、(2003) A n n N . Y . A c a d . S c i 1002 : 105 - 111)。さらなる免疫変調化合物は、「S1因子」のような幹細胞成長遺伝子、腫瘍壊死因子 (T N F) のようなリンホカイン、インターロイキンのような造血系因子、顆粒球 - コロニー刺激因子 (G - C S F) または顆粒球マクロファージ - 刺激因子 (G M - C S F) のようなコロニー刺激因子 (C S F)、インターフェロナルファ、ベータまたはガンマのようなインターフェロン (I F N)、エリスロポエチン、およびトロンボポエチンを含むことができる。

#### 【0219】

種々の放射性同位体が、放射性結合体化抗 - 腫瘍細胞抗原抗体の生産で利用可能である。治療放射性結合体は、P - 32、P - 33、S c - 47、F e - 59、C u - 64、C u - 67、S e - 75、A s - 77、S r - 89、Y - 90、M o - 99、R h - 105、P d - 109、A g - I 11、I - 125、I - 131、P r - 142、P r - 143、P m - 149、S m - 153、T h - 161、H o - 166、E r - 169、L u - 177、R e - 186、R e - 188、R e - 189、I r - 194、A u - 198、A u - 199、P b - 211、P b - 212、および B i - 213、C o - 58、G a - 67、B r - 80m、T c - 99m、R h - 103m、P t - 109、I n - i l l、S b - l、l - 125、H o - 161、O s - 189m、I r - 192、D y - 152、A t - 211、B i - 212、R a - 223、R n - 219、P o - 215、B i - 211、A c - 225、F r - 221、A t - 217、B i - 213、F m - 255 およびその組合せを用いて作製することができる。加えて、ホウ素、ガドリニウムまたはウラン原子を用いることができ、ここに、ホウ素原子は好ましくは B - 10 であり、ガドリニウム原子は G d - 157 であり、ウラン原子は U - 235 である。

10

20

#### 【0220】

好ましくは、治療放射性核種結合体は、20 および 10,000 keV の間のエネルギーを持つ放射性核種を有する。放射性核種は 1000 keV 未満のエネルギーを持つオージェエミッター、20 および 5000 keV の間のエネルギーを持つ P エミッター、または 2000 および 10,000 keV の間のエネルギーを持つアルファまたは「a」エミッターであり得る。

#### 【0221】

診断放射性結合体は、ガンマ -、ベータ - または陽電子 - 放射同位体である放射性核種を含有することができる。ここに、該放射性核種は 20 および 10,000 keV の間のエネルギーを有する。放射性核種は 18 F、51 M n、52 m M n、52 F e、55 C o、62 C u、64 C u、68 G a、72 A s、75 B r、76 B r、82 m R b、83 S r、86 y、89 Z r、94 m T c、I I n、120 i、124 i、51 C r、57 C o、58 C o、59 F e、67 C U、67 G a、75 S e、97 R u、99 m T c、I l l I n、114 m I n、123 i、125 i、131 i、169、197 H g、および 21 T l の群から選択することができる。

30

#### 【0222】

さらなるタイプの診断免疫結合体が考えられる。本発明の抗体または断片を、光活性またはコントラスト剤である診断剤に連結させることができる。光活性化合物は色素原または色素のような化合物を含むことができる。コントラスト剤は、例えば、常磁性イオンであってよく、ここに、該イオンはクロム (I I I)、マンガン (I I)、鉄 (I I I)、鉄 (I I)、コバルト (I I)、ニッケル (I I)、銅 (I I)、ネオジム (I I I)、サマリウム (I I I)、イッテルビウム (I I I)、ガドリニウム (I I I)、バナジウム (I I)、テルビウム (I I I)、ジスプロシウム (I I I)、ホロミウム (I I I) およびエルビウム (I I I) を含む。コントラスト剤は、ヨウ素、イリジウム、バリウム、ガリウムおよびタリウム化合物のような、X - 線技術またはコンピュータ断層撮影法で用いる放射線不透過性化合物であってよい。放射線不透過性化合物はバリウム、ジアトリゾエート、エチオダイズド油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、イオダミド、イオジパミド、イオドキサム酸、ログラマイド、イオヘキソール、イオパミドール

40

50

、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセリン酸、イオスラミドメグルミン、イオセメチン酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキソトリゾ酸、イボデート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾエート、プロピリオドン、および塩化第一タリウムの群から選択することができる。別法として、診断免疫結合体は、本発明の抗体に結合体化したガス充填リボソームのような超音波増強剤を含有することができる。診断免疫結合体は、限定されるものではないが、腫瘍の走査中、内視鏡または血管内方法、または癌の診断および検出を含めた種々の手法を用いることができる。

#### 【0223】

抗体および細胞傷害性剤の結合体は、N - スクシンイミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオール ) プロピオネート ( S P D P )、スクシンイミジル - 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン ( I T )、( ジメチルアジピミデート H C L のような ) イミドエステルの二官能性誘導体、( ジスクシンイミジルすべレートのような ) 活性なエステル、( グルタルアルデヒドのような ) アルデヒド、ビス ( p - アジドベンゾイル ) ヘキサンジアミンのようなビス - アミド化合物、( ビス - ( p - ジアゾニウムベンゾイル ) - エチレンジアミンのような ) ビス - ジアゾニウム誘導体、( トルエン 2 , 6 - ジイソシアネートのような ) ジイソシアネートおよび 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンのようなビス - 活性フッ素化合物のような種々の二官能性蛋白質カップリング剤を用いることによって作製することができる。例えば、リシンイムノトキシンは *Vitetta et al. Science* 238 : 1098 ( 1987 ) に記載されたように調製することができる。炭素 - 14 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 ( M X - D T P A ) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示的なキレート化剤である。W O 94 / 11026 参照。リンカーは細胞において細胞傷害性薬物の放出を容易とする「切断可能なリンカー」であってよい。例えば、酸 - 不安定リンカー、ペプチダーゼ - 感受性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー ( *Charl et al. Cancer Research* 52 : 127 - 131 ( 1992 ) ) を用いることができる。剤は、炭水化物部位を通じて本発明の抗体に加えて連結してもよい。

10

20

#### 【0224】

別法として、抗 - 腫瘍細胞抗原抗体および細胞傷害性剤を含む融合蛋白質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製することができる。

30

#### 【0225】

なおもう一つの具体例において、抗体は、腫瘍プレ標的化で利用するためのストレプトアビジンのような「受容体」に結合体化させることができ、そこでは、抗体 - 受容体結合体が患者に投与され、続いて、清澄化剤を用いて循環から未結合結合体を除去し、次いで、細胞傷害性剤 ( 例えば、放射性ヌクレオチド ) に結合体化された「リガンド」 ( 例えば、アビジン ) を投与する。

#### 【0226】

抗 - 腫瘍細胞抗原抗体は、加えて、標的細胞リソゾームの内部で放出されるに過ぎない細胞傷害性分子に結合体化することができる。例えば、薬物モノメチルアウリスタチン E ( M M A E ) を、抗体結合体の内部化に続いて蛋白質分解リソゾーム酵素カテプシン B によって切断されるパリン - シトルリン結合を介して結合体化することができる ( 例えば、2003年4月3日に公開された W O 03 / 026577 参照 )。別法として、切断可能部位としてヒドラゾン官能性を含有する酸 - 不安定リンカーを用い、M M A E を抗体に付着させることができる ( 例えば、2002年11月11日に公開された W O 02 / 088172 参照 )。

40

#### 【0227】

( x i ) 抗体依存性酵素媒介プロドラッグ療法 ( A D E P T )

本発明の抗体は、プロドラッグ ( 例えば、ペプチジル化学療法剤、W O 81 / 01145 参照 ) を活性な抗 - 癌薬物に変換するプロドラッグ - 活性化酵素に抗体を結合体化する

50

ことによって、A D E P Tにおいて用いることもできる。例えば、W O 88/07378および米国特許第4,975,278号参照。

【0228】

A D E P Tで有用な免疫結合体の酵素成分は、それをそのより活性化細胞傷害性形態に変換するように、プロドラッグに作用することができるいずれの酵素も含む。

【0229】

本発明の方法で有用な酵素は、限定されるものではないが、ホスフェート-含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；スルフェート含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；非-毒性5-フルオロシトシンを抗-癌薬物、5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド-含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用な、セラチアプロテアーゼ、テルモリシン、スプチリシン、カルボキシペプチダーゼおよび（カテプシンBおよびLのような）カテプシンのようなプロテアーゼ；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なベータ-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼのような炭水化物-切断酵素；ベータ-ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用なベータ-ラクタマーゼ；およびそれらのアミン窒素において、各々、フェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基で誘導体化された薬物を有利薬物に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼのようなペニシリンアミダーゼを含む。別法として、「アブザイム」として当該分野でやはり知られた、酵素活性を持つ抗体を用いて、本発明のプロドラッグを遊離活性薬物に変換することができる（例えば、M a s s e y , N a t u r e 328:457-458(1987)参照）。抗体-アブザイム結合体は、アブザイムの腫瘍細胞集団への送達のために本明細書中に記載されたように調製することができる。

【0230】

本発明の酵素は、先に議論したヘテロ二官能性架橋剤試薬の使用のような当該分野で良く知られた技術によって抗-腫瘍細胞抗原抗体に共有結合させることができる。別法として、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性化部分に連結された本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合蛋白質は、当該分野で良く知られた組換えDNA技術を用いて構築することができる（例えば、N e u b e r g e r ら、N a t u r e , 312:604-608(1984)参照）。

【0231】

(x i i) 他の抗体の修飾

抗体の他の修飾が本明細書中では考えられる。例えば、抗体は、種々の非蛋白質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、または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のうちの1つに連結させることができる。抗体は、例えば、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子およびナノカプセル）において、あるいはマクロエマルジョンにおいて、コアセルベーション技術によって、あるいは界面重合（例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マクロカプセルによって調製されたマイクロカプセルに捕獲することもできる。そのような技術はR e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 16th edition, Oslo, A . , E d . , (1980)に開示されている。

【0232】

本明細書中に開示された抗-腫瘍細胞抗原抗体もまた免疫リポソームとして処方することもできる。抗体を含有するリポソームは、E p s t e i n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 82:3688(1985)；H w a n g ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 77:4030(1980)；米国特許第4,485,045号および第4,544,545号；および1997年10月23日に公開された

W O 9 7 / 3 8 7 3 1 に記載されたような当該分野で知られた方法によって調製される。増強された循環時間を持つリポソームは、米国特許第 5 , 0 1 3 , 5 5 6 号に開示されている。

#### 【 0 2 3 3 】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよび P E G - 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン ( P E G - P E ) を含む脂質組成物での逆相蒸発方法によって生じさせることができる。リポソームは規定されたポアサイズのフィルターを通じて押し出して、所望の直径を持つリポソームを生じさせることができる。本発明の抗体の F a b ' 断片は、ジスルフィド相互交換反応を介して、M a r t i n e t a l . J . B i o l . C h e m . 2 5 7 : 2 8 6 - 2 8 8 ( 1 9 8 2 ) に記載されたようにリポソームに結合体化させることができる。化学療法剤は、所望により、リポソーム内に含有させる。G a b i z o n e t a l . J . N a t i o n a l C a n c e r I n s t . 8 1 ( 1 9 ) 1 4 8 4 ( 1 9 8 9 ) 参照。

10

#### 【 0 2 3 4 】

本発明の抗体を含む診断または治療融合蛋白質を構築することができる。これらの融合蛋白質は、本発明の抗体から由来する少なくとも 2 つの抗 - 腫瘍細胞抗原結合ドメインを含むことができるか、あるいは注目する代替エピトープに結合する結合ドメインに融合した 1 つの抗 - 腫瘍細胞抗原結合ドメインを含有することができる。この代替エピトープは、癌腫 - 会合エピトープであってよい。これらの融合は免疫結合体であってよく、全長抗体またはその断片から構成されていてもよい。

20

#### 【 0 2 3 5 】

( i v ) 所望の特性を持つ抗体についてのスクリーニング

抗体を集めるための技術は前記されている。さらに、所望であれば、ある種の生物学的特徴を持つ抗体をさらに選択することができる。

#### 【 0 2 3 6 】

細胞死滅を促進する抗体を同定するためには、腫瘍細胞抗原および本発明の抗体を発現する癌細胞を用いてイン・ビトロアッセイを行うことができる。当該分野で知られた 1 つのアッセイは、C e l l T i t e r 9 6 水性非 - 放射性細胞増殖アッセイ ( P r o m e g a c a t # G 5 4 2 1 ) である。このアッセイにおいては、新規テトラゾリウム化合物 [ 3 - ( 4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル ) - 5 - ( 3 - カルボキシメトキシフェニル ) - 2 - ( 4 - スルホフェニル ) - 2 - H - テトラゾリウム、内塩 ; M T S ( a ) ] および電子カップリング試薬 ( フェナジンメトスルフェート ) P M S の溶液を利用する。M T S は、組織培養基に可溶性であるフォルマザン産物へ細胞によって生体還元される。4 9 0 n m におけるフォルマザン産物の吸光度は、さらに加工することなく 9 6 - ウエルアッセイプレートから直接的に測定することができる。M T S の水性可溶性フォルマザン産物への変換は、代謝的に活性な細胞において見出されるデヒドロゲナーゼ酵素によって達成される。4 9 0 n m 吸光度の量によって測定されたフォルマザン産物の量は、培養中の生きた細胞の数に直接的に比例する。もう 1 つの好ましいアッセイは、テトラゾリウム塩 ( I N T ) の赤色フォルマザン産物への変換をもたらす、カップリングされた酵素アッセイを伴う、培養上清において放出された乳酸デヒドロゲナーゼ ( L D H ) を低了する C y t o T o x 9 6 アッセイ ( P r o m e g a c a t # G 1 7 8 0 ) である。形成された色の量は、溶解された細胞の数に比例する。目に見える波長の吸光度データは、標準 9 6 ウエルプレートリーダーを用いて収集される。

30

40

#### 【 0 2 3 7 】

細胞傷害性手法よりはむしろ静細胞手法で作用する抗体の同定は、非 - 処理対照培養と比較した処理された標的細胞培養の生存性を測定することによって達成することができる。有効性は、C e l l T i t e r - B l u e ( 登録商標 ) C e l l V i a b i l i t y A s s a y または C e l l T i t e r - G l o ( 登録商標 ) L u m i n e s c e n t C e l l V i a b i l i t y A s s a y ( 各々 P r o m e g a , c a t a l o g n u m b e r s G 8 0 8 0 a n d G 5 7 5 0 ) のような当該分野で知られた方法を用

50

いて検出することができる。抗体は、もし処置が、前記した手段によって測定して細胞死滅のいずれの証拠もなくして対象培養と比較して細胞数の減少を引き起こすならば、潜在的に静細胞性と考えられるであろう。

#### 【0238】

A D C C を促進する抗体を同定するためには、イン・ビトロスクリーニングアッセイを当該分野で知られたアッセイの1つに従って実行することができる。1つの好ましいアッセイはイン・ビトロA D C Cアッセイであり；クロム51 - 標識標的細胞を調製するためには、腫瘍細胞系を組織培養プレートで成長させ、PBS中の滅菌10 mM EDTAを用いて収穫する。脱着された細胞を細胞培養基で2回洗浄する。細胞( $5 \times 10^6$ )を、場合によって混合しつつ、200  $\mu$ Ciのクロム51 (New England Nuclear / DuPont) で37 °Cにて1時間標識する。標識された細胞を細胞培養基で3回洗浄し、次いで、 $1 \times 10^5$  細胞/mLの濃度まで再度懸濁する。細胞をオプソニン化なくして用いるか、あるいは、PBMCアッセイにおいて100 ng/mLおよび1.25 ng/mLにおいて、あるいはNKアッセイにおいて20 ng/mLおよび1 ng/mLにおいてテスト抗体と共にインキュベーションを行うことによってアッセイに先立ってオプソニン化する。末梢血液単核細胞は、正常な健康なドナーからヘパリン上に血液を吸収することによって調製され、同等容量のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で希釈される。次いで、血液をLYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM (登録商標) (LSM: Organon Teknika) に重ね、製造業者の指示に従って遠心する。単核細胞をLSM - 血漿界面から収集しPBSで3回洗浄する。エフェクター細胞を、細胞培養基中に $1 \times 10^7$  細胞/mLの最終濃度まで懸濁する。LSMを通じたの精製の後、製造業者の指示に従い、NK細胞単離キットおよび磁性カラム(Miltenyi Biotech)を用いる陰性選択によって、ナチュラルキラー(NK)細胞をPBMCから単離する。単離されたNK細胞を収集し、洗浄し、細胞培養基中に $2 \times 10^6$  細胞/mLの濃度まで再懸濁する。NK細胞の同一性は、フローサイトメトリー分析によって確認される。種々のエフェクター：標的比率は、細胞培養基中のマイクロタイタープレート(100  $\mu$ L最終容量)の列に沿ってエフェクター(PBMCまたはNK)細胞を2倍系列希釈することによって調製される。エフェクター細胞の濃度はPBMCについては、 $1.0 \times 10^7$  / mLないし $2.0 \times 10^4$  / mL、およびNKについては $2.0 \times 10^6$  / mLないし $3.9 \times 10^3$  / mLの範囲である。エフェクター細胞の滴定の後、100  $\mu$ Lの $1 \times 10^5$  細胞/mLのクロム51 - 標識標的細胞(オプソニン化または非オプソニン化)をプレートの各ウェルに加える。この結果、PBMCについては100 : 1、およびNK細胞については20 : 1の初期エフェクター：標的比率がもたらされる。全てのアッセイは二連で実行し、各プレートは自然溶解(eフェクター細胞なし)および合計溶解(標的細胞 + 100  $\mu$ L 1%ドデシル硫酸ナトリウム、1N水酸化ナトリウム)についての対照を含有する。プレートを37 °Cにて18時間インキュベートし、その後、上清収集系(Skatron Instrument, Inc.)を用いて細胞培養上清を収穫し、Minaxi自動 - ガンマ5000シリーズガンマカウンター(Packard)において1分間カウントする。次いで、式： $\% \text{細胞傷害性} = (\text{試料cpm} - \text{自然溶解}) / (\text{合計溶解} - \text{自然溶解}) \times 100$ を用いて結果をパーセント細胞傷害性として表す。

#### 【0239】

高スループット様式でA D C C を促進することができる抗体を同定するためには(ここに引用して援用する同時係属出願60/756,301)、以下のように、ACEA Biosciences RT-CES (登録商標) (Real Time Cell Electronic Sensor) システムを用いてリアルタイムA D C Cアッセイを行うことができる：細胞をE - プレートマイクロタイタープレート(ACEA Biosciences)に蒔き、ここに、マイクロ電極表面と細胞との相互作用は、細胞 - 電極インピーダンス応答の発生に導き、これは、接着および数の形態、量の項目について細胞の状態を示す。ヒトPBMCは(健康なボランティアドナーからの)ヒト血液から新たに調

10

20

30

40

50

製され、次いで、実験的に、例えば、25 : 1エフェクター : 標的と決定された最適な比率で標的細胞に加える。次いで、テスト抗体を加え、細胞プレートを、次の48時間の間、細胞指標の連続的モニタリングのためにACEA Systemに戻す。PBMCおよびテスト抗体の添加後の記録された細胞指標の降下は、テスト抗体によって媒介されるADCCによる標的細胞の殺傷を反映する。実行すべき対照は、エフェクターPBMC細胞の不存在下におけるアッセイの実行または無関係なイソタイプ対照抗体の使用を含むことができる。

#### 【0240】

CDCを促進する抗体を同定するために、当業者は当該分野で知られたアッセイの1つを実行することができる。1つの好ましいアッセイは、イン・ビトロCDCアッセイであり；イン・ビトロにて、CDCアッセイは、異なる濃度のテスト抗体の不存在下または存在下においてヒト（または代替源）補体 - 含有血清と共に、腫瘍細胞抗原を発現する細胞をインキュベートすることによって測定することができる。次いで、ALAMAR BLUE（登録商標）（Gazzano - Santoroら、J. Immunol. Methods 202 163 - 171（1997））を用いて生きた細胞を定量することによって、次いで、細胞傷害性を測定する。対照アッセイは抗体なくして、および抗体と共に、加熱不活化血清を用い、および/または問題とする腫瘍細胞抗原を発現しない細胞を用いて行う。別法として、赤血球細胞を、腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原またはペプチドで被覆することができ、次いで、CDCは赤血球溶解を観察することによってアッセイすることができる（例えば、Karjalainen and Mantyjärvi, Acta Pathol Microbiol Scand [C]. 1981 Oct; 89（5）: 315 - 9参照）。

10

20

#### 【0241】

成長阻害性抗 - 腫瘍細胞抗原抗体を同定するために、腫瘍細胞抗原を過剰発現する癌細胞の成長を阻害する抗体についてスクリーニングすることができる。1つの具体例において、選択する成長阻害性抗体は、約0.5 ~ 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体濃度にて、約20 ~ 100%、好ましくは約50 ~ 100%だけ細胞培養において細胞を発現する腫瘍細胞抗原の成長を阻害することができる。

#### 【0242】

細胞死滅を誘導する抗体について選択するためには、例えば、PI、トリパンブルーまたは7AAD取り込みによって示される膜一体性の喪失は、対照に対して評価することができる。好ましいアッセイは、腫瘍抗原発現細胞を用いるPI取込みアッセイである。このアッセイに従うと、腫瘍細胞抗原発現細胞を、10%加熱 - 不活化PBS（HyClone）および2mM L - グルタミンを補足したダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）：ラムのF - 12（50 : 50）中で培養する（かくして、該アッセイは補体および免疫エフェクター細胞の不存在下で行う。腫瘍細胞は100 x 20mm皿中の皿当たり $3 \times 10^6$ の密度で蒔き、一晚付着させる。次いで、培地を除去し、神聖な培地単独、または10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の適当なモノクローナル抗体を含有する培地で置換える。細胞を3日間の期間の間インキュベートする。各処理に続いて、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱着する。次いで、1200rpmにおいて、4において細胞を5分間遠心し、ペレットを3mLの氷冷 $\text{Ca}^{2+}$ 結合緩衝液（10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM  $\text{CaCl}_2$ ）中にペレットを再懸濁させ、細胞クランプの除去のために、35mmストレイナー - キャップド12 x 75チューブ（チューブ当たり1mL、処理群当たり3チューブ）にアリコットする。次いで、チューブはPI（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を受ける。FACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーターおよびFACSCONVERT<sup>TM</sup>を用いて試料を分析することができる。CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）。PI取込みによって決定して細胞死滅の統計学的に有意なレベルを誘導する抗体は、細胞死滅 - 誘導抗体として選択することができる。

30

40

#### 【0243】

50

アポトーシスを誘導する抗体について選択するためには、BT474細胞を用いるアネキシン結合アッセイが利用できる。細胞表面ホスファチジルセリン(PS)は、PSに対するアネキシンVの高い親和性に基づく、商業的に入手可能なアネキシンV染色試薬のいずれかを用いて検出することができる。BT474細胞を培養し、これまでのパラグラフで議論したように、皿に蒔く。次いで、培地を除去し、新鮮な培地単独、または10 $\mu$ g/mLのモノクローナル抗体を含有する培地で置換える。3日間のインキュベーション期間の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱着させる。次いで、細胞を遠心し、Ca<sup>2+</sup>結合緩衝液に再懸濁し、細胞死滅アッセイについて先に議論したようにチューブにアリコットする。次いで、チューブは標識されたアネキシン(例えば、アネキシンV-FITC)(1 $\mu$ g/mL)を受け取る。FACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーターおよびを用いて試料をFACSCONVERT<sup>TM</sup>を用いて試料を分析することができる。CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)。対照に対するアネキシン結合の統計学的に有意なレベルを誘導する抗体は、アポトーシス-誘導抗体として選択される。別法として、例えば、Roche Applied Scienceから商業的に入手可能なアネキシンV染色試薬参照。FITCをアネキシンVに結合体化することによって、フローサイトメトリーによって単一-細胞ベースでアポトーシス細胞を同定し、定量することができる。FITC-アネキシンV(緑色蛍光)および活力のない色素ヨウ化プロピジウム(赤色蛍光)での同時細胞染色は、無傷細胞(FITC-PI-)、初期アポトーシス(FITC+PI-)、及び後期アポトーシスまたは壊死細胞(FITC+PI+)の区別を供することができる。

10

20

## 【0244】

アネキシン結合アッセイに加え、BT474細胞を用いるDNA染色アッセイが利用可能である。このアッセイを行うために、先の2つのパラグラフで記載した注目する抗体で処理されているBT474細胞を、9 $\mu$ g/mL HOECHST33342<sup>TM</sup>と共に37にて2時間インキュベートし、次いで、MODFIT<sup>TM</sup>ソフトウェア(Verity Software House)を用い、EPICS ELITE.TM.フローサイトメーター(Coulter Corporation)で分析した。未処理細胞(100%アポトーシス細胞まで)よりも2倍以上(好ましくは、3倍以上)のアポトーシス細胞のパーセンテージの変化を誘導する抗体は、このアッセイを用いてプロ-アポトーシス抗体として選択することができる。

30

## 【0245】

さらに、生物学的試料内の上昇したアポトーシスは、アポトーシスに特徴的なDNA断片化を検出する核酸-ベースの方法で確認することができる。アガロースゲルでの電気泳動を用いて解像すると、アポトーシスDNAは、最初に、例えば、壊死または他の非-特異的DNA分解において観察される核酸のスミアとは反対に、特徴的な「ラダー」パターンを有する。DNA断片化を検出するための通常の組織化学的技術は、末端-標識DNAを用いる。そのためのキットはAPOLERT DNA断片化キット(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California)のように商業的に入手可能である。このアッセイは、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(Tdt)-媒介dUTPニック-末端標識(TUNEL)に基づき、そこでは、Tdtは、アポトーシスを受けている細胞において断片化されたDNAの遊離3'-ヒドロキシル末端においてフルオレセイン-dUTPの取込みを触媒する。

40

## 【0246】

カスパーゼのバイオマーカーのための多数のアッセイキットは商業的に入手可能である。例えば、均一カスパーゼアッセイ(Roche Applied Sciences, Indianapolis, Indiana)は、マイクロプレートにおけるカスパーゼ活性の定量的イン・ビトロ決定のためのフルオリメトリーアッセイである。該アッセイは、例えば、96-ウェルプレートでの100のテスト、および384-ウェルプレートでの400テストを可能とする、高-スループットスクリーニングで特に有用である(Cat.No.3005372)。このアッセイは、例えば、血清または血漿を含めた、生

50

物学的試料において、カスパーゼ - 2、カスパーゼ - 3、カスパーゼ 7 - 7、および程度は低い、カスパーゼ - 6、カスパーゼ - 8、カスパーゼ - 9 およびカスパーゼ - 10 を含めたいくつかのカスパーゼの検出を可能とする。細胞死滅検出 ELISA PLUS アッセイ (Cat. No. 1774425; Roche Applied Sciences, Indianapolis, Indiana) は、各々、DNA およびヒトトンに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を用いて定量的サンドイッチ - 酵素 - 免疫アッセイ原理に基づく。このアッセイは、アポトーシスで死滅する細胞の細胞質へ放出されるモノ - およびオリゴヌクレオソームの特異的検出および定量を可能とする。それは、細胞溶解物、血清、培養上清等を含めた、種々の試料について用いることができる。

#### 【0247】

本発明の抗体は、PET イメージング剤として 18F - アネキシンを用いてアポトーシス活性についてイン・ビボでスクリーニングすることもできる。この手法においては、アネキシン V を 18F で放射性標識し、調査中の抗体での容量に従って動物をテストするのに与える。一番初期の事象の 1 つは、細胞膜の内側から外側の細胞表面へのホスファチジルセリンの移動においてアポトーシスプロセスで起こり、ここでは、それはアネキシンに接近可能である。次いで、動物を PET イメージングに付す (Yagleら、J Nucl Med. 2005 Apr; 46(4): 658 - 66)。動物を犠牲にし、個々の器官または腫瘍を取り出し、標準的な手法に従ってアポトーシスマーカーについて分析する。

#### 【0248】

注目する抗体によって結合された腫瘍細胞抗原上のエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするためには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されたそのようなルーチンの交差 - ブロッキング圧政を行うことができる。別法として、または加えて、エピトープマッピングは当該分野で公知の方法によって行うことができる。

#### 【0249】

本発明の抗体は、問題とする腫瘍 - 細胞抗原への結合に際して迅速に内部化される能力について、または結合に続いて細胞表面に留まる能力についてスクリーニングすることができる。いくつかの具体例において、例えば、いくつかのタイプの免疫結合体の組み立てにおいて、内部化されるべき抗体の能力は、もし内部化がトキシン部位を放出するのに必要であれば望まれるであろう。別法として、もし抗体を用いて ADC または CDC を促進するならば、それは細胞表面に留まる抗体についてより望ましいであろう。スクリーニング方法を用いて、これらのタイプの挙動を分化させることができる。例えば、腫瘍細胞抗原担持細胞は、細胞を、(内部化をブロックするための 0.1% アジ化ナトリウムを含む) 氷上で、または (アジ化ナトリウムなくして) 37 °C にて、3 時間ほぼ 1 μg/mL の濃度にて ヒト IgG 1 (対照抗体) または本発明の抗体の 1 つと共にインキュベートする場合に用いることができる。次いで、細胞を冷染色緩衝液 (PBS + 1% BSA + 0.1% アジ化ナトリウム) で洗浄し、氷上でヤギ抗 - ヒト IgG - FITC で 30 分間染色する。幾何平均蛍光強度 (MFI) は FACS Calibur によって記録する。もし MFI において差が、アジ化ナトリウムの存在下における氷上の抗体と共にインキュベートされた細胞、およびアジ化ナトリウムの不存在下において 37 °C で観察された細胞の間で観察されなければ、抗体は、内部化されるよりはむしろ、細胞表面に結合されたままでいるものであると疑われるであろう。しかしながら、もし細胞がアジ化ナトリウムの不存在下で 37 °C でインキュベートされた場合に、表面染色可能抗体の減少が見出されたならば、抗体は内部化が可能なものであると疑われるであろう。

#### 【0250】

##### V. ベクター、宿主細胞および組換え方法

また、本発明は、ヒト化抗 - 腫瘍細胞抗原抗体をコードする単離された核酸、該核酸を含むベクターおよび宿主細胞、および該抗体の生産のための組換え技術も提供する。

10

20

30

40

50

## 【0251】

抗体の組換え生産のためには、それをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング（DNAの増幅）のために、または発現のために複製可能なベクターに挿入する。モノクローナル抗体をコードするDNAは、（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）慣用的な手法を用いて容易に単離し、配列決定される。多くのベクターが入手可能である。ベクターの成分は、一般には、限定されるものではないが、以下の：シグナル配列、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終止配列の1以上を含む。

## 【0252】

## (i) シグナル配列成分

本発明の抗-腫瘍細胞抗原抗体は、直接的にのみならず、好ましくは、シグナル配列、あるいは成熟蛋白質またはポリペプチドのN-末端に特異的な切断部位を有する他のポリペプチドである異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換えにより生産することができる。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。天然抗-腫瘍細胞抗原抗体シグナル配列を認識し、処理しない原核生物宿主細胞では、シグナル配列が、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱-安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌では、天然シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、（*Saccharomyces* and *Kluyveromyces* アルファ-因子リーダーを含めた）アルファ因子リーダー、または酸性ホスファターゼリーダー、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー、またはWO 90/13646に記載されたシグナルによって置換することができる。哺乳動物細胞発現においては、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純疱疹gDシグナルが利用できる。

## 【0253】

そのような前駆体領域についてのDNAを、抗-腫瘍細胞抗原抗体をコードするDNAにリーディングフレームにて連結させる。

## 【0254】

## (ii) 複製起点成分

発現およびクローニングベクターの双方は、1以上の選択された宿主細胞においてベクターが複製するのを可能とする核酸配列を含有する。一般には、クローニングベクターにおいては、この配列は、宿主染色体DNAから独立してベクターが複製するのを可能とするものであり、複製起点または自律複製配列を含む。そのような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。プラスミドpBR322からの複製起点はほとんどのグラム-陰性細菌に適しており、2 $\mu$ プラスミド起点は酵母に適しており、種々のウイルス起点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）は哺乳動物細胞においてクローニングベクターで有用である。一般には、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターで必要とされない（SV40起点は、典型的には、それが初期プロモーターを含有する故だけで用いることができる）。

## 【0255】

## (iii) 選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは選択可能マーカーともいわれる選択遺伝子を含有することもできる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗体または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリンに対して耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠乏を補う、または(c) 複雑な培地から利用できない臨界的な栄養素を供給する蛋白質をコードする。例えば、*Bacillus* についてD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子。

## 【0256】

選択スキームの1つの例は、宿主細胞の成長を阻止する薬物を利用する。異種遺伝子で

10

20

30

40

50

首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与する蛋白質を生じ、かくして、選択方法に対して生存する。そのような優性選択の例は、薬物ネオマイシン、マイクロフェノール酸およびヒグロマイシンを用いる。

【0257】

哺乳動物細胞について適当な選択マーカーのもう1つの例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよび-II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等のような抗-腫瘍細胞抗原抗体核酸を撮取する能力がある細胞の同定を可能とするものである。

【0258】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず、メトトレキセート(Mtx)、DHFRの競合的アンタゴニストを含有する培地中の形質転換体の全てを培養することによって同定される。適当な宿主細胞は、野生型DHFRを使用する場合、DHFR活性を欠乏したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系である。

10

【0259】

別法として、抗-腫瘍細胞抗原抗体、野生型DHFR蛋白質、およびアミノグリコシド3'-ホストランスフェラーゼ(APH)のようなもう1つの選択マーカーをコードするDNA配列で形質転換された、または共-形質転換された宿主細胞(特に、内因性DHFRをコードする野生型宿主)は、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418のような選択マーカーについての選択剤を含有する培地中で細胞成長によって選択することができる。米国特許第4,965,199号参照。

20

【0260】

酵母で用いるための適当な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcombら、Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠如する酵母の突然変異体株、例えば、ATCC No. 44076またはPEP4-1. Jones, Genetics, 85:12(1977)についての選択マーカーを提供する。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中でのtrp1病巣の存在は、トリプトファンの不存在下における成長による形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。同様に、Leu2-欠乏酵母株(ATCC 20,622または38,626)は、Leu2遺伝子を担う公知のプラスミドによって補われる。

30

【0261】

加えて、1.6ミウm環状プラスミドpkD1に由来するベクターを、Kluyveromyces酵母の形質転換で用いることができる。別法として、組換え子ウシキモシンの大規模な生産のための発現系は、K. lactisについて報告されている。Vanden Berg, Bio/Technology, 8:135(1990)。Kluyveromycesの工業的株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌についての安定なマルチコピー発現ベクターもまた開示されている。Fleerら、Bio/Technology, 9:968-975(1991)。

【0262】

(iv) プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗-腫瘍細胞抗原抗体核酸に操作可能に連結されたプロモーターを含有する。原核生物宿主で用いるのに適したプロモーターはphoAプロモーター、ベータ-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、およびtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーターを含む。しかしながら、他の公知の細菌プロモーターが適している。細菌系で用いられるプロモーターは、抗-腫瘍細胞抗原抗体をコードするDNAに操作可能に連結されたシャイン-ダルガルノ(S.D.)配列を含有するであろう。

40

【0263】

プロモーター配列は真核生物について知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子は

50

、転写が開始される部位からほぼ25～30塩基上流に位置するAT-リッチな領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70～80塩基上流に見い出されるもう1つの配列はCNCAAT領域であり、そこでは、Nはいずれのヌクレオチドであってもよい。殆どの真核生物遺伝子の3'末端にはAATAA配列があり、これは、コーディング配列の3'末端に対してポリAテイルの付加のためのシグナルであってよい。これらの配列の全ては、真核生物発現ベクターに適切に挿入される。

#### 【0264】

宿主細胞で用いる適当な促進配列の例は、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのような、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素についてのプロモーターを含む。

10

#### 【0265】

成長条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース資化を担う酵素についてのプロモーター領域である。酵母発現で用いる適当なベクターおよびプロモーターは、EP 73, 657にさらに記載されている。酵母エンハンサーもまた、有利には、酵母プロモーターと共に用いられる。

20

#### 【0266】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗-腫瘍細胞抗原抗体転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、(アデノウイルス2のような)アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、鳥肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスのようなウイルス、最も好ましくは、サルウイルス40(SV40)のゲノムから、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、熱-ショックプロモーターから得られたプロモーターによって制御され、但し、そのようなプロモーターは宿主細胞系に適合するものとする。

#### 【0267】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、便宜には、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即時型プロモーターは、便宜には、HindIII-E制限断片として得られる。ベクターとしてのウシパピローマウイルスを用いて哺乳動物宿主においてDNAを発現するための系は米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾は米国特許第4,601,978号に記載されている。また、単純疱疹ウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でマウス細胞におけるヒトベータ-インターフェロンcDNAの発現については、Reyesら、Nature 297:598-601(1982)参照。別法として、ラウス肉腫ウイルスロングターミナルリピーターはプロモーターとして用いることができる。

30

40

#### 【0268】

##### (v)エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による本発明の抗-腫瘍細胞抗原抗体をコードするDNAの転写は、しばしば、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加される。多くのエンハンサー配列が、今日、哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、アルファ-フェトプロテインおよびインスリン)から知られている。典型的には、しかしながら、真核生物細胞ウイルスからのエンハンサーが用いられるであろう。その例は、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp100-270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーを含む。また、真核生物プロモーターの活性化のためのエレメントの増強に

50

ついては、Yaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照。該エンハンサーは、抗-腫瘍細胞抗原抗体-コーディング配列に対して5'または3'側の位置においてベクターにスプライシングすることができるが、好ましくは、プロモーターから5'側に位置する。

#### 【0269】

##### (vi) 転写終止成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物からの有核細胞)で用いられる発現ベクターは、転写の終止に、およびmRNAを安定化するために必要な配列も含有する。そのような配列は、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'および、場合によっては、3'非翻訳領域から通常は利用可能である。これらの領域は、抗-腫瘍細胞抗原抗体をコードするmRNAの非翻訳部分におけるポリアダニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終止成分はウシ成長ホルモンポリアダニル化領域である。WO94/11026およびそこで発現された発現ベクターを参照されたし。

10

#### 【0270】

##### (vii) 宿主細胞の選択および形質転換

宿主細胞を、抗体の生産のために本明細書中に記載された発現またはクローニングベクターでトランスフェクトし、または形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修飾された慣用的な栄養培地中で培養する。培地、温度、pH等のような培養条件は、過度な実験なくして当業者によって選択することができる。一般には、細胞培養の生産性を最大化するための原理、プロトコルおよび現実的な技術は、Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)およびSambrookら、supraに見出すことができる。

20

#### 【0271】

真核生物細胞トランスフェクションおよび原核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl<sub>2</sub>、CaPO<sub>4</sub>、リポソーム-媒介およびエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いる宿主細胞に依存して、形質転換は、そのような細胞に適切な標準技術を用いて行われる。Sambrookら、supraに記載されたような、塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションは原核生物で一般に使用される。Agrobacterium tumefaciensでの感染は、Shawら、Gene, 23:315(1983)および1989年6月29日に公開されたWO89/05859によって記載されたように、ある種の植物細胞の形質転換で用いられる。そのような細胞壁のない哺乳動物細胞では、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457(1978)のリン酸カルシウム沈殿方法を使用することができる。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingenら、J. Bact., 130:946(1977)およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829(1979)の方法に従って行われる。しかしながら、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンによるような、DNAを細胞に導入するための他の方法を用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら、Methods in Enzymology, 185:527-537(1990)およびMansourら、Nature, 336:348-352(1988)参照。

30

40

#### 【0272】

本明細書中においてベクター中のDNAをクローン化し、または発現するための適当な宿主細胞は、前記した原核生物、酵母、または高等真核生物細胞である。この目的のための適当な原核生物は、グラム-陰性またはグラム-陽性生物、例えば、Escheric

50

hia、例えば、*E. coli*、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Salmonella*、例えば、*Salmonella typhimurium*、*Serratia*、例えば、*Serratia marcescans*、および *Shigella* のような腸内細菌、ならびに *B. subtilis* および *B. licheniformis* (例えば、1989年4月12日に公開された D 266, 710 に開示された *B. licheniformis* 41P) のような *Bacilli*、*P. aeruginosa* のような *Pseudomonas*、および *Streptomyces* のような真正細菌を含む。1つの好ましい *E. coli* クローニング宿主は *E. coli* 294 (ATCC 31, 446) であるが、*E. coli*、*E. coli* X1776 (ATCC 31, 537)、および *E. coli* W3110 (ATCC 27, 325) のような他の株も適当である。これらの例は限定的というよりはむしろ例示的である。

10

## 【0273】

原核生物に加えて、フィラメント状真菌または酵母のような真核生物微生物は抗体 - コーディングベクターのための適当なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* は通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他のものは *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139, 383 Published 2 May 1985); 例えば、*K. lactis* (MW98-8 C、CBS683、CBS4574; Louvencourtら、*J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983])、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC 36, 906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, : 135 (1990))、*K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402, 226) のような *Kluyveromyces* 宿主 (米国特許第 4, 943, 529号 Fleerら、*Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)); *Pichiapastoris* (EP 183, 070; Sreekrishnaら、*J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244, 234); *Neurospora crassa* (Caseら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces occidentalis* (1990年10月31日に公開された P394, 538) のような *Schwanniomyces*; および例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolyposcladium* (1991年1月10日に公開された WO 91/00357) のようなフィラメント状真菌、および *Anidulans* (Ballanceら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburnら、*Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])、および *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) のような *Aspergillus* 宿主を含む。メチル向性酵母がここでは適当であり、限定されるものではないが、*Hansenula*、*Candida*、*Kloeckera*、*Pichia*、*Saccharomyces*、*Torulopsis*, and *Rhodotorula* よりなる属から選択されるメタノール上で成長できる酵母を含む。このクラスの酵母の例示である具体的種のリストは C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982). に見出すことができる。

20

30

40

## 【0274】

グリコシル化抗体の発現のための適当な宿主細胞は多細胞生物に由来する。無脊椎動物

50

細胞の例は *Drosophila* S2 および *Spodoptera* Sf9 のような昆虫細胞、ならびに植物細胞を含む。有用な哺乳動物宿主再母系の例はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) および COS 細胞を含む。より特別な例は SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系 (COS-7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎臓系 (懸濁培養での成長のためにサブクローンされた 293 または 293 細胞、Graham ら、*J. Gen. Virol.*、36 : 59 (1977)) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 77 : 4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞 (IM4, Mather, *Biol. Reprod.* , 23 : 243 - 251 (1980)) ; ヒト胚細胞 (W138、ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065 号) ; およびマウス乳頭腫瘍 (MMT 060562, ATCC CCL 51) を含む。適切な宿主細胞の選択は、当該分野における技量内であるとみなされる。

10

## 【0275】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ピツニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養もまた宿主として利用することもできる。

## 【0276】

しかしながら、注目されるのは脊椎動物細胞において最大であり、培養中の脊椎動物細胞 (組織培養) の増殖はルーチン的手法となっている。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系 (COS-7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎臓系 (懸濁培養での成長のためにサブクローンされた 293 または 293 細胞、Graham ら、*J. Gen. Virol.* 36 : 59 (1977)) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO、Urlaub ら、*Proc. Acad. Sci. USA* 77 : 4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞 (TM4、Mother, *Biol. Reprod.* 23 : 243 - 251 (1980)) ; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587) ; ヒト頸部癌腫細胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442) ; ヒト胚細胞 (W138、ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065) ; マウス乳頭腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51) ; TRI 細胞 (Mother ら、*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 : 44 - 68 (1982)) ; MRC5 細胞 ; FS4 細胞 ; およびヒト肝臓腫系 (Hep G2) である。

20

30

## 【0277】

宿主細胞を、抗 - 腫瘍細胞抗原抗体生産のために前記した発現またはクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適切に修飾された慣用的栄養培地中で培養する。

## 【0278】

## (viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗 - 腫瘍細胞抗原抗体を生産するのに用いた宿主細胞は種々の培地中で培養することができる。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM, Sigma) のような商業的に入手可能な培地は宿主細胞を培養するのに適している。加えて、Ham ら、*Meth. Enz.* 58 : 44 (1979) Barnes ら、*Anal. Biochem.* 102 : 225 (1980) 米国特許第 4,767,704 ; 4,657,866 ; 4,927,762 ; 4,560,655 ; または 5,122,469 ; WO 90/03430 ; WO 87/00195 ; または 米国再発行特許第 30,985 号に記載された培地のいずれも、宿主細胞のための培養基として用いることができる。これらの培地のいずれも、必要に応じて、(インスリン、トランスフェリン、または表皮成長因子のような) ホルモンおよび / または他の成長因子、(塩化

40

50

ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩のような)塩；(HEPESのような)緩衝液、(アデノシンおよびチミジンのような)ヌクレオチド、(GENTAMYCIN・TM・薬物のような)抗生物質、(マイクロモル範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物として定義される)痕跡元素、およびグルコースまたは同等なエネルギー源を補足することができる。当業者に知られているであろういずれの他の必要な補足物も適切な濃度で含めることもできる。温度、pH等のような培養条件は、発現のために選択された宿主で従前に用いられたものであり、当業者に明らかであろう。

#### 【0279】

##### (ix) 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅および/または発現は、本明細書中で提供される配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、慣用的なサザンブロッティング、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロッティング[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)]、ドットブロッティング(DNA分析)、またはイン・サイチュハイブリダイゼーションによって直接的に試料中で測定することができる。別法として、DNAデュプレックス、RNAデュプレックス、およびDNA-RNAハイブリッドデュプレックスまたはDNA-蛋白質デュプレックスを含めた特異的デュプレックスを認識することができる抗体を使用することができる。抗体は、今度は、標識することができ、デュプレックスが表面に結合する場合には、アッセイを行うことができ、従って、表面でのデュプレックスの形成に際して、デュプレックスに結合した抗体の存在を検出することができる。

10

20

#### 【0280】

遺伝子発現は、別法として、細胞または組織セクションの免疫組織化学的染色、および細胞培養または体液のアッセイのような免疫学的方法によって測定して、遺伝子産物の発現を直接的に定量することができる。試料体液の免疫組織化学的染色および/またはアッセイで有用な抗体はモノクローナルまたはポリクローナルいずれであってもよく、いずれかの哺乳動物において調製することができる。便宜には、抗体は、天然配列腫瘍細胞抗原ポリペプチドに対して、あるいは本明細書中で提供されたDNA配列に基づいて合成ペプチドに対してあるいは腫瘍細胞抗原DNAに融合し、および特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製することができる。

30

#### 【0281】

##### (x) 抗-腫瘍細胞抗原抗体精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で、ペリプラズム空間で生産し、あるいは培地に直接的に分泌させることができる。もし抗体が最初の工程として細胞内で生産されるならば、特定のデブリス、宿主細胞または溶解された断片は、例えば、遠心または限外濾過によって除去される。Carterら、Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は、E. coliのペリプラズム空間に分泌される抗体を単離させるための手法を記載する。簡単に述べれば、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、およびフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)の存在下で約30分間にわたって解凍する。細胞デブリスは遠心によって除去することができる。抗体が培地に分泌される場合、そのような発現系からの上清は、一般には、まず、商業的に入手可能な蛋白質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮される。PMSFのようなプロテアーゼ阻害剤を、これまでの工程のいずれかに含めて、蛋白質分解を阻害することができ、抗生物質を含めて、不慮な汚染物の成長を妨げることができる。

40

#### 【0282】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適当性は、抗体に存在するいずれかの免疫グロブリンFcドメインの種およびイソタイプに依存する。プロテインAを用いて、ヒトガンマ1、

50

ガンマ2またはガンマ4重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGが全てのマウスイソタイプについて、およびヒトガンマ3について推奨される(Gussら、EMBO J.: 15671575 (1986))。アフィニティリガンドが付着されるマトリックスは、最もしばしばはアガロースであるが、他のマトリックスも利用できる。制御されたポアガラス、またはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのような機械的な安定なマトリックスは、アガロースで達成できるよりも速い流速および短い処理時間を可能とする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)が精製で有用である。イオン-交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラムのような)アニオンまたはカチオン交換樹脂でのSEPHAROSE<sup>TM</sup>クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿のような蛋白質精製のための他の技術も、回収すべき抗体に応じて利用可能である。

10

#### 【0283】

いずれの予備的精製工程に続いて、注目する抗体および汚染物を含む混合物を、好ましくは、(例えば、約0~0.25M塩からの)低い塩濃度で行われる約2.5~4.5の間のpHの溶質緩衝液を用いる低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに付すことができる。

20

#### 【0284】

##### VI. 医薬処方

本発明に従って用いられるアゴニスト/アンタゴニストまたは抗体分子の治療剤処方は、所望の純度の程度を有する分子を、凍結乾燥処方または水性溶液の形態にて、任意の医薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と混合することによって貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、使用される容量および濃度において受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸のような緩衝液;アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗生物質; (塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンザルコニウム; 塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール; メチルまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン; カテコール; レゾロシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; およびm-クレゾールのような)保存剤; 低分子量(約10未満の残基)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンのような蛋白質; ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンのようなアミノ酸; グルコース、マンノースまたはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物; EDTAのようなキレート化剤; スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールのような糖; ナトリウムのような塩-形成対イオン; 金属錯体(例えば、Zn-蛋白質錯体); および/またはTWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup>またはポリエチレングリコール(PEG)のような非-イオン界面活性剤を含む。好ましい凍結乾燥された抗-腫瘍細胞抗原抗体処方は、ここに明示的に引用して援用するWO 97/04801に記載されている。

30

40

#### 【0285】

該処方は、ここでは、治療すべき特定の適用症に必要な1を超える活性な化合物、好ましくは、相互に悪影響を及ぼさない補充的な活性を持つものを含んでもよい。例えば、別のファミリーメンバーの蛋白質、あるいは選択された腫瘍細胞抗原上の異なるエピトープに結合する抗体を1つの処方中でさらに供するのが望ましいであろう。適当な第二の抗体は、CEA、EGP-1、EGP-2(例えば17-IA)、MUC-2、MUC-3、MUC-4、PAM-4、KC4、TAG-72、EGFR、HER2/neu、BRE3、Le-Y、A3、Ep-CAM、Tn、およびThomson-Friedenr

50

e i c h 抗原、腫瘍壊死抗原、フェリチン、酸性イソフェリチン、テナスシン、癌遺伝子、癌遺伝子産物、I L - 6、I G F - 1、I G F R - 1、血管内皮成長因子 ( V E G H )、胎盤成長因子 ( P I G F )、E D - B フィブロネクチン、および他の血管成長因子のような腫瘍脈管形成抗原、G a 7 3 3、またはその組合せに対する抗体を含むことができる。別法として、第二の抗体は、同一腫瘍細胞抗原に結合するが、別のエピトープを用いるものであってよい。さらなる具体例において、第二の抗体は別の腫瘍細胞抗原に結合することができ、ここに、腫瘍細胞抗原は K I A A 1 8 1 5、L O C 1 5 7 3 7 8、F L J 2 0 4 2 1、D S C D 7 5、G P R 1 6 0、G P C R 4 1、および S L C 1 A 5 の群から選択される。全ての第二の抗体は免疫結合体または裸の抗体であってよく、多価抗体であってよいと考えられる。これらの抗体組合せは、本発明抗体での投与の前に、同時にまたは後に投与することができる。

10

## 【 0 2 8 6 】

別法として、あるいは加えて、組成物は、さらに、化学治療剤、細胞傷害性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗 - ホルモン剤、抗 - 脈管形成剤、および / または心臓保護剤を含むことができる。そのような分子は、意図した目的に効果的である量にて組合せて適切に存在させる。これらの剤は、本発明の抗体での投与の前に、同時に、または後に投与してもよい。

## 【 0 2 8 7 】

イン・ピボ投与で用いるべき処方は滅菌されていなければならない。これは、凍結乾燥および復元に先立って、または続いて、滅菌濾過膜を通じての濾過によって容易に達成される。

20

## 【 0 2 8 8 】

治療組成物は、ここでは、一般に、滅菌アクセストート、例えば、皮下注射針をさすことができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルを有する容器に入れられる。

## 【 0 2 8 9 】

投与の経路は公知の方法、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、関節内、または病巣内経路により注射または注入、局所投与、または徐放系に従う。

## 【 0 2 9 0 】

有効成分は、例えば、各々、コロイド状薬物送達システム ( 例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ - 粒子、およびナノカプセル ) において、またはマイクロエマルジョンにおいて、コアセルベーション技術によって、または界面重合、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセルによって捕獲することもできる。そのような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

30

## 【 0 2 9 1 】

本発明の医薬組成物の用量および所望の薬物濃度は、考えられる特定の使用に応じて変化させ得る。適当な用量または投与の経路の決定は、十分に当業者の技量内のものである。動物実験は、ヒト療法のための有効な用量の決定のための信頼性あるガイドラインを提供する。有効用量の種間スケールリングは、Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら, Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42 - 96. によって公開された原理に従って行うことができる。

40

## 【 0 2 9 2 】

抗 - 腫瘍細胞抗原抗体のイン・ピボ投与を用いる場合、通常の用量は、投与の経路に依存して、1日当たり約 1 0 n g / k g ないし 1 0 0 m g / k g の哺乳動物体重以上、好ま

50

しくは、約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$  ないし  $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$  変化し得る。特定の用量および送達の方法についてのガイドラインは、文献に提供されている；例えば、米国特許第 4, 657, 760 号；第 5, 206, 344 号；または第 5, 225, 212 号参照。異なる処方異なる治療化合物および異なる障害で効果的であり、1つの器官または組織を標的化する投与は、例えば、もう1つの器官または組織に対するものから異なる方法での送達を必要とするであろうと予測される。

#### 【0293】

抗腫瘍細胞抗原抗体の徐放投与は、抗体の投与を必要とするいずれかの病気または障害の治療に適した放出特徴を持つ処方望まれる場合、抗体のマイクロカプセル化が考えられる。徐放の為の組換え蛋白質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン (rhGH)、インターフェロン- (rhIFN-)、インターロイキン-2、および MN rgp 120 で首尾よく行ってきた。Johnsonら、*Nat. Med.*, 2: 795-799 (1996)；Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27: 1221-1223 (1993)；Horaet al., *Bio/Technology*. 8: 755-758 (1990)；Clelland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolid Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462；WO 97/03692、WO 96/40072、WO 96/07399；および米国特許第 5, 654, 010。

10

20

30

#### 【0294】

これらの蛋白質の徐放処方は、その生体適合性、および広い範囲の生分解特性のため、ポリ-乳酸-コグリコール酸 (PLGA) ポリマーを用いて開発された。PLGA、乳酸グリコール酸の分解産物は、ヒト身体内で迅速に浄化できる。更に、このポリマーの分解性は、その分子量および組成に依存して数ヶ月ないし数年調整することができる。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer" in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

#### 【0295】

##### VII. 抗腫瘍細胞抗原抗体での治療

本発明によると、抗腫瘍細胞抗原アゴニスト/アンタゴニストまたは抗体分子を用いて、種々の病気または障害を治療することができると考えられる。例示的な疾患または障害は良性または悪性腫瘍；白血病およびリンパ性悪性疾患；ニューロン、神経膠細胞、星状神経膠細胞、視床下部、腺、マクロファージ、上皮、間質、胞胚腔、炎症、脈関係性および免疫学的障害を含む。

40

#### 【0296】

一般に、治療すべき病気または障害は癌である。ここに治療すべき癌の例は、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性疾患を含む。そのような癌のより特別は例は扁平細胞癌（例えば、上皮扁平細胞癌）、小細胞肺癌、非-小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平癌腫を含めた肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含めた胃癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓腫、乳癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、肝臓癌腫、肛門癌腫、ならびに頭および首癌を含む。

#### 【0297】

癌は、一般には、ここに、抗腫瘍抗原抗体が癌に結合することができるように腫瘍抗原発現細胞を含む。テストおよび対照生物学的試料内の本発明のバイオマーカーおよび

50

、所望により、サイトカインマーカの発現を検出する方法は、核酸または蛋白質レベルいずれかにおけるこれらのマーカの量または存在を決定するいずれかの方法も含む。そのような方法は当該分野でよく知られており、限定されるものではないが、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、ELISA、免疫沈澱、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫組織化学、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写方法、および核酸増幅方法を含む。特別な具体例において、バイオマーカの発現は、例えば、特異的バイオマーカ蛋白質に向けられる抗体を用いて蛋白質レベルで検出される。これらの抗体はウエスタンブロット、ELISA、多重化技術、免疫沈澱、または免疫組織化学技術のような種々の方法で用いることができる。いくつかの具体例において、サイトカインマーカの検出はエレクトロケミルミネセンス( ECL )によって達成される。バイオマーカおよび、所望により、サイトカインマーカについてのこれらの検出方法のいずれかを、臨床情報、慣用的な予後方法、他の腫瘍細胞抗原 関連因子の発現、特に細胞 表面腫瘍細胞抗原の発現、および潜在的可溶性腫瘍細胞抗原の循環レベル、および限定されるものではないが、癌患者についてここで述べたものを含めた、当該分野で知られた臨床的に有用かつ特徴的な予後マーカの発現または存在の評価と組み合わせることができる。このようにして、開示された方法は、その癌またはプレ 悪性疾患が本明細書中に記載された抗 腫瘍細胞抗原治療剤との治療的介入から利益を受けるであろう候補対象のより正確な決定を可能とすることができる。

10

**【0298】**

かくして、いくつかの具体例において、腫瘍細胞抗原 発現新形成細胞に関連する過剰増殖、癌性またはプレ 悪性障害または疾患を有する候補対象を、本明細書中に記載されたエクス・ビボ予後アッセイを用いて注目する抗 腫瘍細胞抗原治療剤に対する応答性についてテストし、そこでは、1以上の腫瘍細胞抗原 媒介活性に対する治療剤の効果は評価される。エクス・ビボ予後アッセイのさらなる改善が望まれる場合、候補対象を、本明細書中にて前記で確認された1以上の腫瘍細胞抗原 関連因子、1以上の臨床的に有用な予後マーカの発現のレベル、またはその発現の不存在について調べることができる。このようにして、腫瘍細胞抗原 発現新形成細胞を含む生物学的試料は候補対象から収集することができる、腫瘍細胞抗原 関連因子および/または注目する臨床的に有用な予後マーカの発現のレベル、またはその発現の不存在について評価することができる。本明細書中に前記にて記載された腫瘍細胞抗原 発現新形成細胞を含むいずれかの生物学的試料をこれらの予後アッセイについて収集することができる。さらに、当業者に知られたいずれかの検出方法を用いて、本明細書中の他の箇所述べた、腫瘍細胞抗原 関連因子および/または臨床的に有用な予後マーカの発現のレベル、またはその発現の不存在を検出することができる。

20

30

**【0299】**

1以上の腫瘍細胞抗原 関連因子の発現レベルが、抗 腫瘍細胞抗原治療剤での治療に応答する癌またはプレ 悪性疾患を有する対象を同定するために評価されるべき場合、生物学的試料を対象から収集し、その試料における発現のレベルを、対照または参照標準におけるその因子(または複数因子)の発現のレベルと比較する。細胞 表面腫瘍細胞抗原の発現レベルでは、腫瘍細胞抗原 発現新形成細胞を含むいずれの生物学的試料も本明細書中に置いて前記したように用いることができる。可溶性腫瘍細胞抗原の循環レベルについては、血液試料、または血漿または血清のような血液成分を含む試料を候補対象から得ることができる。「対照」または「参照標準」とは、同一生物学的源(すなわち、組織または体液)のものであって、病気に悪影響しない健康な対象から癌またはプレ 悪性疾患を有する対象を区別する標準を意図する。当業者は、病気を有しない健康な対象および病気を有する対象におけるこれらの腫瘍細胞抗原 関連因子(すなわち、細胞 表面腫瘍細胞抗原または可溶性腫瘍細胞抗原)の発現レベルの測定を行い、年齢、性別、人種などについて制御し、発現レベルを比較して、健康な対象において予測される発現の標準レベルを決定することによって参照標準を提供することができる。いくつかの具体例において、癌またはプレ 悪性疾患を有する候補対象における発現レベルは、参照標準における発現

40

50

レベルよりも少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100%、150%、200%、250%、300%を超える。抗腫瘍細胞抗原治療剤での治療の適用性は、1以上のこれらの腫瘍細胞抗原関連因子の発現のレベルを検出することによって評価することができ、ここに、参照標準に対する生物学的試料における発現の増大したレベルは、細胞生存および増殖、および/またはADC活性のような腫瘍細胞抗原媒介活性に対する抗腫瘍細胞抗原治療剤のエキス・ピボ効果についてのさらなるスクリーニングを必要とすることなく、注目する抗腫瘍細胞抗原治療剤での治療に対して応答性である癌またはプレ悪性疾患を対象が有することを確立するのに十分である。

#### 【0300】

候補対象から得られた生物学的試料内の本明細書中に記載された注目する腫瘍細胞抗原の存在は、核酸レベルにおいて決定することもできる。発現を評価するための核酸ベースの技術は当該分野でよく知られており、例えば、生物学的試料におけるバイオマーカーmRNAのレベルの決定を含む。多くの発現検出方法は単離されたRNAを用いる。mRNAの単離に対して選択しないいずれのRNA単離技術も、RNAの精製で利用することができる(例えば、Ausubelら、ed.(1987-1999)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons, New York参照)。加えて、例えば、米国特許第4,843,155号に開示された単一工程RNA単離プロセスのような当業者によく知られた技術を用いて、多数の組織試料を容易に処理することができる。

#### 【0301】

かくして、いくつかの具体例において、注目するバイオマーカーまたは他の蛋白質の検出は、核酸プローブを用いて核酸レベルでアッセイされる。用語「核酸プローブ」とは、特別に意図された標的核酸分子例えば、ヌクレオチド転写体へ選択的に結合することができるいずれの分子もいう。プローブは当業者によって合成することができ、あるいは適当な生物学的調製物に由来することができる。プローブは、例えば、放射性標識、蛍光標識、酵素、ケミルミネセントタグ、比色タグ、あるいは前記で議論した、または当該分野で知られた他の標識またはタグで標識されるように特別に設計することができる。プローブとして利用することができる分子の例は、限定されるものではないが、RNAおよびDNAを含む。

#### 【0302】

例えば、単離されたmRNAは限定されるものではないが、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ鎖反応分析およびプローブアレイを含むハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイで用いることができる。mRNAレベルの検出のための1つの方法は、単離されたmRNAを、検出すべき遺伝子によってコードされたmRNAにハイブリダイズすることができる核酸分子(プローブ)と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、長さが少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドであって、ストリンジентな条件下で、バイオマーカー、CD40関連因子、または本明細書中にて前記した臨床的に有用な予後マーカーをコードするmRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドのような、全長cDNA、またはその部分であり得る。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションは、注目するバイオマーカーまたは他の標的蛋白質が発現されつつあることを示す。

#### 【0303】

1つの具体例において、mRNAは固体表面に固定化され、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルに流し、次いで、mRNAをゲルからニトロセルロースのような膜に移すことによってプローブと接触させる。代替具体例において、プローブを固体表面に固定化し、mRNAを、例えば、遺伝子チップアレイにおけるプローブと接触させる。当業者であれば、注目するバイオマーカーまたは他の蛋白質をコードするmRNAのレベルを検出するのに用いられる公知のmRNA検出方法を容易に適合させることができる。試料中の注目するmRNAのレベルを決定する代替方法は、例えば、RT-PCR(例えば、

10

20

30

40

50

米国特許第4,683,202号参照)、リガーゼ鎖反応(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自己維持配列複製(Guatelli et al.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)転写増幅系(Kwoh et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Qベータレプリカーゼ(Lizardi et al.(1988)Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(米国特許第5,854,033号)、またはいずれかの他の核酸増幅方法による核酸増幅、続いての、当業者によく知られた技術を用いる増幅された分子の検出のプロセスを含む。これらの検出スキームは、もしそのような分子が非常に少ない数で存在するのであれば、核酸分子の検出で特に有用である。本発明の特別な態様において、バイオマーカーの発現、あるいは腫瘍細胞抗原関連因子または他の臨床的に有用な予後マーカーの発現を、定量的な発蛍光RT-PCR(すなわち、TaqMan(登録商標)システム)によって評価された。

10

#### 【0304】

注目するRNA発現レベルは、(ノーザン、ドットなどのようなハイブリダイゼーション分析で用いるような)膜プロット、マイクロウェル、試料チューブ、ゲル、ビーズまたは繊維(あるいは結合した核酸を含むいずれかの固体支持体)を用いてモニターすることができる。ここに引用して援用する米国特許第5,770,722号、第5,874,219号、第5,744,305号、第5,677,195号および第5,445,934号参照。発現の検出は、溶液中の核酸プローブを用いることを含むこともできる。

20

#### 【0305】

本発明の1つの具体例において、マイクロアレイを用いて、1以上のバイオマーカー、腫瘍細胞抗原関連因子、および/または臨床的に有用な予後マーカーの発現を検出する。マイクロアレイは、異なる実験の間の再現性のためこの目的に特によく適合する。DNAマイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルの同時測定のための1つの方法を提供する。各アレイは、固体支持体に結合された捕獲プローブの再現性があるパターンよりなる。標識されたRNAまたはDNAを、アレイ上の相補的プローブにハイブリダイズさせ、次いで、レーザー操作によって検出する。アレイ上の各プローブについてのハイブリダイゼーション強度を決定し、相対的遺伝子発現レベルを表す定量的値に変換する。ここに引用して援用する米国特許第6,040,138号、第5,800,992号および第6,020,135号、第6,033,860号、および第6,344,316号参照。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、試料中の非常に多数のRNAについての遺伝子発現プロフィールを決定するのに特に有用である。

30

#### 【0306】

機械的合成方法を用いるこれらのアレイの合成のための技術は、例えば、ここに引用してその全体を援用する。米国特許第5,384,261号に記載されている。平面アレイ表面が好ましいが、アレイは、実質的にいずれの形状の表面の上にも、あるいは多数の表面の上させにも製造することができる。アレイはビーズ、ゲル、ポリマー表面、ファイバーオプティックスのような繊維、ガラス、またはいずれかの他の適当な基材上のペプチドまたは核酸であってよい。その各々を、全ての目的のために、ここに引用して全体を援用する米国特許第5,770,358号、第5,789,162号、第5,708,153号、第6,040,193号および第5,800,992号参照。アレイは、診断剤、あるいは全ての包括的デバイスの他の操作を可能とするように包装することができる。例えば、ここに引用して援用する米国特許第5,856,174号および第5,922,591号参照。

40

#### 【0307】

1つのアプローチにおいて、試料から単離された全mRNAを標識されたcRNAに変換し、ついで、オリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズさせる。各試料を別々のアレイにハイブリダイズさせる。相対的転写体レベルは、アレイ上に、および試料中に存在する適当な対照を参照することによって計算することができる。

50

## 【0308】

癌は腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けることができるが、本出願は、更に、腫瘍抗原 過剰発現癌であると考えられない癌を治療する方法を提供する。癌において腫瘍抗原発現を決定するためには、種々の診断/予後アッセイが利用されない。1つの具体例において、腫瘍抗原過剰発現はIHCによって分析することができる。腫瘍バイオプシーからのパラフィン包埋組織セクションをIHCアッセイに付し、以下のように腫瘍抗原蛋白質染色強度基準に従うことができる：

スコア0

染色は観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される。

## 【0309】

スコア1+

弱い/かろうじて認知可能な膜染色が腫瘍細胞の10%を超えて検出される。細胞はそれらの膜の一部において染色されるに過ぎない。

## 【0310】

スコア2+

弱いないし中程度の完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を超えて観察される。

## 【0311】

スコア3+

中程度ないし強い完全な膜染色が腫瘍細胞の10%を超えて観察される。

## 【0312】

腫瘍抗原過剰発現評価についての0または1+スコアを持つ腫瘍は腫瘍抗原を過剰発現しないと特徴づけることができ、他方、2+または3+スコアを持つ腫瘍は腫瘍抗原を過剰発現すると特徴付けることができる。

## 【0313】

別法として、あるいは加えて、INFORM<sup>TM</sup> (Ventana, Arizによって販売) またはPAHTVISION<sup>TM</sup> (Vysis, Ill.)のようなFISHアッセイをホルマリン 固定されたパラフィン 包埋腫瘍組織で行って、腫瘍における腫瘍抗原過剰発現の(もしあれば)程度を決定することができる。

## 【0314】

さらに、腫瘍抗原過剰発現または増幅は、例えば、検出すべき分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体)のタグを付けた(抗体のような)分子を投与し、標識の局所化について患者を外部でスキャンすることによって、イン・ビボ診断アッセイを用いて評価することができる。

## 【0315】

異なる具体例において、腫瘍抗原は、隣接する健康な組織と、またはプールされた正常な組織と比較する、抗原の発現レベルの比較によって、標的化について選択される。好ましい候補腫瘍抗原は、周囲の正常な組織に対して少なくとも3倍(300%)増加した発現を持つものを含み、ここに、この3倍増加はプールされた商業的に入手可能な正常な組織試料の大部分との比較で見られる。好ましい腫瘍抗原についてのスクリーニングは、正常な隣接組織から癌性組織を切り出すためのレーザー捕獲顕微鏡観察、続いての、標準AffimetrixチップU133(cat#900370)のような標準的な商業的に入手可能なチップを利用する発現マイクロアレイ分析を用いて行うことができる(例えば、Yangら、(2005)Oncogene, 10-31参照)。別法として、癌のタイプによってグループ分けされた患者組織試料のプールに由来する核酸試料を含有する慣用的なチップを作成し、それをプローブして、発現プロファイルを分析することができる(例えば、(Makinora, Dis Esophagus, 2005; 18(1): 37-40参照)。

## 【0316】

治療すべき癌がホルモン独立性癌である場合、腫瘍におけるホルモン(アンドロゲン)および/またはその同族受容体の発現は、例えば、前記したような種々の利用可能なアッ

10

20

30

40

50

セイのいずれかを用いて評価することができる。別法として、あるいは加えて、患者は、それらがもはや抗アンドロゲン療法に応答しない点で、ホルモン独立性癌を有すると診断することができる。

【0317】

ある具体例において、細胞傷害性剤で結合体化した抗腫瘍抗原抗体を含む免疫結合体は患者に投与される。好ましくは、それに対してそれが結合するイムノ結合体および/または腫瘍細胞抗原蛋白質は細胞によって内部化され、その結果、それが結合する癌細胞を殺傷するにおいてイムノ結合体の増大した治療効率がもたらされる。好ましい具体例において、細胞傷害性剤は癌細胞における核酸を標的とし、またはそれに干渉する。そのような細胞傷害性剤の例はメイタンシュノイドカリケアミシン、リボヌクレアーゼおよびDNAエンドヌクレアーゼを含む。

10

【0318】

抗腫瘍細胞抗原抗体またはイムノ結合体は、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、鞘内、経口、局所、または吸入経路によって、例えば、ボラスとして、または一定期間にわたる連続的注入によって、静脈内投与のような公知の方法に従ってヒト患者に投与される。抗体の静脈内または皮下投与が好ましい。

【0319】

他の治療方法は、抗腫瘍細胞抗原抗体の投与と組み合わせることができる。合わせた投与は、別々の処方または単一の医薬処方を用いる共投与、およびいずれかの順序での順次の投与を含み、ここに、好ましくは、双方の（または全ての）活性剤はそれらの生物学的活性を同時に発揮する時間がある（レビュー、Lin et al (2005) Clinical Cancer Research 11:129-138参照）。

20

【0320】

1つの具体例において、本発明の治療は、抗腫瘍細胞抗原抗体（または複数抗体）および異なる化学療法剤のカクテルの共投与を含めた、1以上の化学療法剤または成長阻害剤の組み合わせられた投与を含む。好ましい化学療法剤は（パクリタキセルおよびドセタキセルのような）タキソン、および/またはアントラサイクリン抗体を含む。そのような化学療法剤のための製剤および投与スケジュールは、製造業者の指示に従って、あるいは技量がある実施者によって経験的に決定されたように用いることができる。そのような化学療法についての製剤および投与スケジュールはChemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)に記載されている。

30

【0321】

抗体は、そのような分子について調べた用量で、抗ホルモン化合物；タモキシフェンのような抗エストロゲン化合物；オナプリストンのような抗ホロゲステロン（EP 616 812参照）；フルタミドのような抗アンドロゲンと組み合わせることができる。治療すべき癌がホルモン独立性癌である場合、患者は、従前には、抗ホルモン療法に付されており、癌がホルモン独立性となった後に、抗腫瘍細胞で抗原抗体（および、所望により、本明細書中に記載された他の剤）を患者に投与することができる。

【0322】

代替具体例において、イムノ結合体抗体は、裸の抗体と組合せて用いることができ、ここに、非結合体化抗体はイムノ結合体で用いるのと同様の抗体、または抗体の変種である。裸の抗体は、まず、低親和性または非特異的結合部位に結合し、ブロックする。別法として、もし裸の抗体がADSSまたはCDC活性を有するならば、それを投与して、できる限りこの活性の1つによって標的腫瘍細胞の多くを浄化することができる。次いで、イムノ結合体抗体を投与して、いずれかの残存する腫瘍細胞を殺傷することができる。このようにして、イムノ結合体はより小さな用量で与えることができ、結合体のトキシン部分に関連し得るいずれの副作用も低下させることができる。

40

【0323】

前記共投与された剤のいずれについての適当な用量も現在使用されているものであり、

50

該剤および抗腫瘍細胞抗原抗体の組み合わせた作用（シネルギー）により降下させることができる。

【0324】

病気の予防または治療のためには、適当な用量の抗体は前記定義の治療すべき病気のタイプ、病気の重症度およびコース（抗体が予防的または治療的目的で投与されるかを問わず、抗体が薬物または放射性同位体に結合体化されるかを問わない）、従前の療法、患者の臨床的履歴、および抗体に対する応答、および主治医の裁量に依存するであろう。抗体は、一度に、または一連の治療にわたって患者に適当に投与される。病気のタイプおよび重症度に依存して、約  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  ないし  $15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$ ）の抗体は、例えば、1以上の別々の投与によるか、または連続的注入によるかを問わず、患者への投与のための初期候補用量である。典型的な日用量は、前記した因子に依存して、約  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  ないし  $100 \text{mg} / \text{kg}$  以上の範囲となろう。数日以上にわたる反復投与では、疾患に依存して、病気兆候の所望の抑制が起こるまで、治療は維持される。抗体の好ましい用量は約  $0.05 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $10 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲となろう。かくして、約  $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$  または  $10 \text{mg} / \text{kg}$ （またはそのいずれかの組合せ）の1以上を患者に投与することができる。そのような用量は間欠的に、（例えば、患者が約2～12、例えば、約6用量の抗腫瘍細胞抗原抗体を受けると）、例えば、毎週または3週間毎に投与することができる。用量範囲は約  $0.01 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $40 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $0.01 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $30 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $0.1 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $30 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $1 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $30 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $3 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $30 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $3 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $25 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $3 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $20 \text{mg} / \text{kg}$ 、約  $5 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $15 \text{mg} / \text{kg}$ 、または約  $7 \text{mg} / \text{kg}$  ないし約  $12 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲とすることができる。治療の方法は、治療上有効用量の単一投与、または治療上有効用量の多数投与を含むことができる。加えて、初期のより高い負荷用量、続いて、1以上のより低い用量を投与することができる。例示的な投与方法は、約  $4 \text{mg} / \text{kg}$  の初期負荷用量、続いての、約  $2 \text{mg} / \text{kg}$  の抗腫瘍細胞抗原抗体の腫維持用量を投与することを含む。しかしながら、他の投与方法も有用であり得る。この療法の進行は慣用的な技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

10

20

30

【0325】

本出願では、診断剤/検出剤または治療剤を標的細胞に送達する方法が考えられる。診断/検出剤は、光活性剤、放射性核種またはコントラスト剤のような従前に記載されている剤であってよい。治療剤は放射性核種、免疫モジュレーター、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト、酵素または酵素阻害剤、光活性治療剤、細胞傷害性剤およびその組合せのような従前に記載された剤であってもよい。該方法では、本発明の組成物を供し、それを必要とする患者にそれを投与することが考えられる。本発明の抗生物質またはイムノ結合体は最初に与えることができ血流からの除去に続いて、診断剤/検出剤または治療剤、またはその組合せを含む担体分子を投与することができ、ここに、担体分子は本発明の抗体に結合するであろう。担体分子は本発明の抗体または免疫結合体上の1以上の部位に結合することができる。

40

【0326】

抗体蛋白質の患者への投与とは別に、本出願では、遺伝子療法による抗体の投与が考えられる。抗体をコードする核酸のそのような投与は、表現「治療上有効量の抗体を投与する」によって含まれる。例えば、細胞内抗体を生じさせるための遺伝子療法の使用に関する1996年3月14日に公開されたWO96/07321参照。

【0327】

イン・ピボおよびエクス・ピボで、（所望によりベクターに含有されていてもよい）核酸を患者の細胞に入れる2つの主なアプローチがある。イン・ピボ送達では、通常、抗体が必要とされる部位において、核酸を直接的に患者に注射する。エクス・ピボ治療では、患者の細胞が除去され、核酸がこれらの単離された細胞に導入され、修飾された細胞が直

50

接的に患者に投与されるか、あるいは例えば、多孔性膜内にカプセル化され、これが患者に移植される（例えば、米国特許第4,892,538号および第5,283,187号参照）。核酸を生きた細胞に導入するのに利用できる種々の技術がある。技術は、核酸がイン・ピトロにて培養細胞に導入されるか、あるいは意図した宿主の細胞にイン・ピボで導入されるかに応じて変化する。イン・ピトロにての核酸の哺乳動物細胞への導入に適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿方法等の使用を含む。遺伝子のエクソ・ピボ送達のための通常に使用されるベクターはレトロウイルスである。

#### 【0328】

現在好ましいイン・ピボ核酸導入技術は、（アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、またはアデノ-関連ウイルスのような）ウイルスベクター、および基質-ベースの系（遺伝子の基質-媒介導入のための有用な基質は、例えば、DOTMA, DOPEおよびDC-Cholである）でのトランスフェクションを含む。いくつかの状況においては、細胞表面膜蛋白質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上の受容体に対するリガンドなどのような、標的細胞を標的化する剤と共に核酸源を提供するのが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜蛋白質に結合する蛋白質を、標的化のために、および/または取り込みを容易とするために用いることができる。例えば、特定の細胞型に対して向性であるキャプシド蛋白質、またはその断片、周期において内部化を受ける蛋白質に対する抗体、及び細胞内局所化を標的とし、細胞内半減期を促進する蛋白質。受容体-媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら、*J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); and Wagnerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)によって記載されている。現在公知の遺伝子マーキングおよび遺伝子療法プロトコルのレビューについては、Andersonら、*Science* 256:808-813 (1992)参照。また、WO93/25673およびそこで引用された文献も参照されたし。

#### 【0329】

##### VIII. 安全性の実験

本発明の抗体を、安全性および毒物学的特徴について調べる。これらのタイプの実験についてのガイドラインは、ここに引用して援用する、USDA CBER部門によって発行された書籍、“Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use” ([http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc\\_mab.pdf](http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf)参照)に見出すことができる。一般に、候補抗体は、多数のヒト組織試料および/または単離されたヒト細胞型を用いて前臨床実験でスクリーニングして、非標的組織結合および交差反応性を評価すべきである。これらのヒト組織実験からの満足すべき結果に従い、種々の動物種からの組織試料または単離された細胞のパネルをスクリーニングして、一般的な毒物学的実験で用いるための適当な種を同定することができる。交差反応性動物種が同定されなければ、他のタイプのモデルは適切であると見なすことができる。これらの他のモデルは、ヒト腫瘍細胞がげっ歯類宿主に移植される異種移植片モデルのような実験、または毒物学的実験のために選択された動物種における対応する腫瘍-細胞抗原を認識する代行モノクローナル抗体の使用を含むことができる。これらのタイプの代替モデルからのデータは最初の近似であり、高等な種への進行は注意深くなすべきであることが認識されるべきである。

#### 【0330】

候補裸の抗体については、単純な許容性を見る実験を行うことができる。候補治療抗体のこれらの実験においては、候補分子の治療指標を特徴づける試みは、いずれかの用量-依存性ファルマコダイナミック効果を観察することによってなされる。広い範囲の用量を用いるべきである（例えば、0.1mg/kgないし100mg/kg）。腫瘍細胞抗原の数、交差反応性動物標的に対する候補抗体の親和性の間の差、および抗体の結合についての細胞応答の差は、治療指標を見積るにおいて考慮すべきである。ファルマコダイナミ

ックおよびファルマコキネティック実験は、候補抗体をヒトでテストする場合、適当な動物モデルで行って、ギルド初期用量の考慮を助けるべきである。

【0331】

候補イムノ結合体では、結合体の安定性実験はイン・ビボで行わなければならない。最適には、ファルマコダイナミックおよびファルマコキネティック実験は、イムノ結合体の個々の成分について行って、候補イムノ結合体からのいずれの分解産物の結果も決定すべきである。ファルマコダイナミックおよびファルマコキネティック実験は、適切な動物モデルにおいて前記したように行って、ギルド初期用量の考慮を助けるべきである。薬物を裸の抗体での予備処理と組合せて与える場合、さらなる考慮安全性実験設計に与えなければならない。安全性実験は裸の抗体単独で行わなければならない、実験は、イムノ結合体の最終用量はこのタイプの治療養生法においてはより低いことを銘記しつつ免疫結合体で設計しなければならない。

10

【0332】

ラジオ-イムノ結合体では、動物組織分布実験を行って、生体内分布データを決定すべきである。加えて、投与された放射能の合計量の代謝的分解のカウンティングは、採るべき初期および後期双方の時点で行うべきである。ラジオ-イムノ結合体は、血清または血漿を用いてイン・ビトロにて安全性についてテストすることができ、方法は、遊離放射性核種、ラジオ-イムノ結合体および標識された非-抗体成分を測定するために開発すべきである。

20

【0333】

IX. 製品

本発明のもう1つの具体例において、前記した障害の治療で有用な物質を含有する製品が提供される。該製品は容器、および容器の上の、または容器に会合させたラベルまたは添付文書を含む。適当な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジなどを含む。容器はガラスまたはプラスチックのような種々の材料から形成することができる。容器は疾患を治療するのに有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有することができる（例えば、容器は、皮下注射針が刺すことができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物における少なくとも1つの活性剤は、抗腫瘍細胞抗原抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物は癌のような選択される疾患を治療するのに用いられることを示す。1つの具体例において、ラベルまたは添付文書は、腫瘍細胞抗原に結合する抗体を含む組成物を用いて、腫瘍細胞抗原を発現する癌を治療することができることを示す。また、ラベルまたは添付文書は、組成物を用いて癌を治療することができることを示すことができ、ここに、癌は腫瘍細胞抗原の過剰発現によって特徴付けられない。

30

例えば、HERCEPTIN（登録商標）についての本発明の添付文書は、その腫瘍がErbb2蛋白質を過剰発現する転移性乳癌を持つ患者を治療することを示すが、ここに、添付文書は、抗体または組成物を用いて、腫瘍細胞抗原過剰発現の程度に拘わらず癌を治療することを示すことができる。他の具体例において、添付文書は、抗体または組成物を用いて、乳癌（例えば、転移性乳癌）；ホルモン独立性癌；前立腺癌（例えば、アンドロゲン独立性前立腺癌）；肺癌（例えば、非小細胞肺癌）；結腸、直腸または結直腸癌；本明細書中に開示された他の病気または障害のいずれかを治療することができることを示すことができる。さらに、該製品は（a）そこに含有された組成物を含む第一の容器、ここに、該組成物は、腫瘍細胞抗原に結合し、腫瘍細胞抗原を過剰発現する癌細胞の成長を阻害する第一の抗体を含み；および（b）そこに含有された組成物を含む第二の容器、ここに、該組成物は腫瘍細胞抗原に結合する第二の抗体を含む；を含むことができる。本発明のこの具体例における製品は、更に、該第一および第二の抗体組成物を用いて、癌を治療することができることを示す添付文書を含むことができる。更に、添付文書は（腫瘍細胞抗原に結合する抗体を含む）組成物のユーザーに、療法を、抗体、およびこれまでのセクションに記載された補助的療法のいずれか（例えば、化学療法剤、抗脈関係製剤、抗ホルモン化合物、および/またはサイトカイン）と組み合わせることを支持することが

40

50

できる。別法として、あるいは加えて、該製品は、更に、注射のための静細菌水（B W F I）リン酸 干渉化生理食塩水、リングル溶液及びデキストロース溶液のような医薬上許容される緩衝液を含有する第二の（または第三の）容器を含むことができる。それは、更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針およびシリンジを含めた、商業的およびユーザーの立場から望ましい他の物質を含むことができる。

【0334】

X. 抗腫瘍細胞抗原活性についての非治療的使用

本発明の抗生物質（例えば、抗腫瘍細胞抗原抗体）は、更に、非治療適用を有する。

【0335】

例えば、抗体を親和性精製として用いることができる。このプロセスにおいては、抗体は、当該分野でよく知られた方法を用いて S e p h a d e x 樹脂または濾紙のような固相に固定化する。固定化された抗体を、精製すべき腫瘍細胞抗原蛋白質（またはその断片）を含有する試料と接触させ、その後、支持体を、固定化抗体に結合した、腫瘍細胞抗原蛋白質を除いて試料中の実質的に全ての物質を除去する適当な溶媒で洗浄する。最後に、支持体をグリシン緩衝液 pH 5.0 のようなもう一つの適当な溶媒で洗浄し、これにより、抗体から腫瘍細胞抗原蛋白質が放出される。

【0336】

抗腫瘍細胞抗原抗体もまた、腫瘍細胞抗原蛋白質についての診断アッセイ、例えば、特異的細胞、組織または血清中でのその発現の検出でやはり有用であろう。

【0337】

診断適用では、抗体は、典型的には、検出可能な部位で標識される。一般に、以下のカテゴリーに分類できる多数の標識が利用可能である。

【0338】

(a) これまでに議論したもののような放射性核種。抗体は、Current Protocol in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligenら、Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) に記載された技術を用いて放射性同位体で標識することができ、例えば、放射能をシンチレーションカウンティングを用いて測定することができる。

【0339】

(b) 希土類キレート（ユーロピウムキレート）、また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、リサミン、フィコエリスリンおよびテキサスレッドのような蛍光標識が利用できる。蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology, supra に開示された技術を用いて抗体に結合体化することができる。蛍光はフルオリメーターを用いて定量することができる。

【0340】

(c) 種々の酵素 基質標識が入手可能であり、米国特許第 4,275,149号はこれらのいくつかのレビューを提供する。酵素は、一般には、種々の技術を用いて測定することができる色原体基質の化学的改変を触媒する。例えば、酵素は基質の色の変化を触媒することができ、これは分光学的に測定することができる。別法として、酵素は基質の蛍光またはケミルミネセンスを改変することができる。蛍光の変化を定量するための技術は先に記載した。ケミルミネセント基質は、化学反応によって電子的に励起されるようになり、次いで、（例えば、ケミルミノメーターを用いて）測定することができる光を発することができる、あるいはエネルギーを蛍光アクセプターに供与する。酵素標識の例はルシフェラーゼ（例えば、蛍光ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第 4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRPO）のようなペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、サッカライドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトー

10

20

30

40

50

スオキシダーゼ、およびグルコース 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ)、(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼのような)複素環オキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどを含む。酵素を抗体に結合体化するための技術は、O' Sullivanら、Methods for the Preparation of Enzyme - Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay、in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73: 147 - 166 (1981)に記載されている。

【0341】

酵素 基質組合せの例は、例えば：

(i) 基質としての水素ペルオキシダーゼと共にホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRPO)、ここに、水素ペルオキシダーゼは色素前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン塩酸(TMB))を酸化する；

(ii) 色原体基質としてのパラ ニトロフェニルリン酸と共にアルカリホスファターゼ(AP)；および

(iii) 色原体基質(例えば、p - ニトロフェニル ベータ D - ガラクトシダーゼ)または発蛍光性基質4 - メチルウンベリフェニル ベータ D - ガラクトシダーゼと共にベータ D - ガラクトシダーゼ(ベータ D - Gal)。

【0342】

多数の他の酵素 基質組合せが当業者に入手可能である。これらの一般的レビューについては、米国特許第4, 275, 149号および第4, 318, 980号参照。

【0343】

時々、標識は抗体に間接的に結合体化される。当業者であれば、これを達成するための種々の技術に気が付くであろう。例えば、抗体をビオチンに結合体化することができ、前記した標識の3つの広いカテゴリーにいずれかをアビジンに結合体化することができ、または逆もできる。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、かくして、標識を間接的に抗体に結合体化することができる。別法として、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成するためには、抗体を小さなハプテン(例えば、ジゴキシン)と結合体化させ、前記した異なるタイプの標識の一つを抗 ハプテン抗体(例えば、抗 ジゴキシン抗体)と結合体化させる。かくして、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成することができる。

【0344】

本発明のもう1つの具体例において、抗 - 腫瘍細胞抗原抗体は標識される必要がなく、その存在は、腫瘍細胞抗原抗体に結合する標識された抗体を用いて検出することができる。

【0345】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接のおよび間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈澱アッセイのようないずれの公知のアッセイ方法においても使用することができる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147 - 158 (CRC Press, Inc. 1987)。

【0346】

免疫組織化学については、腫瘍試料は新鮮なものであるか、または凍結されていてもよく、あるいはパラフィンに包埋し、例えば、ホルマリンのような保存剤で固定されていてもよい。

【0347】

抗体はイン・ビボ診断アッセイで用いることもできる。一般には、抗体は、腫瘍が医務のシンチグラフィを用いて局所化することができるように、放射性核種で標識される。便宜な事項として、本発明の抗体はキット、すなわち、診断アッセイを行うための指示書

10

20

30

40

50

と所定量の試薬のパッケージされた組合せにて提供することができる。抗体を酵素で標識する場合、該キットは、酵素によって必要とされる基質及び補因子（例えば、検出可能なクロモフォアまたはフルオロフォアを供する基質前駆体）を含むであろう。加えて、安定化剤、緩衝液（例えば、ブロック緩衝液または溶解緩衝液等）のような他の添加剤を含めることができる。種々の試薬の相対数を広く変化させて、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度を供することができる。特に、試薬は、溶解に際して、適当な濃度を有する試薬溶液を供するであろう賦形剤を含めた、通常は凍結乾燥された乾燥粉末として供することができる。

【0348】

本発明のさらなる詳細は、以下の非-限定的実施例によって説明される。明細書中の全ての引用の開示はここに引用して援用する。

【実施例】

【0349】

（実施例1）

標的化のための腫瘍関連抗原の選択

A. 腫瘍性細胞および隣接する正常なもののレーザー切開、および切開した細胞からのRNAの生産

正常および癌性組織を、レーザー捕獲マイクロ切開(LCM)を用いて蛋白質から収集し、当該分野で良く知られた技術を用い、RNAをこれらの組織から調製した(例えば、Ohyama et al. (2000) *Biotechniques* 29:530-6; Curran et al. (2000) *Mol. Pathol.* 53:64-8; Suarez-Quian et al. (1999) *Biotechniques* 26:328-35; Simone et al. (1998) *Trends Geriatrics* 14:272-6; Conia et al. (1997) *J. Clin. Lab. Anal.* 11:28-38; Emmert-Buck et al. (1996) *Science* 274:998-1001参照)。LCMは実質的に均質な細胞試料を供するための特異的細胞型の単離を供するので、これは同様に純粋なRNA試料を提供する。

【0350】

B. マイクロアレイ分析

cDNAの生産：次いで、切開した細胞から生産された全RNAを用いて、Affymetrix 2-サイクルcDNA合成キット(cat#900432)を用いてcDNAを生じさせた。8 $\mu$ Lの全RNAを、11 $\mu$ L反応中の1 $\mu$ L T7-(dT)<sub>24</sub>プライマー(50ピコモル/ $\mu$ L)と共に用い、これを70 $^{\circ}$ Cまで12分間で加熱した。次いで、混合物を5分間で室温まで冷却した。9 $\mu$ Lマスターミックス(4 $\mu$ L 5 $\times$ 第一ストランドcDNA緩衝液、2 $\mu$ Lの0.1M DTT、1 $\mu$ L 10mM dNTPミックス、2 $\mu$ L Superscript II(600U/ $\mu$ L))を加え、混合物を42 $^{\circ}$ Cにて2.5時間インキュベートした(混合物の全容量は20 $\mu$ Lであった)。氷上での冷却に続き、第二ストランドの合成は以下のように完了した：前記からの20 $\mu$ L混合物は130 $\mu$ Lの第二ストランドマスターミックス(91 $\mu$ L水、30 $\mu$ L 5 $\times$ 第二ストランド反応緩衝液、3 $\mu$ L 10mM dNTPミックス、1 $\mu$ L 10U/ $\mu$ L E. coli DNAリガーゼ、4 $\mu$ L 10U/ $\mu$ L E. coli DNAポリメラーゼI、1 $\mu$ L 2U/ $\mu$ L E. coli Rnase H)と混合し、16 $^{\circ}$ Cにて2時間、および10分間インキュベートした。氷上での冷却に続き、dsDNAは反応混合物から精製した。簡単に述べると、QiaQuick PCT精製キットを用い(Qiagen, cat#28104)、および5容量の緩衝液PBを1容量のcDNA混合物に加えた。次いで、cDNAをQIAquick スピнкаラムにて製造業者の指示に従って精製し、60 $\mu$ Lの最終容量を得た。

【0351】

ビオチン-標識cRNAの生産。次いで、前記で生じ、精製されたcDNAを用い、ビオチン標識RNAを以下のように作製した：QIAquick カラムから回収された60

10

20

30

40

50

$\mu\text{L}$ のcDNAを、培地加熱スピード真空中の $22\mu\text{L}$ の容量まで低下させた。次いで、これを、ENZO BioArray High Yield RNA Transcriptionキット(cat#4265520)と共に用いた。簡単に述べれば、 $4\mu\text{L}$   $10\times\text{HY}$ 反応緩衝液、 $4\mu\text{L}$   $10\times$ ピオチン-標識リボヌクレオチド、 $4\mu\text{L}$ のDTT、 $4\mu\text{L}$  Rnase阻害剤ミックス、および $2\mu\text{L}$  T7 RNAポリメラーゼを含有するマスターミックスを、 $22\mu\text{L}$ の精製されたcDNAに加え、37にて4~6時間インキュベートした。次いで、製造業者の指示に従い、Qiagen RNasyキット(cat#74104)を用い、反応を精製した。

#### 【0352】

cRNAの断片化。前記からの $15\sim 20\mu\text{g}$ のcRNAを $8\mu\text{L}$ の $5\times$ 断片化緩衝液( $200\text{mM}$  Tris 酢酸、 $\text{pH}8.1$ 、 $500\text{mM}$ 酢酸カリウム、 $150\text{mM}$ 酢酸マグネシウム)および水と $40\mu\text{L}$ の最終容量まで混合した。混合物を94にて35分間インキュベートした。典型的には、この断片化プロトコルは、 $35\sim 200$ 塩基のサイズの範囲のRNA断片の分布を生じる。断片化は、TAEアガロース電気泳動を用いて確認した。

10

#### 【0353】

アレイハイブリダイゼーション。次いで、前記からの断片化cRNAを用いて、ハイブリダイゼーションカクテルを作成した。簡単に述べると、前記からの $40\mu\text{L}$ を $1\text{mg}/\text{mL}$ ヒトCotDNAおよび適当な対照オリゴヌクレオチドと混合した。加えて、 $3\text{mg}$ のニシン精子DNA( $10\text{mg}/\text{mL}$ )を、 $150\mu\text{L}$   $2\times$ ハイブリダイゼーション緩衝液( $100\text{mM}$  MES、 $1\text{M}$  NaCl、 $20\text{mM}$  EDTA、 $0.01\%$  Tween-20)および水と共に、 $300\mu\text{L}$ の最終容量まで加えた。次いで、 $200\mu\text{L}$ のこの溶液をU133アレイ(Affymetrix cat#900370)に負荷し、 $45\text{rpm}$ の一定スピードにて45にて一晩インキュベートした。次いで、ハイブリダイゼーション緩衝液を除去し、アレイを洗浄し、製造業者のプロトコルに従い、GeneChip Fluidics Station 450(Affymetrix, cat#00-0079)を用いて $200\mu\text{L}$ 非-ストリンジェント洗浄緩衝液( $6\times\text{SSPE}$ 、 $0.01\%$  Tween-20)で染色した。

20

#### 【0354】

走査アレイ。次いで、前記からのアレイを、製造業者のプロトコルに従い、GeneChip Scanner 3000(Affymetrix cat#00-0217)を用いて走査した。

30

#### 【0355】

潜在的腫瘍細胞抗原標的の選択。腫瘍細胞(原発性腫瘍または転移いずれか)vs 隣接健康組織における抗原の発現レベルの比較、またはプールされた正常組織との比較によって、腫瘍抗原を標的化について選択した。選択された腫瘍抗原は、種々の正常の組織に対する少なくとも3倍( $300\%$ )増大した発現を示し、ここに、この3倍増加は、プールされた商業的に入手可能な正常な組織試料(参照標準ミックスまたはRSM、プールは各組織タイプについて作製される)の大部分と比較して見られる。以下の表2が、KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、and SLC1A5についてのアレイ分析からの倍増加データを示し、ここに、数は、正常な組織と比較した発現の2-、3-、または5-倍増加を示した分析された患者試料のパーセントを表す。

40

#### 【0356】

表2 - KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、and SLC1A5についてのマイクロアレイ結果

#### 【0357】

【表 2 - 1】

表 2a- FLJ23390

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	25	20	4	0
結腸転移 vrs 正常 RSM	33	0	0	0
乳房原発性 vrs 正常 RSM	20	100	75	25
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	22	0	0	0
前立腺原発性 vrs 正常	17	6	6	0

10

表 2b- LOC157378

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	26	50	23	9
結腸転移 vrs 正常 RSM	32	50	44	22
乳房原発性 vrs 正常 RSM	49	24	6	2
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	21	14	0	0
前立腺原発性 vrs 正常	15	40	7	0

20

30

表 2c- FLJ20421

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	26	35	15	0
結腸転移 vrs 正常 RSM	33	24	3	0
乳房原発性 vrs 正常 RSM	50	70	40	14
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	22	14	5	0
前立腺原発性 vrs 正常	17	24	0	0

40

【 0 3 5 8 】

【表 2 - 2】

表 2d- DCSD75

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	27	52	37	7
結腸転移 vrs 正常 RSM	33	76	36	9
乳房原発性 vrs 正常 RSM	49	22	2	0
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	22	5	0	0
前立腺原発性 vrs 正常	16	12	0	0

表 2e- GPR160

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	26	23	8	0
結腸転移 vrs 正常 RSM	33	12	0	0
乳房原発性 vrs 正常 RSM	46	24	9	0
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	22	36	9	5
前立腺原発性 vrs 正常	17	59	24	6

表 2f- GPCR41

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	23	48	17	4
結腸転移 vrs 正常 RSM	30	77	50	13
乳房原発性 vrs 正常 RSM	43	63	40	23
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	0	0	0	0
前立腺原発性 vrs 正常	3	33	33	33

【 0 3 5 9 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

表 2g- SLC1A5

患者のタイプ	患者数	2-倍増加	3-倍増加	5-倍増加
結腸原発性 vrs 正常 RSM	26	15	4	0
結腸転移 vrs 正常 RSM	31	13	0	0
乳房原発性 vrs 正常 RSM	39	18	3	0
前立腺原発性 vrs 正常 RSM	1	100	0	0
前立腺原発性 vrs 正常	6	67	50	33

## (実施例 2) - 癌性 v s 正常組織の発現分析

実施例 1 で用いたマイクロアレイ手法を用いて、多数の癌性腫瘍タイプおよび多数の正常試料からの組織における発現を広く探した。cDNA、RNA の生産、およびハイブリダイゼーション条件は、U133 Plus 2.0 アレイを用いた (Affymetrix cat # 900470) 以外は、実施例 1 で用いた全てのものであった。Decision Site Software (Spotfire, Somerville, MA) およびイン-ハウス開発 Pipeline Pilot (SciTeGic, San Diego, CA, in-house developer Joseph Ringgenberg) プロトコルを用いて、図 1 ~ 6 に示したグラフ表示を作製した。グラフ表示においては、正常なおよび癌性組織タイプは水平軸に沿って置かれた。癌性組織を「c」で標識し、例えば、(乳癌組織試料を表す「c 乳房管」)、正常組織を同様に「n」で現す。組織タイプは、さらに、もし知られていれば、組織のタイプおよびサブタイプに関して標識される。例えば、「c 乳房管」は、乳房管に局所化された乳癌からの癌性組織である。もしサブタイプが外科的除去の間に明瞭でないか、または未知であったならば、標識は「非-特異的」については「ns」という。垂直軸上の各スポットは単一患者からの組織試料を表し、垂直軸上の各スポットの高さ (log<sub>2</sub> ベース) は、プローブ組の相対的発現レベルを表す。塗り潰した丸は、直線状検出範囲における発現レベルを持つ試料を表す。塗り潰していない丸は試料における遺伝子発現についての上方限界を表し、ここに、遺伝子がプローブ組の検出限界未満であった。塗りつぶしていない四角は、プローブ組が飽和された試料における遺伝子発現についての下方限界を表す。簡単に述べれば、分析を行う前に、試料の大きな多様な組を横切ったその構成プローブの挙動を分析することによってキャリブレーションした。このキャリブレーションは各プローブの相対的感度、およびプローブ組の応答がプローブの間で直線上である強度の範囲を決定する。この範囲未満の強度は「未検出」と呼ばれ、他方、それを超える強度は「飽和した」と呼ばれる。ハイブリダイゼーションの変動、および試料間の標識効率のため、各チップはキャリブレーションを適用する後に正規化される。

## 【0360】

## (実施例 3) - 腫瘍細胞抗原の細胞外ドメインの分析

前記腫瘍細胞抗原の同定に続き、蛋白質のトポロジーを分析して、理論的細胞外ドメインを同定した。2つの分析アルゴリズムを用いたが、これは膜貫通ドメインを予測するものであり、結果を比較した。第一のものは TMpred であった (K. Hofmann & W. Stoffel (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 166 参照)。用いた第二の分析プログラムは

TMHMM (A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer. Predicting transmembrane and protein topology with a hidden Markov mode: Application to complete genomes. Journal of Molecular Biology, 305 (3): 567 - 580, January 2001)であった。腫瘍細胞抗原の各々についての結果を表3において以下に示す。一般には、分析の2つの組からの結果はかなり良く合致しているが、いくつかの場合においては、アルゴリズムは、確実性をもって、1つのトポロジ-的向きをもう1つの向きから予測できなかった。それらの場合において、双方の向きをリストする。表3は推定膜貫通ラセン(TMラセン)の位置、ならびに原形質膜の外側または内側いずれかに位置する蛋白質の理論的部分を示す。加えて、SignalP3.0 (Bednstenら、(2004) J Mol Biol. 2004 Jul 16; 340 (4): 783 - 95)を用いて、シグナルペプチドの存在を予測し、それらのペプチドがどこで全長蛋白質から切断されるであろうかを予測した。細胞の外側の蛋白質の部分は、抗体相互作用についての標的として働くことができた。

10

【0361】

【表3-1】

表 3a- KIAA1815: アクション番号 NP\_079172, 902 aas.

TMHMM		IMpred	
ロケーション	位置	ロケーション	位置
外側	1 - 408	外側	1- 74
TM ラセン	409 - 431	TM ラセン	75 - 92
内側	432 - 450	内側	93 - 398
TM ラセン	451 - 473	TM ラセン	399 - 422
外側	474 - 487	外側	422
TM ラセン	488 - 510	TM ラセン	418 - 436
内側	511 - 521	内側	437- 462
TM ラセン	522 - 544	TM ラセン	463 - 487
外側	545 - 548	外側	488 - 489
TM ラセン	549 - 568	TM ラセン	490- 512
内側	569 - 579	内側	513 - 537
TM ラセン	580 - 602	TM ラセン	538 - 564
外側	603 - 621	外側	565 - 581
TM ラセン	622 - 644	TM ラセン	582 - 602
内側	645 - 650	内側	603 - 623
TM ラセン	651 - 673	TM ラセン	624 - 641
外側	674 - 904	外側	642 - 653
		TM ラセン	654 - 674
		内側	675- 904

20

30

40

SignalP3.0はシグナルペプチドが無いことを予測した。

【0362】

【表 3 - 2】

表 3b- BC017881: アクション番号 NP\_919267, 240 aas

TMHMM		IMpred #1		IMpred #2	
ロケーション	位置	ロケーション	位置	ロケーション	位置
内側	1 - 116	内側	1- 117	外側	1- 117
TM ラセン	117 - 139	TM ラセン	118 - 142	TM ラセン	118 - 143
外側	140 - 142	外側	143 - 148	内側	144
TM ラセン	143 - 165	TM ラセン	149 - 167	TM ラセン	145 - 164
内側	166 - 206	内側	168 - 211	外側	165- 211
TM ラセン	207 - 229	TM ラセン	212 - 230	TM ラセン	212 - 232
外側	230 - 240	外側	231 - 240	内側	233 - 240

SignalP 3.0 は aa 1- 48 からのシグナルペプチドを予測した。

表 3c- FLJ20421: アクション番号 AAH67814, 359 aas.

TMHMM		IMpred #1		IMpred #2	
ロケーション	位置	ロケーション	位置	ロケーション	位置
内側	1 - 6	内側	1- 9	外側	1 - 7
TM ラセン	7 - 29	TM ラセン	10 - 28	TM ラセン	8 - 28
外側	30 - 359	外側	29 - 359	内側	29 - 359

SignalP 3.0 は aa 1- 50 からのシグナルペプチドを予測した。

表 3d- DSCD75: アクション番号 AAF65450, 208 aas

TMHMM		IMpred #1		IMpred #2	
ロケーション	位置	ロケーション	位置	ロケーション	位置
内側	1	内側	0	外側	0
TM ラセン	2 - 24	TM ラセン	1 - 19	TM ラセン	1 - 19
外側	25 - 208	外側	20 - 208	内側	20 - 208

SignalP 3.0 は aa 1 ~ 30 からのシグナルペプチドを予測した。

【 0 3 6 3 】

【表 3 - 3】

表 3e- GPR160: アミノ酸番号 NP\_055188, 338 aas

TMHMM		IMpred	
ロケーション	位置	ロケーション	位置
外側	1 - 21	外側	1- 25
TM ラセン	22 - 44	TM ラセン	26 - 43
内側	45 - 56	内側	44 - 56
TM ラセン	57 - 79	TM ラセン	57 - 79
外側	80 - 93	外側	80 - 93
TM ラセン	94 - 116	TM ラセン	94 - 121
内側	117 - 136	内側	122 - 136
TM ラセン	137 - 156	TM ラセン	137 - 156
外側	157 - 175	外側	157 - 182
TM ラセン	176 - 198	TM ラセン	183 - 199
内側	199 - 239	内側	200 - 243
TM ラセン	240 - 262	TM ラセン	244 - 265
外側	263 - 276	外側	266 - 276
TM ラセン	277 - 294	TM ラセン	277 - 294
内側	295 - 338		

10

20

SignalP 3.0 は aa 1 ~ 38 からのシグナルペプチドを予測した。

【 0 3 6 4 】

【表 3 - 4】

表 3f- GPCR41: アクセシオン番号 AAH02917, 445 aas

TMHMM		IMpred	
ロケーション	位置	ロケーション	位置
内側	1 - 8	内側	1 - 8
TM ラセン	9 - 31	TM ラセン	9 - 30
外側	32 - 45	外側	31 - 49
TM ラセン	46 - 68	TM ラセン	50 - 68
内側	69 - 80	内側	69 - 111
TM ラセン	81 - 103	TM ラセン	112 - 133
外側	104 - 112	外側	134 - 145
TM ラセン	113 - 135	TM ラセン	146 - 167
内側	136 - 146	内側	168 - 194
TM ラセン	147 - 169	TM ラセン	195 - 211
外側	170 - 195	外側	212 - 270
TM ラセン	196 - 218	TM ラセン	271 - 297
内側	219 - 275	内側	298 - 311
TM ラセン	276 - 298	TM ラセン	312 - 339
外側	299 - 307	外側	339
TM ラセン	308 - 330	TM ラセン	335 - 359
内側	331 - 336	内側	360 - 370
TM ラセン	337 - 359	TM ラセン	371 - 389
外側	360 - 368	外側	390 - 403
TM ラセン	369 - 391	TM ラセン	404 - 424
内側	392 - 403	内側	425 - 445
TM ラセン	404 - 426		
外側	427 - 445		

10

20

30

SignalP 3.0 は aa 1 ~ 25 からのシグナルペプチドを予測した。  
【 0 3 6 5 】

【表 3 - 5】

表 3g- SLC1A5: アクセション番号 AAH00062, 541 aas

TMHMM		IMpred	
ロケーション	位置	ロケーション	位置
内側	1 - 52	内側	1 - 50
TM ラセン	53 - 75	TM ラセン	51 - 72
外側	76 - 94	外側	73 - 98
TM ラセン	95 - 117	TM ラセン	99 - 119
内側	118 - 129	内側	120 - 126
TM ラセン	130 - 152	TM ラセン	127 - 145
外側	153 - 227	外側	146 - 227
TM ラセン	228 - 245	TM ラセン	228 - 246
内側	246 - 264	内側	247 - 264
TM ラセン	265 - 287	TM ラセン	265 - 284
外側	288 - 301	外側	285 - 304
TM ラセン	302 - 324	TM ラセン	305 - 329
内側	325 - 336	内側	330 - 335
TM ラセン	337 - 359	TM ラセン	336 - 361
外側	360 - 378	外側	362 - 376
TM ラセン	379 - 401	TM ラセン	377 - 404
内側	402 - 413	内側	405 - 413
TM ラセン	414 - 436	TM ラセン	414 - 432
外側	437 - 541	外側	433 - 541

10

20

SignalP 3.0 は aa 1 ~ 35 からのシグナルペプチドを予測した。

30

## 【0366】

(実施例 4) - KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPF160、GPCR41、および SLC1A5 に対するモノクローナル抗体の生産

A. KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPF160、GPCR41、および SLC1A5 の PCR クローニング

RNA は、実質的には、Chirgwin ら、Biochemistry (1979) 17:5294 によって記載されているように、癌細胞抗原を発現するヒト癌細胞の集団から単離されるであろう。簡単に述べれば、細胞はリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、0.7 M 2-メルカプトエタノールの存在下で 5 M チオシアン酸グアニジウム中で溶解させた。細胞溶解物を不連続な CsCl グラジエント (Chirgwin et al.) 上に重ね、Beckman SW28 ローター中で、26,000 rpm において 16 時間遠心した。ペレットを DEPC-処理水中に溶解させることによって、RNA を回収する。RNA をエタノールで 1 回沈殿し、DEPC-処理水に再懸濁し、-70 で貯蔵した。

40

## 【0367】

500 ユニットの MLV-RT (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.)、5 μM ランダムヘキサマー (Pharmacia, Piscataway, N.J.)、1 mM DTT、dNTP ミックス (各々、0.5 mM)、10 mM Tris-HCl pH 8.3、50 mM KCl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub> および 0.1 mg/ml BSA (ウシ血清アルブミン) を含有する

50

50  $\mu$ l 反応緩衝液中でのランダムヘキサマープライミングを用い、全RNA (10  $\mu$ g / 反応) をcDNAに変換する。37 での1時間のインキュベーションの後、試料を3分間沸騰し、-70 で貯蔵する。KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、およびSLC1A5分子をコードするDNAを、公知のKIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、およびSLC1A5配列に対する相同性を有する配列を含有するプライマーを用いるPCRによって生じさせ、ここに、プライマーはクローニングに有用な制限部位もコードした。これらのプライマーは、KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、およびSLC1A5についての公表されたcDNAコーディング配列に基づく。全てのプライマーは5'末端においてC-Gクランプで、続いて、クローニング用の制限部位で開始する。

10

**【0368】**

PCR増幅のために、1  $\mu$ lのcDNAを、1  $\mu$ l (10ピコモル)の順方向プライマー、1  $\mu$ l (10ピコモル)の逆方向プライマー、および47  $\mu$ lのPCRミックスと混合する。PCRミックスは、1.25ユニットのTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, Conn.)、dNTPミックス (各々0.2 mM)、10 mM Tris-HCl pH 8.3、50 mM KCl、2.5 mM MgCl<sub>2</sub> および0.1 mg/ml BSAよりなるものである。50  $\mu$ lのPCR混合物に70  $\mu$ lの鉱油を重ね、Perkin-Elmer/Cetusサーモサイクラーでの25サイクルの増幅に付す (30秒間の95 における変性、30秒間の55 におけるプライマーアニーリングおよび1.5分間の72 における伸張)。PCR産物は25増幅サイクルの後に得られる。

20

**【0369】**

増幅産物はサイズ-分画によって単離される。バキュロウイルスにおける発現の前に、配列決定分析によって各断片のDNA配列を確認して、PCR-誘導突然変異の導入を防ぐ。

**【0370】**

増幅された断片を適当な発現ベクター (例えば、バキュロウイルス発現系で用いられるpAcc8ベクター) に連結する。連結産物を細菌株DH5 (Gibco/BRL, Gaithersburg Md.) に形質転換し、組換えpAcc8ベクターをアンピシリン耐性に基づいて選択する。組換えプラスミドを細菌クローンから単離し、(Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratories), 1982; Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (Media, Pa.: John Wiley and Sons))、注目するインサートの存在を、ポリメラーゼ鎖反応を用いて確認する (前記参照)。大規模なプラスミド調製は標準的な手法によって行う (Ausubel et al.; Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratories), 1989) によって行う。

30

40

**【0371】**

B. ヒトKIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、およびSLC1A5のバキュロウイルス発現  
KIAA1815、LOC157378、FLJ20421、DSCD75、GPR160、GPCR41、およびSLC1A5をコードする配列を、注目する全長DNA分子を含む導入ベクターを用いて、Autographa californicaバキュロウイルス (AcNPV) に個々に組み換える。プラスミドを野生型バキュロウイルスDNA (2~10 pfu) (AcNPV; Summersら、A Manual of Me

50

thods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987)) で、 $10^6$  細胞/mL の密度にて Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞に共トランスフェクトする (Summers et al.)。組換えバキュロウイルス - 感染 Sf9 細胞を同定し、クローンにより精製する (Summers et al.)。組換え蛋白質の細胞表面発現については、細胞を 48 時間の培養後に収穫する。

#### 【0372】

##### C. 宿主動物免疫化

雌 BALB/c マウスに、注目する遺伝子を含むウイルス、またはいずれかのインサートを欠如する対照ウイルスで感染させた  $5 \times 10^6$  Sf9 細胞で 0 日および 14 日に腹腔内注射する。21 日に、 $100 \mu\text{l}$  の血清が得られて、特異的抗体についてテストした。少なくとも 2 週間の残りの期間の後、マウスは組換え体または対照で感染させた Sf9  $5 \times 10^6$  細胞での最終の注射を受ける。この最後の注射から 3 日後、脾臓細胞と細胞融合のために用いる。

#### 【0373】

##### D. ハイブリドーマクローンの作製

免疫化された BALB/c マウスからの脾臓細胞を、de Boerら、J. Immunol. Meth. (1988) 113: 143 によって従前に記載されているように、50% ポリエチレングリコールを用い、10:1 の比率にて SP2/0 ネズミミエローマ細胞と融合させる。融合した細胞を、ヒポキサンチン ( $0.1 \text{ mM}$ )、アミノプテリン ( $0.01 \text{ mM}$ )、チミジン ( $0.016 \text{ mM}$ ) および  $0.5 \text{ ng/ml}$  hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Mass.) を細くした完全 IMDM 培地に再懸濁させる。次いで、各々が平均して単一の成長するハイブリドーマを含むように、96-ウェル組織培養プレートのウェルの間に融合した細胞を分配する。

#### 【0374】

10~14 日後に、ハイブリドーマ集団の上清を特異的抗体生産についてスクリーニングする。 $0.5 \text{ ng/ml}$  hIL-6 を含有する IMDM/FBS 中での限界希釈によって、陽性ハイブリドーマ細胞を 3 回クローン化する。

#### 【0375】

##### E. ファージディスプレイまたはトランスジェニック動物技術の使用

ハイブリドーマ技術を解する抗体作製の使用に対する別のアプローチとして、ディスプレイ技術を用い、あるいはトランスジェニック動物の使用を通じて、本発明の抗体を作製することができる。

#### 【0376】

ヒト抗体の精製で現在用いられるいくつかの種類ディスプレイ技術がある (Hoogenboom (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1105-1116 参照)。ファージディスプレイは、本発明のヒト抗体を作製するのに用いることができる 1 つの特異的タイプのディスプレイ技術である。最初のパニングラウンドは、 $1 \sim 20 \mu\text{g}$  の精製された腫瘍細胞抗原を用いて行って、ELISA プレートのウェルを被覆することができる。一般には、ウェル当たり  $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$  pfu の濃度にて、ファージライブラリーを加える (ファージライブラリーの構築に関連する方法、およびより詳細なプロトコルの情報については、例えば、P. M. O'Brien and R. Altken, Antibody Phage Display Humana Press, 2001 参照)。インキュベーションに続き、ウェルを洗浄し、結合したファージを、塩または低 pH グリシン溶液を用いて溶出させる。次いで、細菌を完成させることによって溶出したファージを増幅させ、次いで、増幅させ精製したファージ粒子を引き続いてのパニングラウンドで用いる。所望であれば、腫瘍細胞抗原を発現する細胞に対する細胞 - ベースのパニングのような、他のパニング技術を行うことができる。

10

20

30

40

50

別法として、液体 - ベースのパニングプロトコルを行うことができる。しばしば、より低い濃度の精製された抗原を、後のパニングラウンドで用いて、より高いアフィニティー抗体の選択を駆動することができる。実行すべきパニングのラウンドの数は、標的およびライブラリーに従って変化させる。固相でのパニング、および全細胞でのパニングのようなパニング技術もまたは、別のラウンドで用いることができる。一旦、所望の性質を持つ抗体を生じる抗体クローンが同定されたならば、その抗体をコードする遺伝子をファージから単離し、種々の細菌、真菌または哺乳動物細胞ベースの発現系で発現させることができる。

#### 【0377】

トランスジェニックマウスを用いるヒト抗体の作製では、動物を精製された腫瘍細胞抗原で、またはその抗原を発現する全細胞で注射することができる。例えば、マウスに以下の方法で全部で8回の注射を与えることができる：0日において、注目する腫瘍細胞抗原を発現する $10^7$ 細胞をトランスジェニックマウスの足蹠に注射する。3、7、10および14日に、マウスにグースティング注射を与えることができ、各注射は、注目するヒト細胞抗原を発現する $10^7$ 細胞 +  $10\mu\text{g}$ のCpGポリヌクレオチドを含有する。17、21、および27日に、マウスに、精製された腫瘍細胞抗原蛋白質を含有するさらなるブースティング注射を与えることができる。免疫化トランスジェニックマウスからの全血を31日に収穫することができ、ハイブリドーマを標準的な技術を介して調製することができる。得られたハイブリドーマ上清を(D)にて前記したようにスクリーニングする。

#### 【0378】

##### F. ヒト化 / 他の修飾

頑強なADCCまたはCDC活性が本発明の抗体で望まれるならば、抗体はヒトまたはヒト化定常領域を含有しなければならない。もし抗体が非 - ヒト種に由来するならば、本発明の抗体からの可変ドメインをヒト定常ドメインに融合させることができる。ヒト定常ドメインに対する融合に続き、可変ドメインは、加えて、ヒト化して、潜在的免疫原性を低下させてもよい。加えて、数個の例を挙げるならば、融合蛋白質の構築、アフィニティー成熟、またはさらなるエフェクター機能エンジニアリングのような、他の遺伝子的または組換え修飾をこの時点で行うことができる。

#### 【0379】

##### G. モノクローナル抗体の精製

注目する抗体は、当該分野で良く知られた技術を用い、標準的なプロテインAクロマトグラフィーを用いてハイブリドーマ培養から精製する。当該分野で良く知られた方法に従い、ハイブリドーマ上清を収穫し、終わった後にはいずれの細胞も濾過によって除去する。濾液を(必要ならば複数回通して)プロテインカラムに負荷する。カラムを洗浄し、次いで、発現され分泌された免疫グロブリンポリペプチドをカラムから溶出させる。抗体産物の調製のために、ウイルス不活化工程として、プロテインAプールを低いpH(最初の30分間、および最大1時間の間のpH3)に保持する。吸着カチオン交換工程を次に用いて、産物をさらに精製する。吸着分離カラムからの溶出物を、ウイルス保持フィルターを通して、潜在的なウイルス粒子のさらなる除去を供する。ここでは産物が結合しないアニオン交換カラムを通すことによって、濾液をさらに精製する。最後に、産物を透析濾過を通す処方緩衝液に導入することによって、精製プロセスを行う。保持物を少なくとも $1\text{mg/mL}$ の蛋白質の独活に調整し、安定化剤を加える。

#### 【0380】

##### H. 結合親和性の特徴づけ

本発明の抗体は、BIACoreマイクロチップ分析を用いて、注目する標的に対するそれらの親和性について分析することができる。例えば、BIACore2000アナライザーを、CM5センサーチップ(BIACore; Piscataway, NJ)と協調させて用いることができる。HBS-EP緩衝液( $10\text{mM}$  HEPES、 $0.15\text{M}$  NaCl、 $3.4\text{mM}$  EDTA、 $0.005\%$  P-20、pH7.4)の連続流を用い、製造業者の指示に従い、精製された抗原蛋白質をセンサーチップ表面に固定化する。

センサーチップ表面のカルボキシル基を、 $0.2 \text{ M}$   $\text{N}$ -エチル- $\text{N}'$ -（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）および $0.05 \text{ M}$   $\text{N}$ -ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を含有する $60 \text{ uL}$ の混合物を注射することによって活性化する。 $10 \text{ ug/mL}$ の濃度の、 $10 \text{ mM}$ 酢酸塩、 $\text{pH} 4.5$ （BIACore, Inc.; Piscataway, NJ）に希釈された組換え腫瘍細胞抗原を注射することによって、特異的表面が得られて、 $2,000$ 共鳴単位（RU）の中程度の表面密度を得る。ある具体例において、 $25 \text{ g/mL}$ のような腫瘍細胞抗原の他の濃度を用いることもできる。チップ表面の過剰の反応性基を、 $60 \text{ uL}$ の $1 \text{ M}$ エタノールアミンを注射することによって、脱活性化する。ブランクのモック-カップルド参照表面を各センサーチップ上で調製する。モック-カップリングについては、活性化および不活性化工程を蛋白質なくして行う。

10

## 【0381】

モノクローナル抗体候補を試料緩衝液（濾過し、脱気した、 $1 \times \text{PBS} + 0.005\% \text{ P-20} + 0.1 \text{ mg/mL BSA}$ （画分V、IgGフリー；Sigma, Inc.））に、 $25 \text{ nM}$ の濃度まで希釈し、 $80 \text{ pU}$ 分の流速にて、腫瘍細胞抗原に2分間で注射する。全ての分析では、機器を流す緩衝液は $1 \times \text{PBS}$ （塩化カルシウムなし、塩化マグネシウムなし；Gibco Inc.）+ $0.005\% \text{ P-20}$ （濾過し、脱気したもの）であり、温度は $25$ に設定する。結合シグナル強度について、ならびに解離速度について、抗体結合曲線を定量的に比較する。

## 【0382】

## I. コンジュゲーション

もし本発明の抗体をパートナーとしてイムノ結合体で用いるべきであれば、今回、精製された抗体をもう1つの部位に結合体化することができる。例えば、抗体を、ADEPT技術で用いるプロドラッグ-活性化酵素、放射性核種、トキシンまたは他の免疫変調剤に結合体化することができる。

20

## 【0383】

## （実施例5）- 抗-腫瘍細胞抗原抗体のイン・ビトロスクリーニング

## A. ADC活性についてのスクリーニング

イン・ビトロADCアッセイ：クロム51-標識標的細胞を調製するためには、腫瘍細胞系を組織培養プレートで成長させ、PBS中の滅菌 $10 \text{ mM EDTA}$ を用いて収穫する。脱着させた細胞を細胞培養基で2回洗浄する。細胞（ $5 \times 10^6$ ）を $200 \text{ uCi}$ のクロム51（New England Nuclear/DuPont）で場合によっては混合しつつ、 $37$ で1時間標識する。標識細胞を細胞培養基で3回洗浄し、次いで、 $1 \times 10^5$ 細胞/mLの濃度に再懸濁する。細胞をオプソニン化なくして用いるか、あるいはPBMCアッセイにおいては $100 \text{ ng/mL}$ および $1.5 \text{ ng/mL}$ にて、あるいはNKアッセイにおいては $20 \text{ ng/mL}$ および $1 \text{ ng/mL}$ におけるテスト抗体でのインキュベーションによってアッセイに先立ってオプソニン化する。正常な健康なドナーから血液をヘパリン上に収集することによって、末梢血液単核細胞を調製し、等容量のリン酸化生理食塩水（PBS）で希釈する。次いで、血液をLYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM（登録商標）（LSM：Organon Teknika）に重ね、製造業者の指示に従い遠心する。単核細胞をLSM-血漿界面から収集し、PBSで3回洗浄する。エフェクター細胞を細胞培養基に $1 \times 10^7$ /細胞/mLの最終濃度まで懸濁する。LSMを通す精製の後、製造業者の指示に従い、NK細胞単離キットおよび磁性カラム（Miltenyi Biotech）を用いる陰性選択によって、ナチュラルキラー（NK）をPBMCから単離する。単離されたNK細胞を収集し、洗浄し、細胞培養基に $2 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度まで再懸濁する。NK細胞の同一性を、フローサイトメトリー分析によって確認する。変化させるエフェクター：標的比率は、マイクロタ イタープレート（ $100 \text{ uL}$ の最終容量）の列に沿ってエフェクター（PBMCまたはNKいずれか）細胞を細胞培養基中に2倍系列希釈することによって調製する。エフェクター細胞の濃度は、PBMCについては $1.0 \times 10^7$ /mLないし $2.0 \times 10^4$ /mL、およびNKについては $2.0 \times 10^6$ /mLないし $3.9 \times 10^3$ /mLの範囲である

30

40

50

。エフェクター細胞の滴定の後、 $100\ \mu\text{L}$ の $1 \times 10^5$ 細胞/mLのクロム51 - 標識標的細胞（オプソニン化または非オプソニン化）をプレートの各ウェルに加える。この結果、PBM Cについては100 : 1、NK細胞については20 : 1の初期エフェクター : 標的比率が得られる。全てのアッセイを二連で行い、各プレートは自然溶解（エフェクター細胞なし）および合計溶解（標的細胞 +  $100\ \mu\text{L}$ の1%ドデシル硫酸ナトリウム1N水酸化ナトリウム）双方についての対照を含有する。プレートを37℃にて18時間インキュベートし、その後、上清収集システム（Skatron Instrument, Inc.）を用いて細胞培養上清を収穫し、Manaxi自動 - ガンマ5000シリーズガンマカウンター（Packard）にて1分間カウントする。次いで、式： $\% \text{細胞傷害性} = (\text{試料cpm} - \text{自然溶解}) / (\text{全溶解} - \text{自然溶解}) \times 100$ を用いてパーセント細胞傷害性として結果を表す。

10

## 【0384】

## B. アポトーシス活性についてのスクリーニング

このアッセイは、アネキシンVが、細胞の外側へのその曝露がアポトーシスプロセスの初期ホールマークである、ホスホスチジルセリン（PS）に対する高い親和性を有する。腫瘍細胞抗原を発現する細胞を、10%加熱 - 不活化FBS（Hyclone）および2mM L - グルタミンを補足したダルベッコの修飾イーグル培地（D - MEM）：ラムF - 12（50 : 50）中で培養する。腫瘍抗原発現腫瘍細胞を、 $100 \times 200\ \text{mm}$ 皿中に皿当たり $3 \times 10^6$ の密度で撒き、一晚接着させる。PSに対するアネキシンVの高い親和性に基づることができる、商業的に入手可能なアネキシンV染色試薬のいずれかを用いて細胞表面PSを検出する。細胞培地を除去し、新鮮な培地単独で、あるいは $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のモノクローナル抗体を含有する培地で置換える。3日間のインキュベーション時間の後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱着させる。次いで、細胞を遠心し、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合緩衝液に再懸濁させ、チューブにアリコットする。次いで、チューブは標識されたアネキシン（例えば、アネキシンV - FITC）（ $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を受ける。FACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーターおよびFACSCONVERT<sup>TM</sup> Cell Questソフトウェア（Becton Dickinson）を用いて試料を分析することができる。対照に対するアネキシン結合の統計学的に有意なレベルに誘導する抗体を、アポトーシス - 誘導抗体として選択する。

20

## 【0385】

## （実施例6） - 注目する抗体のイン・ビボ特徴付け

抗体を、イン・ビボにて、腫瘍形成および/または成長を妨げ、成長を阻害し、または樹立された腫瘍のサイズを低下させ、転移を阻害し、または樹立された転移性病巣を治療する能力についてテストする。各腫瘍抗原についての相対的腫瘍モデルを、RNAまたは蛋白質発現によって評価されるように、腫瘍細胞系における腫瘍抗原発現に基づいて選択する。記載した腫瘍細胞抗原に対する代表的な腫瘍細胞系は、限定されるものではないが、以下のものを含む：

30

KIAA1815 :

T47Dヒト乳房

COLO205ヒト結腸

HT29ヒト結腸

HCT116ヒト結腸

LOC157378 :

A549ヒト非小細胞肺癌

FLJ20421 :

MDA - MB - 435

DSCD74 :

KM12ヒト結腸

COLO205

GPR160 :

40

50

T 4 7 D ヒト乳房  
 M C F 7 ヒト乳房  
 G P C R 4 1 :  
 C O L O 2 0 5 ヒト結腸  
 P C 3 - M - 1 u c ヒト前立腺  
 M D A - M B - 4 3 5 ヒト乳房  
 S L C 1 A 5  
 C O L O 2 0 5 ヒト結腸  
 S W 6 2 0 ヒト結腸。

## 【0386】

A . 腫瘍の形成または成長

平均体重が 2 0 g の 4 ~ 7 週齢の年齢の免疫寛容マウスをこれらの実験で用いる。

## 【0387】

i ) 抗 - 腫瘍細胞抗原抗体での結直腸癌の治療

C O L O 2 0 5、K M - 1 2 または S W 6 2 0 のようなヒト結直腸癌細胞系は、S h e n g e t a l . J . C l i n . I n v e s t . 9 9 : 2 2 5 4 - 2 2 5 9 ( 1 9 9 7 ) に記載されたように無胸腺ヌードマウスに皮下移植する。マウスをグループにランダム化し、処理を腫瘍移植の日に開始し、0 . 1 ~ 5 0 m g / k g の注目するモノクローナル抗体を、注射によって毎週 2 回静脈内または腹腔内投与する。腫瘍の幅および長さのキャリパー測定を用いて、腫瘍容量を計算する。腫瘍の形成または成長はこれまでの実験の結果として開始されると予測される。

## 【0388】

i i ) 抗 - 腫瘍細胞抗原抗体での乳癌の治療

T 4 7 D , M C F - 7 p r M D A - M B - 4 3 5 のようなヒト乳癌細胞系を、S h e n g e t a l . J . C l i n . I n v e s t . 9 9 : 2 2 5 4 - 2 2 5 9 ( 1 9 9 7 ) に記載されたように無胸腺ヌードマウスに皮下移植する。別法として、直接的注射または外科的インプラントによって、細胞を乳頭脂肪パッドに同所性移植する。これらの腫瘍モデルは成長についてエストロゲン依存性であり、エストロゲンを補足した雌マウスを用いる。マウスをグループにランダム化し、腫瘍移植の日に治療を開始し、0 . 1 ~ 5 0 m g / k g の注目するモノクローナル抗体を、注射によって毎週 2 回静脈内または腹腔内投与する。腫瘍の幅および長さのキャリパー測定を用いて、腫瘍容量を計算する。腫瘍の形成または成長は、これまでの実験の結果として阻害されると予測される。

## 【0389】

i i i ) 抗 - 腫瘍細胞抗原抗体での肺癌の治療

A 5 4 9 のようなヒト非小細胞肺癌系を、S h e n g e t a l . J . C l i n . I n v e s t . 9 9 : 2 2 5 4 - 2 2 5 9 ( 1 9 9 7 ) に記載されたように無胸腺ヌードマウスに皮下移植する。マウスをグループにランダム化し、腫瘍移植の日に治療を開始し、0 . 1 ~ 5 0 m g / k g の注目するモノクローナル抗体を注射によって毎週 2 回静脈内または腹腔内投与する。腫瘍の幅および長さの毎週 2 回行われたキャリパー測定を用いて、腫瘍容量を計算する。腫瘍の形成または成長はこれまでの実験の結果として阻害されると予測される。

## 【0390】

i v ) 抗 - 腫瘍細胞抗原抗体での前立腺癌の治療

ヒト前立腺癌細胞に対する本発明の抗体の効果を、ヒト前立腺 P C - 3 または P C - M - 1 u c 腫瘍モデルに対して評価する。細胞を雄マウスに皮下注射する。マウスをグループにランダム化し ( 各群において n = 1 0 )、0 日に、本発明の抗体またはイソタイプ M A b 対照にて治療を静脈内または腹腔内 ( i . p . ) で開始する。動物を毎週 2 回処理する。毎週 2 回行われる腫瘍の長さおよび幅のキャリパー測定を用いて腫瘍の成長をモニターする。別法として、P C - 3 M 1 u c 細胞について、X e n o g e n I V I S システムにて、培養ルミネセントイメージングを用いて腫瘍成長をモニターし、毎週 1 回また

10

20

30

40

50

は2回腫瘍におけるルシフェラーゼシグナルを測定する。

【0391】

B. 転移阻害

ヒト前立腺癌細胞の転移、および骨および柔軟組織における転移性病巣の成長に対する本発明の抗体の効果を、ヒト前立腺PC-M-luc腫瘍モデルを用いて評価する。細胞を、雄マウスへの心臓内経路を介して注射する。マウスをグループにランダム化し、本発明の抗体またはイソタイプMAb対照にて、0日に、処理を静脈内または腹腔内(i.p.)で開始する。動物を毎週2回処理する。骨および柔軟組織における腫瘍成長を、Xenogen IVISシステムにて、培養ルミネセントイメージングを用いてモニターし、腫瘍中のルシフェラーゼシグナルを毎週1回測定する。別法として、インプラントから1~3週間後に、Xenogen IVIS(Living Image 2.5ソフトウェアを備えたXenogen 100シリーズ)システムを用いて動物をイメージし、抗体処理の開始に先立ってルシフェラーゼシグナルに基づいてグループにランダム化する。主要の成長応答を、Xenogen IVISイメージングによって毎週1回評価する。

10

【図面の簡単な説明】

【0392】

【図1】図1は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原KIAA1815のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。

【図2】図2は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原LOS157378のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。

20

【図3】図3は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原FLJ20421のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。

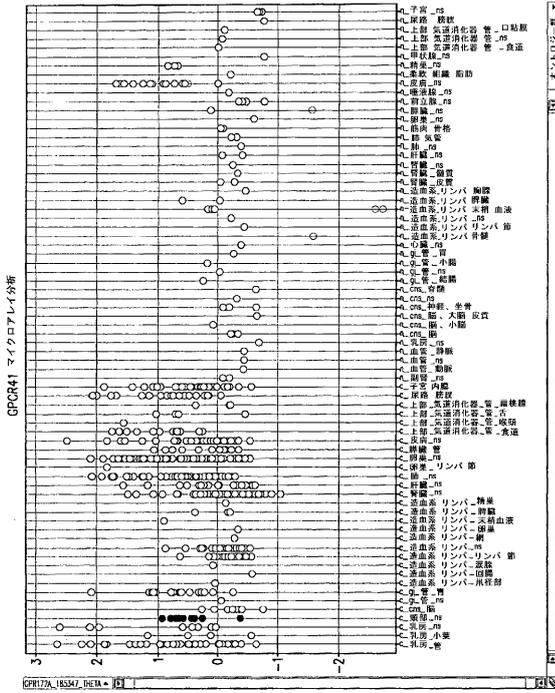
【図4】図4は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原GRP160のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。

【図5】図5は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原GPCR41のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。

【図6】図6は、癌性および正常な組織双方における腫瘍細胞抗原SLC1A5のマイクロアレイ発現分析のグラフ表示を示す。



【 図 5 】



【 図 6 】

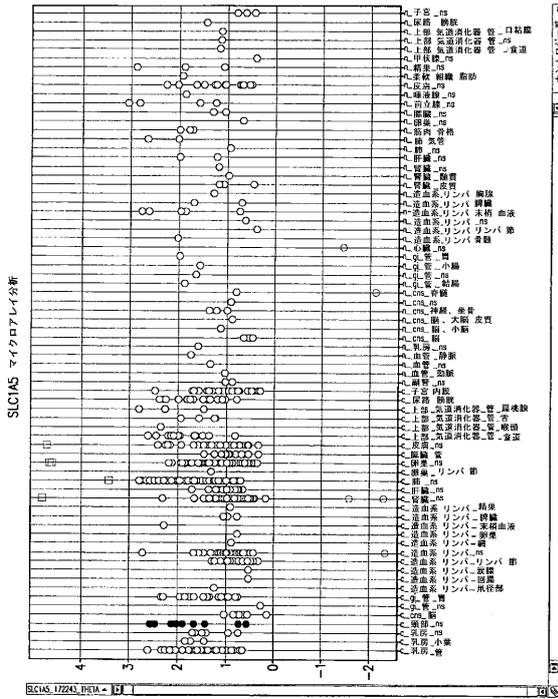


FIG. 5

FIG. 6

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/US2007/007382

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/00 A61K47/48 C07K16/30		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/016962 A (GENENTECH INC [US]; ABBAS ALEXANDER [US]; CLARK HILARY [US]; OUYANG WE) 24 February 2005 (2005-02-24) Seq. ID. No. 3200; pages 61-67; claims	1-4, 11-43
Y	HOUSHMAND PANTEA ET AL: "Targeting tumor cells." CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 15, no. 6, October 2003 (2003-10), pages 640-644, XP002457225 ISSN: 0955-0674 the whole document	1-5, 11-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 31 October 2007		Date of mailing of the international search report 30/01/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommerfeld, Teresa

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/007382

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KRAUSS JURGEN: "Recombinant antibodies for the diagnosis and treatment of cancer." MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 1, September 2003 (2003-09), pages 1-17, XP009091556 ISSN: 1073-6085 the whole document</p>	<p>1-5, 11-43</p>
A	<p>KOBAYASHI T ET AL: "Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in devono CD5+ and CD5- diffuse large B-cell lymphoma" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 63, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 60-66, XP002996249 ISSN: 0008-5472 the whole document</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/US2007/007382**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1- 4, 11- 43 all partially; and 5

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2007/007382

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

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

1. claims: 1-4,11-43, all partially; and 5  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen KIAA1815, and related subject-matter  
---
2. claims: 1-4, 11-43, all partially; and 6  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen LOC157378, and related subject-matter  
---
3. claims: 1-4, 11-43, all partially; and 7  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen FLJ20421, and related subject-matter  
---
4. claims: 1-4, 11-43, all partially; and 8  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen DSCD75, and related subject-matter  
---
5. claims: 1-4, 11-43, all partially; and 9  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen GPR160, and related subject-matter  
---
6. claims: 1-4, 11-43, all partially; and 10  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen GPCR41, and related subject-matter  
---
7. claims: 1-4,11-43, all partially  
antibody or antibody fragment against tumor cell antigen SLC1A5, and related subject-matter  
---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International application No  
PCT/US2007/007382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005016962 A	24-02-2005	EP 1654278 A2	10-05-2006
		WO 2005019258 A2	03-03-2005

## 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	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 38/27 (2006.01)	A 6 1 K 37/36	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
	G 0 1 N 33/574	D

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

(72) 発明者 ジャナトポア, メアリー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ユー, グオイン ケー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA02 DA06 EA04

4B065 AA26X AA90X AA91X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA17 DA01 DA19 DA26 DA32 DB01 DB52 DB56 DC01 DC22

NA14 NA15 ZB26

4C085 AA13 AA14 AA26 AA35 AA37 BB11 CC21 CC22

4C086 AA01 CB22 NA14 NA15 ZB26

4H045 AA11 BA10 BA41 DA76 EA28 EA51 FA74