

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6334496号
(P6334496)

(45) 発行日 平成30年5月30日(2018.5.30)

(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)

(51) Int.Cl.	F I					
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A			
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T			
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00				

請求項の数 12 外国語出願 (全 249 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-214189 (P2015-214189)	(73) 特許権者	510122326
(22) 出願日	平成27年10月30日(2015.10.30)		セルデックス セラピューティクス イン
(62) 分割の表示	特願2013-214392 (P2013-214392)		コーポレイテッド
原出願日	平成17年11月30日(2005.11.30)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(65) 公開番号	特開2016-26210 (P2016-26210A)		494-2725, ニーダム, フォー
(43) 公開日	平成28年2月12日(2016.2.12)	(73) 特許権者	507175061
審査請求日	平成27年10月30日(2015.10.30)		アムジェン フレモント, インコーポレ
(31) 優先権主張番号	60/632,023		イテッド
(32) 優先日	平成16年11月30日(2004.11.30)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
(33) 優先権主張国	米国 (US)		55, フレモント, カイザー ドライ
(31) 優先権主張番号	60/733,779	(74) 代理人	100107489
(32) 優先日	平成17年11月7日(2005.11.7)		弁理士 大塩 竹志
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GPNMBに対する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

モノクローナルヒト抗GPNMB抗体のV_Lドメインを該抗GPNMB抗体のV_Hドメインに結合させた、一本鎖Fv抗体であって、配列番号355、配列番号357または配列番号359のアミノ酸配列を含む、一本鎖Fv抗体。

【請求項2】

請求項1に記載の一本鎖Fv抗体と細胞毒性薬とを含む、免疫結合体。

【請求項3】

(a) 請求項2に記載の免疫結合体、または

(b) 請求項1に記載の一本鎖Fv抗体

を含む、GPNMBの過剰発現に関連する疾患を治療または予防するための組成物であって、該疾患が、黒色腫、または、星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫および新生物性髄膜炎から選択されるCNS系の新生物である、組成物。

【請求項4】

被験体がヒトである、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記組成物が、請求項2に記載の免疫結合体を含み、有効量が、(i) 2~4回の投与で0.1mg/kg~10mg/kgの単位用量、(ii) 0.1mg/kg~2mg/kgの単位用量、および(iii) 約1mg/kgの単位用量、から選択される単位用量である、請求項3に記載の組成物。

【請求項 6】

生物試料中の G P N M B の過剰発現細胞を検出する方法であって、該試料と請求項 1 に記載の抗体を含有する組成物とを接触させることを含む、方法。

【請求項 7】

前記方法が免疫組織化学である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫結合体が 5 m g / m l の濃度で存在する、請求項 2 に記載の免疫結合体を含む医薬。

【請求項 9】

スクロース、ヒスチジン、ヒスチジン塩酸塩一水和物、および T w e e n - 2 0 をさらに含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 10】

5 m g / m l の請求項 2 に記載の免疫結合体、10%スクロース、10 m M ヒスチジン、10 m M ヒスチジン塩酸塩一水和物、および 0 . 0 2 % (w / v) T w e e n - 2 0 を含む、医薬組成物。

【請求項 11】

細胞毒性薬を請求項 1 に記載の抗体に結合体化させるプロセスであって、

(1) 該抗体をホウ酸 p H 9 . 0 を含む緩衝液中でダイアフィルトレーションする工程

、
(2) トリス - (カルボキシエチル) - ホスフィン、ダイアフィルトレーションされた抗体溶液に 4 : 1 のモル比で添加する工程、および 20

(3) 該細胞毒性薬を、該抗体溶液に 20% モル過剰で添加する工程を含み、該細胞毒性薬が、4% D M S O に溶解されている、プロセス。

【請求項 12】

前記細胞毒性薬がオーリスタチン E またはその誘導体である、請求項 11 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、G P N M B に対する特異性を有する抗体、およびそのような抗体の使用に関する。特に、本発明は G P N M B に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体およびその使用を提供する。重鎖および軽鎖免疫グロブリン分子、特にフレームワーク領域および/または相補性決定領域 (C D R) に及ぶ連続した重鎖および軽鎖配列に対応する配列を含むアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列が提供される。また、本発明は抗 G P N M B 抗体を含む免疫結合体およびそのような免疫結合体を使用する方法を提供する。さらに、本発明は抗 G P N M B 抗体成分と抗 C D 3 成分とを含む二重特異性抗体およびそのような二重特異性抗体を使用する方法を提供する。 30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

G P N M B

「nmb」(アクセッション番号 X 7 6 5 3 4 E M B L) と呼ばれる推定膜貫通糖タンパク質 (以下、G P N M B と称する) が同定され、高悪性度の黒色腫細胞系に比較して低転移性のヒト黒色腫細胞系と異種移植片において異なる形で発現すると非特許文献 1 に記載されている。G P N M B は p M e 1 1 7 黒色腫に特異的なタンパク質の前駆体と、33% の同一性を共有する (K w o n e t a l . , 1 9 9 1 , P N A S 8 8 : 9 2 2 8 - 9 2 3 2) 。 G P N M B は樹状細胞結合型膜貫通タンパク質である D C - H I L に対して 7 1 % 相同である (S h i k a n o e t a l . , 2 0 0 1 B i o l . C h e m . 2 7 6 : 8 1 2 5 - 8 1 3 4) 。 G P N M B は、造血成長因子によって誘 50

導されるニューロキニン-1タンパク質HGF IN (Bandari et al, Reg. Peptides 111:169-178)または骨関連遺伝子オステオクチピン(Owen et al. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2003, 13(2-4):205-220)としても知られている。

【0003】

nmbは高転移性nmb陰性黒色腫細胞系の転移能を低減できることも報告された(非特許文献1)。GPNMBは、公開データベース検索と発現プロファイリング後に、神経膠芽腫の候補腫瘍マーカーとみなされた(非特許文献2)。この遺伝子は、肺腫瘍で過剰発現することがわかり(特許文献1)、ならびに乳癌、直腸癌および大腸癌で過剰発現することがわかった(特許文献2)。さらに、NCBI SAGEデータは、胃癌と膵臓癌におけるこの遺伝子の過剰発現を示している。マウス相同分子種は、結節性硬化症結合症候群のTSC2ノックアウトモデルに由来する神経幹細胞系NSCで高度に上方制御されることが示された(特許文献3)。

【0004】

抗体

免疫グロブリンとしても知られる抗体は、典型的には、2本の軽(L)鎖(約25kDa)と2本の重(H)鎖(約50~70kDa)からなる四量体グリコシル化タンパク質である。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に關与する約100~110以上のアミノ酸からなる可変領域を含む。LおよびH鎖のカルボキシ末端部分はそれぞれエフェクター機能に主に關与する1つおよび3つまたは4つの定常領域を有する。カッパとラムダとに分類される2種類のヒトL鎖が存在する。H鎖は、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEと定義する定常領域アミノ酸配列に基づくミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはエプシロンとして分類される。さらに、アイソタイプは例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄のサブクラスに分割してよい。

【0005】

免疫グロブリンはBリンパ球によりインビトロで自然に作られうる。B細胞の各クローンは、独自の予定抗原結合構造を有する抗原レセプターを有する抗体を産生する。約 10^7 の可能性のある抗原レセプターのレパートリーが抗原刺激前にインビボで存在する。この多様性は、体細胞組換え、すなわち、異なる抗原遺伝子断片の結合により作られる。免疫グロブリンH鎖、カッパL鎖およびラムダL鎖は3つの別々の遺伝子座によりコードされ、各遺伝子座は、可変(V)領域、定常(C)領域および結合(J)領域をコードする少なくとも3種類の遺伝子断片の複数のコピーを有し、重鎖遺伝子は多様性(D)領域も含む。利用可能な多様な遺伝子断片(45重鎖V; 35カッパV; 23重鎖D; 6重鎖J; 5カッパJ)の中からの特定のV、CおよびJ領域(および重鎖についてのD)の選択は、B細胞中に示される生殖細胞系配列のおよそ 10^{11} の可能な特異性を生む。V、CおよびJ領域の結合は結合点で残基の損失または付加をもたらしうる。ヒト抗体のLおよびH鎖V領域は、相補性決定領域(CDR)としても知られる3種類の高頻度可変領域の骨格を形成する比較的保存されたフレームワーク領域(FR)からなる。重鎖または軽鎖のいずれかのアミノ末端から、V領域は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3の順番でFR領域とCDR領域から構成される。D(重鎖のみ)およびJ領域とのV領域の結合はCDR3-FR4を付加する。CDRは一般的に抗原結合に關与する。

【0006】

疾患を根絶し、かつ正常な組織を提供する目的で、モノクローナル抗体の特異性はそれら抗体をインビボで癌を標的とさせる魅力的な物質としている。当初、マウスモノクローナル抗体を利用したこのアプローチは、免疫原性等の潜在的な効能の限界、非効率的なエフェクター機能および短いインビボ半減期に遭遇してきた。ヒト抗体の定常領域に組み合わされたマウスモノクローナル抗体の可変領域に結合する抗原を利用しようとしたキメラ抗体(Boulianne, et al 1984 Nature 312:643-646; Morrison et al, 1984 PNAS USA 81:6851-6855); ヒト免疫グロブリンに対するマウス抗体に由来する相補性決定領域(

10

20

30

40

50

CDR)に結合する抗原をグラフトしたヒト化抗体 (Jones, et al, 1986 Nature 321: 522-525; Riechmann, et al, 1988 Nature 332: 323-327; Verhoeyen, et al, 1988 Science 239: 1534-1536; Vauglum, et al, 1998 Nature Biotechnol. 16: 535-539); および抗体の単鎖 scFvs または Fab 断片のファージディスプレイライブラリー (de Haard, et al, 1999 J Biol. Chem. 274: 18218-18230; Knappik, et al, 2000 J. Mol. Biol. 296: 57-86; Sheets, et al, 1998 PNAS USA 95: 6157-6162; Vaughan, et al, 1994 Nature Biotechnol 14: 309-314, 1996; Griffiths et al EMBO J. 13: 3245-3260) に対する技術が開発された。さらに、完全ヒトモノクローナル抗体の免疫化と産生に関して、ヒト免疫グロブリン遺伝子と非機能性内在性遺伝子を有するトランスジェニック動物が開発された (Fislerwild, et al, 1996 Nature Biotechnol 14: 845-851; Mendez, et al, 1997 Nature Genet. 15: 146-156; Nicholson, et al, 1999 J. Immunol 163, 6898-6906)。

【0007】

一本鎖抗体：一本鎖 Fv 抗体 (scFvs) が 1980 年代末に最初に記載された (Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988))。典型的には長さが 5~27 アミノ酸残基の範囲のポリペプチドリンカーを用いて、可変軽鎖領域の C 末端 (V_L) を可変重鎖領域の N 末端 (V_H) に結合させる。もしくは、リンカーは V_H の C 末端を V_L の N 末端に結合させる。両形式 ($V_L - V_H$ および $V_H - V_L$) が文献においてうまく使用されてきた。文献で使用された最も一般的なリンカーは ($Gly_4 Ser$)₃ の 15 アミノ酸のリンカーであるが、205C と呼ばれる 25 アミノ酸のリンカー等、利用された他の幾つかのリンカーが存在する (Pantoliano et al., Biochemistry 30: 10117-10125 (1991))。一本鎖抗体が専門病院で現在利用されている：最も進んだものの 1 つが h5G1.1 またはパキセリズマブである。この scFv はヒト C5 補体に対して特異的であり、心肺バイパス手術を受けた心臓病患者の臨床試験に使用されている (Sherman et al., Ann. Thorac Surg. 77: 942-949 (2004))。

【0008】

二重特異性抗体 (biAbs)：かなりの進展がなされた mAb 研究の一領域は二重特異性抗体 (biAbs) の開発にある。二重特異性を有する治療抗体分子の開発には明確な利点が存在する。例えば、biAbs は望まれない細胞に対する CTL 等の免疫エフェクター細胞を標的とするメディエーターとして働くことができる (Baeuerle et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 5: 413-419 (2003))。別の例において、Fc ガンマレセプター CD16、CD64 および CD89 に対して化学的に結合する二重特異性抗体は、従来の IgG 抗体よりもインビトロでさらに顕著に効果的であった (Peipp and Valerius, Biochem. Soc. Trans. 30: 507-511 (2002))。実行可能な治療学として biAbs を開発する課題の 1 つは、臨床的応用のために十分に大量の安定部分の産生にある。別の課題は、有効標的と、治療薬を導く基礎生物学との適切な組合せを決定することにある。biAbs で経験された困難性についての最近の概説については、(Kontermann, Acta Pharmacol Sin 26: 1-9 (2005); Peipp and Valerius, Soc. Trans. 30: 507-511 (2002)) を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0009】

二重特異性一本鎖抗体 (bi-scFv) : 注目すべき種類の作りうる biAb は二重特異性一本鎖抗体または bi-scFv である。bi-scFv の産生に関する概説については、(Kipriyanov and Le Gall, Curr Opin Drug Discov Devel 7:233-242 (2004)) を参照されたい。典型的には、bi-scFv は、2つの異なる抗体に由来する4つの可変領域、2つの重鎖 (V_H) および2つの軽鎖 (V_L) からなる。4つの前記領域は、長さが5~27アミノ酸の範囲にある3つの短いリンカーにより互いに結合している。この種の抗体の生物学的活性は分子の構築に関する幾つかの特徴に依存する。例えば、抗体のV領域間のリンカー配列と、(2つの抗体の)4つの抗体V領域自体の順序とを変更でき、ならびに使用される発現系を変更できる; これらのすべてが多様な得られる産物の可溶性と生物学的活性に大きく影響を与える (Kipriyanov et al., J. Mol. Biol. 330:99-111 (2003); Le Gall et al, Protein Eng. Des. Sel. 17:357-366 (2004); Pavlinkova et al., Clin Cancer Res. 5:2613-1619 (1999))。

10

【0010】

細胞傷害性Tリンパ球: 正常な環境下では、CD3/T細胞レセプター (CD3/TCR) 結合体が特定のAgペプチドを伴う関連MHCに結合するときに、T細胞が活性化される。CD3/TCRのMHCとの結合は、病原体または腫瘍に対する免疫応答を誘発するために必要な細胞内シグナルをもたらす。T細胞活性化を引き起こす同様のシグナルは、CD3/TCR結合体の一定の構造に結合することのできる抗体によっても達成される。文献には、TCR/CD3結合体と腫瘍関連抗原 (TAA) との両方を認識する biAbs が、標的細胞の存在下にCTLの活性化プログラムを誘発できることが示されている (Chapoval et al., J. Immunol 155:1296-1303 (1995))。

20

組換え技術は、インビボ効能を高めることを目的に抗体分子のさらなる向上を可能とするために利用されている。そのような技術は、例えば、分子サイズ、親和性、薬物動態、毒性、特異性、結合価、エフェクター機能、直接または間接のアーミング、併用療法および多様なプロドラッグ手法の最適化を提供する。

30

GPNMBを発現する病態のインビボ標的化に適する抗体を有し、治療効力を可能とすることが望ましいであろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許出願公開第20030064947号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2003100720号明細書

【特許文献3】国際公開第2003/080856号パンフレット

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Wetermanら、Int J Cancer (1995) 60:73-81

【非特許文献2】Logingら、Genome Research (2000) 10:1393-1402

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の要旨)

本発明は、GPNMBに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、ならびにそのような抗体の改変体、誘導体および抗原結合断片を提供する。

50

【0014】

本発明は、GPNMBに対する特異性を提供するヒト抗体遺伝子断片の好ましい体細胞組換え、およびこれらの遺伝子断片を起源とする遺伝子操作された抗GPNMB抗体改変体および誘導体を提供する。さらに、本発明は、GPNMBに対して結合特異性を有する多重親和性成熟ヒト抗体を提供する。

【0015】

一実施態様において、本発明は、GPNMBに結合する抗体またはその結合断片において、該抗体またはその結合断片がGPNMB誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、Mab1.2.1、Mab1.10.1およびMab2.22.1からなる群から選択された完全ヒト抗GPNMB抗体、または抗完全ヒト抗GPNMB抗体であるMab1.2.1、Mab1.10.1またはMab2.22.1と同じ抗原結合ピン中の抗体に交差反応することを特徴とする抗体またはその結合断片を提供する。

10

【0016】

別の実施態様において、本発明は、GPNMBに結合する抗体またはその結合断片において、該抗体またはその結合断片がGPNMB誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、Mab2.3.1およびMab1.15.1からなる群から選択された完全ヒト抗GPNMB抗体、または完全ヒト抗GPNMB抗体であるMab2.3.1またはMab1.15.1と同じ抗原結合ピン中の抗体に交差反応することを特徴とする抗体またはその結合断片を提供する。

【0017】

さらに別の実施態様において、本発明は、GPNMBに結合する抗体またはその結合断片において、該抗体またはその結合断片がGPNMB誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、完全ヒト抗GPNMB抗体Mab2.10.1、または完全ヒト抗GPNMB抗体Mab2.10.1と同じ抗原結合ピン中の抗体に交差反応することを特徴とする抗体またはその結合断片を提供する。

20

【0018】

一実施態様において、本発明は、GPNMBを過剰発現する細胞に対して細胞傷害効果を有する裸のIgG1抗GPNMB抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明は、裸のIgG1抗GPNMB抗体および免疫調節物質（例えば、インターフェロンおよびサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない）を含有する組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、GPNMBの過剰発現に関連した疾患の治療または予防方法を提供する。

30

【0019】

別の実施態様において、本発明は、抗GPNMB抗体またはその断片および細胞毒性薬を含有する免疫結合体を提供する。特定の実施態様において、細胞毒性薬はオーリスタチンE（ドラスタチン-10）またはその誘導体である。そのような免疫結合体の使用方法も提供される。

【0020】

一実施態様において、本発明は、標的腫瘍細胞のT細胞による細胞障害死滅を可能とする、抗GPNMB成分と抗CD3抗体成分を含有する二重特異性抗体を提供する。別の実施態様において、本発明は、細胞毒性薬に結合体化させた一本鎖Fv抗体を提供する。特定の実施態様において、細胞毒性薬はオーリスタチンE（ドラスタチン-10）またはその誘導体である。そのような二重特異性抗体および結合体化一本鎖Fv抗体の使用方法も提供される。

40

【0021】

本発明の抗GPNMBヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列およびそれらをコードする核酸配列が提供される。

【0022】

ヒト抗GPNMB抗体を含有する治療組成物等、該抗体を含有する組成物および使用方法が提供される。特に、抗GPNMB抗体を含有する治療用免疫結合体およびGPNMB

50

を発現する癌および他のGPNMB関連疾患を治療する細胞毒性薬または細胞分裂阻害剤が提供される。投与計画も提供される。

本開示のさらなる態様が一部は下記の説明に示され、一部は説明から明らかとなり、また本発明を実施することによって理解されるだろう。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

GPNMBに特異的に結合する、単離されたヒト抗体。

(項目2)

前記抗体がモノクローナル抗体である、項目1記載の抗体。

(項目3)

前記抗体が、 $10^7 M^{-1}$ よりも高い親和定数でGPNMBに特異的に結合する、項目1記載の抗体。

(項目4)

VH1-2、VH2-5、VH3-11、VH3-21、VH3-30、VH3-33、VH4-31、VH4-59およびVH5-51からなる群から選択される領域を含む、項目1記載の抗体。

(項目5)

さらに、A2、A3、A20、A27、A30、L2およびO1からなる群から選択される領域を含む、項目4記載の抗体。

(項目6)

VH1-2、VH2-5、VH3-11、VH3-21、VH3-30、VH3-33、VH4-31、VH4-59およびVH5-51からなる群から選択される領域に由来する領域を含む、項目1記載の抗体。

(項目7)

さらに、A2、A3、A20、A27、A30、L2およびO1からなる群から選択される領域に由来する領域を含む、項目6記載の抗体。

(項目8)

配列番号2、20、38、56、74、92、110、128、146、164、182、200、218、236、253、256、260、265、270、274、277、281および285からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1記載の抗体。

(項目9)

さらに、配列番号11、29、47、65、83、101、119、137、155、173、191、209、227および245からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目8記載の抗体。

(項目10)

配列番号4、6、8、13、15、17、22、24、26、31、33、35、40、42、44、49、51、53、58、60、62、67、69、71、76、78、80、85、87、89、94、96、98、103、105、107、112、114、116、121、123、125、130、132、134、139、141、143、148、150、152、157、159、161、166、168、170、175、177、179、184、186、188、193、195、197、202、204、206、211、213、215、220、222、224、229、231、233、238、240、242、247、249、251、254、257、261、266、271、278、282、286、255、258、262、267、272、275、279、283、287、259、263、264、268、269、273、276、280、284および288からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDRを含む、項目1記載の抗体。

(項目11)

抗体が、Mab1.10.2、Mab1.15.1、Mab1.2.2、Mab1.7.

10

20

30

40

50

1、M a b 2 . 1 0 . 2、M a b 2 . 1 5 . 1、M a b 2 . 1 6 . 1、M a b 2 . 1 7 . 1、M a b 2 . 2 1 . 2、M a b 2 . 2 2 . 1、M a b 2 . 2 4 . 1、M a b 2 . 3 . 1、M a b 2 . 7 . 1 および M a b 2 . 8 . 1 からなる群から選択される、項目 1 記載の抗体。

(項目 1 2)

抗体が I g G 1 抗体である、項目 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の抗体。

(項目 1 3)

項目 1 記載の抗体と細胞毒性薬とを含む、免疫結合体。

(項目 1 4)

前記抗体が M a b 1 . 1 5 . 1 である、項目 1 3 記載の免疫結合体。

10

(項目 1 5)

前記細胞毒性薬がオーリスタチン E (ドラスタチン - 1 0) またはその誘導体である、項目 1 3 記載の免疫結合体。

(項目 1 6)

項目 1 3 記載の免疫結合体を含む、医薬組成物。

(項目 1 7)

項目 1 2 記載の抗体と免疫調節物質とを含む、医薬組成物。

(項目 1 8)

ヒトフレームワーク領域と G P N M B に対する特異的な結合手段とを含む、抗体。

(項目 1 9)

20

前記手段が、配列番号 4、6、8、13、15、17、22、24、26、31、33、35、40、42、44、49、51、53、58、60、62、67、69、71、76、78、80、85、87、89、94、96、98、103、105、107、112、114、116、121、123、125、130、132、134、139、141、143、148、150、152、157、159、161、166、168、170、175、177、179、184、186、188、193、195、197、202、204、206、211、213、215、220、222、224、229、231、233、238、240、242、247、249、251、254、257、261、266、271、278、282、286、255、258、262、267、272、275、279、283、287、259、263、264、268、269、273、276、280、284 および 288 を含むか、またはそれらに由来する C D R を含む、項目 1 8 記載の抗体。

30

(項目 2 0)

項目 1 記載の抗体をコードする、単離された核酸。

(項目 2 1)

項目 2 0 記載の核酸を含む、発現ベクター。

(項目 2 2)

項目 2 1 記載のベクターを含む、宿主細胞。

(項目 2 3)

宿主細胞が、大腸菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞、H e L a 細胞または N S O 細胞である、項目 2 2 記載の宿主細胞。

40

(項目 2 4)

前記核酸が、配列番号 2、20、38、56、74、92、110、128、146、164、182、200、218、236、253、256、260、265、270、274、277、281 および 285 からなる郡から選択されるアミノ酸配列をコードする、項目 2 3 記載の核酸。

(項目 2 5)

前記核酸が、配列番号 1、19、37、55、73、91、109、127、145、163、181、199、217、235、10、28、46、64、82、100、118、136、154、172、190、208、226 および 244 からなる郡から選択

50

される塩基配列を含む、項目 2 4 記載の核酸。

(項目 2 6)

G P N M B に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体の製造方法において、(a) 置換される C D R 3 を含むか、もしくは C D R 3 をコードする領域を欠く可変領域をコードする核酸の出発レパートリーを提供し；(b) 配列番号 8、2 6、4 4、6 2、8 0、9 8、1 1 6、1 3 4、1 5 2、1 7 0、1 8 8、2 0 6、2 2 4、2 4 2、2 5 9、2 6 3、2 6 4、2 6 8、2 6 9、2 7 3、2 7 6、2 8 0、2 8 4 および 2 8 8 からなる群から選択される配列に実質的に示されるアミノ酸配列をコードするドナー核酸に該レパートリーを組み合わせて、可変領域をコードする核酸の産物レパートリーを提供するようにドナー核酸をレパートリー中の C D R 3 領域に挿入し；(c) 産物レパートリーの核酸を発現し；(d) G P N M B に対して特異的な結合断片を選択し；(e) 特異的な抗原結合断片または結合断片をコードする核酸を回収することを含む、方法。

10

(項目 2 7)

項目 2 6 記載の方法により産生される、抗体。

(項目 2 8)

G P N M B に結合する抗体またはその結合断片であって、該抗体またはその結合断片が G P N M B 誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、M a b 1 . 2 . 1、M a b 1 . 1 0 . 1 および M a b 2 . 2 2 . 1 からなる群から選択された完全ヒト抗 G P N M B 抗体、または完全ヒト抗 G P N M B 抗体 M a b 1 . 2 . 1、M a b 1 . 1 0 . 1 または M a b 2 . 2 2 . 1 と同一の抗原結合性ピン中の抗体に交差反応する、抗体またはその結合断片。

20

(項目 2 9)

G P N M B に結合する抗体またはその結合断片であって、該抗体またはその結合断片が G P N M B 誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、M a b 2 . 3 . 1 および M a b 1 . 1 5 . 1 からなる群から選択された完全ヒト抗 G P N M B 抗体、または完全ヒト抗 G P N M B 抗体 M a b 2 . 3 . 1 または M a b 1 . 1 5 . 1 と同一の抗原結合性ピン中の抗体に交差反応する、抗体またはその結合断片。

(項目 3 0)

G P N M B に結合する抗体またはその結合断片であって、該抗体またはその結合断片が G P N M B 誘導性活性を中和し、かつ該抗体またはその結合断片が、完全ヒト抗 G P N M B 抗体 M a b 2 . 1 0 . 1、または完全ヒト抗 G P N M B 抗体 M a b 2 . 1 0 . 1 と同一の抗原結合性ピン中の抗体に交差反応する、抗体またはその結合断片。

30

(項目 3 1)

モノクローナルヒト抗 G P N M B 抗体の V_L 領域を該抗 G P N M B 抗体の V_H 領域に結合させた、一本鎖 F v 抗体。

(項目 3 2)

さらに、抗 C D 3 1 抗体の V_H 領域を該抗 C D 3 抗体の V_L 領域に結合させた、項目 3 1 記載の一本鎖 F v 抗体。

(項目 3 3)

項目 3 1 記載の一本鎖 F v 抗体と細胞毒性薬とを含む、免疫結合体。

40

(項目 3 4)

さらに、シグナルペプチドまたはフラグタグを含む、項目 3 1 または 3 2 記載の一本鎖 F v 抗体。

(項目 3 5)

配列番号 3 5 5 のアミノ酸配列を含む、項目 3 1 記載の一本鎖 F v 抗体。

(項目 3 6)

配列番号 3 5 7 または配列番号 3 5 9 のアミノ酸配列を含む、項目 3 2 記載の一本鎖 F v 抗体。

(項目 3 7)

G P N M B の過剰発現に関連する疾患を治療または予防する方法であって、(a) 項目 1

50

2記載の抗体、(b)項目13または33記載の免疫結合体、または(c)項目32記載の一本鎖Fv抗体を含有する有効量の組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

(項目38)

前記疾患が、黒色腫またはCNS系の新生物である、項目37記載の方法。

(項目39)

前記CNS系の新生物が、星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫または新生物性髄膜炎である、項目38記載の方法。

(項目40)

前記被験体がヒトである、項目37記載の方法。

10

(項目41)

前記方法が、項目12記載の免疫結合体を被験体に投与することを含み、有効量が2~4回の投与で0.1mg/kg~10mg/kgの単位用量である、項目37記載の方法。

(項目42)

前記有効量が0.1mg/kg~2mg/kgの単位用量である、項目41記載の方法。

(項目43)

前記有効量が約1mg/kgの単位用量である、項目41記載の方法。

(項目44)

生物試料中のGPNMBの過剰発現細胞を検出する方法であって、該試料と項目1~11のいずれかに記載の抗体を含有する組成物とを接触させることを含む方法。

20

(項目45)

前記方法が免疫組織化学である、項目44記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】4処置のために4日おきの2.50~20mg/kgの静脈内処置後の胸腺欠損マウスにおける腫瘍成長の阻害、およびSK-MEL-2異種移植片の完全な退縮。ビンブラスチン(1.7mg/kg静脈内q4d×4)およびパクリタキセル(24mg/kg静脈内q2d×4)等の参照医薬に対する腫瘍保持動物の応答も示す。コントロールグループはリン酸緩衝食塩水(PBS)または生理食塩水のいずれかにより処置される。

【図2】抗GPNMB抗体によるUACC-62黒色腫細胞の間接的な免疫毒素死滅。

30

【図3】オーリスタチンE(AE)結合体化抗GPNMB抗体とともにインキュベートされたUACC-62細胞のコロニー形成の阻害。

【図4】4処置のために4日おきの5.0mg/kgのCR011-vcMMAE静脈内処置後の胸腺欠損マウスにおける腫瘍成長の阻害、およびSK-MEL-2異種移植片の完全な退縮。非結合CR011または遊離モノエチルオーリスタチンEに対する腫瘍保持動物の応答の欠如は、インタクトな免疫結合体が抗腫瘍効果に必須であることを示す。

【図5】4処置のために4日おきの1.25~20mg/kgの静脈内処置後の胸腺欠損マウスにおける腫瘍サイズの減少とSK-MEL-2異種移植片の完全な退縮。ビンブラスチン(1.7mg/kg静脈内q4d×4)およびパクリタキセル(24mg/kg静脈内q2d×4)等の参照医薬に対する腫瘍保持動物の応答も示す。コントロールグループはリン酸緩衝食塩水(PBS)または生理食塩水のいずれかにより処置される。

40

【図6】胸腺欠損マウスにおける1および10mg/kgの静脈内投与後のCR011-vcMMAEの抗体の血清濃度-時間プロフィール。検出は、CR011抗原(CG56972、GPNMB)および西洋ワサビパーオキシダーゼ結合体化抗ヒトグロブリンを用いたサンドイッチELISAアッセイで達成された。示された結果はμg/mL(左のx軸)およびマイクロモル濃度(右のx軸)として示される血清濃度である。

【図7】治療パーセントとして表される総合応答を、5つの異なる段階的な投与間隔(すなわち、治療間の0、1、4、8および16日)で処置された試験動物について記録した。ラインの傾きは0と有意差がない(p<0.2904)。

【図8】投与間隔の関数として、かつ累積用量により階層化された完全退縮の比率。各グ

50

ループに関して、 $n = 6$ マウス/グループ。定着したSK-MEL-2腫瘍移植片(14日目、80mg)を有する胸腺欠損マウスをCR011-vcMMAEで静脈内処置し、完全な退縮の発生率を記録する。

【図9】GPNMBの異所性発現の効果またはCR011-vcMMAEに対する感受性。HEK293細胞に空ベクター(ベクター)またはGPNMBを含むプラスミド(GPNMB)を材料と方法に記載されたようにトランスフェクトする。A.細胞溶解物を、トランスフェクトされたHEK293細胞から調製し、GPNMB(上のパネル)またはアクチン(下のパネル)の発現を免疫ブロットにより決定する。レーン1:空ベクターのトランスフェクション。レーン2:GPNMBトランスフェクション。B.空ベクターまたはGPNMBがトランスフェクトされた細胞でのGPNMB発現のフローサイトメトリー分析。C.トランスフェクトされた細胞のCR011-vcMMAEのインビトロ成長の阻害。細胞を、多様な濃度のCR011-vcMMAE(菱形:ベクターまたは円:GPNMB)またはIgG2-vcMMAE(三角:ベクターまたは四角:GPNMB)で96時間処置する。クローン形成アッセイ後、生存フラクションを未処置コントロールに対して正規化し、GraphPad Prismグラフ化ソフトウェアを用いてコントロールの比率として示す。各処置を三連で実施する。2つの独立した実験からの代表的なグラフを示す。

10

【図10】内在性GPNMB発現に対するGPNMB siRNAの効果とCR011-vcMMAEに対する感受性。SK-Mel-2細胞に50nMのコントロールsiRNAまたはGPNMBを標的とするsiRNAをトランスフェクトする。A.トランスフェクションの2日後と4日後にトランスフェクトSK-Mel-2細胞から細胞溶解物を調製し、GPNMB(上のパネル)またはアクチン(下のパネル)の発現を免疫ブロットにより決定する。レーン1:模擬物(オリゴフェクタミン)トランスフェクション。レーン2:コントロールsiRNAトランスフェクション。レーン3:GPNMB siRNAトランスフェクション。B.トランスフェクションの2日後と4日後のGPNMB発現のフローサイトメトリー分析。SK-Mel-2細胞に、模擬物、コントロールsiRNAまたはGPNMB siRNAを材料と方法に示すようにトランスフェクトする。C.模擬物(菱形)、コントロールsiRNA(円)またはGPNMB siRNA(三角)をトランスフェクトしたSK-Mel-2細胞におけるCR011-vcMMAEのインビトロ成長阻害を材料と方法に記載するようにクローン形成アッセイにより決定する。生存フラクションを未処置コントロールに対して正規化し、GraphPad Prismグラフ化ソフトウェアを用いてコントロールの比率として示す。各処置を三連で実施する。2つの独立した実験からの代表的なグラフを示す。

20

30

【図11】IgG2(B2、B19)またはIgG1(コントロール、B16)コントロールに比較したアイソタイプコントロール、ハイブリドーマIgG2(B2)、組換えIgG2(B19)、およびGC56972/GPNMBに対するIgG1(B16)によるSK-MEL-2のFACS分析。

【図12】(A)PBMCおよびmAb(IgG1)が仲介するSK-MEL-2細胞のADCC。ADCCエフェクター機能は、示されるように10、30、60および100の標的:エフェクター比を用いて、2、5および10 μ g/200 μ lにて記載されたように測定する。(B)PBMCおよびmAb(IgG2)はSK-MEL-2細胞にADCCを引き起こさない。ADCCエフェクター機能は、示されるように10、30、60および100の標的:エフェクター比を用いて、0、2、5および10 μ g/200 μ lにて記載されたように測定する。

40

【図13-1】ヒト癌細胞系と組織におけるCG56972の発現。(A)ヒト脳腫瘍細胞系または(B)ヒト脳腫瘍神経膠腫および髄芽腫生検のRTQ PCR分析。

【図13-2】ヒト癌細胞系と組織におけるCG56972の発現。(C)ヒト脳腫瘍および乏突起細胞腫組織におけるCG56972発現のマイクロアレイ分析。材料と方法に記載のように組織または細胞系を収集し、mRNAを調製し、RTQ PCRまたはCurachip分析を実施した。

50

【図14】CG56972に対するCR011mAbの細胞表面結合のFACS分析。SK-MEL-2、XF-498、U-118-MG、SNB-78、SF-539およびSF-268の各細胞を飽和濃度(10 µg/mL)のCR011mAbまたはコントロールIgG2で標識する。材料と方法に記載するようにPE結合体化ヤギ抗ヒト第2抗体を用いるフローサイトメトリーにより結合mAbを検出する。GM:幾何平均。SF-268細胞系はCG56972転写物に対して陰性であり、陰性コントロールとして用いる。

【図15】ヒト脳腫瘍細胞系におけるCG5672発現の免疫プロット分析。細胞溶解物をトリス-グリシゲルで分離し、膜に移す。免疫プロット分析をCG56972に対するポリクローナル抗体により行なった後、材料と方法に記載のように増強化学発光検出により行なう。矢じりはp100と120CG56972種の相対的な移動度を示す。SF-268細胞系はCG56972転写物に対して陰性であり、陰性コントロールとして用いる。

10

【図16】星細胞腫/神経膠芽腫の細胞成長のCR0110-vcMMAEインビトロ成長阻害。XF-498、SNB-78、U-118-MG、SF-539、LOXIMVIおよびSF-268の各細胞を示された濃度のCR011-vcMMAEとともにインキュベートする。また、細胞を材料と方法に記載のようにコントロールPK16.3mAb(表1に示すデータ)とともにインキュベートする。細胞成長はクローン形成アッセイにより決定した。生存クローンをカウントし、GraphPad Prismグラフ化ソフトウェアを用いてプロットする。実験は三連で行い、2回繰り返す。代表的な実験を示す。細胞死滅のIC₅₀をng/mL濃度にて示す。LOXIMVIとSF-268細胞系はCG56972転写物に対して陰性であり、陰性コントロールとして用いる。

20

【図17】CR011改変抗体の開発。4つの抗体可変(V)領域(bi-scfvに関してCで示す)は、CR011と抗CD3の全IgGの抗原結合部位を構成する軽鎖可変領域(V_LおよびV_H)に由来する。2つの個々のscfv成分を連結する中央リンカー(点線で示す)は、bi-scfvの抗CD3 scfv成分が結合する細胞障害性T細胞により提供される効果的な細胞溶解活性等、各scfv成分の得られた活性を決定するのに重要な役割を果たすだろう。

【図18】A. CR011 scfv(四角)およびCR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット)bi-scfv(菱形)。両CR011抗体がGPNMB標的に結合した。B. 2種類のCR011改変抗体産物(矢印)のウエスタンブロット。クローン16はCR011 scfv(モノマー)を発現するCHOK1系に対応し、クローン17はCR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット)bi-scfv(ダイマー)を発現するCHOK1に対応した。クローン16と17は改変抗体産物を作るために用いられる。

30

【図19】標的細胞の細胞表面に発現した天然のGPNMBタンパク質に対するCR011 scfvおよびCR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット)bi-scfv産物の結合のフローサイトメトリー分析。ヒトT細胞がCD3の源として用いられ、SK-Mel-5細胞がGPNMBの源として用いられる。

【図20】細胞毒性分析は、精製CR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット)bi-scfv(CR011 scfvではない)が、Tリンパ球によるGPNMB陽性SK-Mel-5腫瘍細胞の死滅を引き起こすことを示した。

40

【図21】マレイミドコアプロイル-バリン-シトルリン-モノメチル-オーリスタチンE(vcMMAE)の化学構造。

【図22】CR011抗体のジスルヒドはTCEPの存在下に穏やかに還元され、1つのAbあたり約4つのチオールを生成する。次に、vcMMAEを抗体溶液に加える。チオレートのマレイミド基に対する求核攻撃は安定なチオエステル結合をもたらす。得られた結合体は混合物から精製する。

【図23】pH7.0およびpH9.0でTCEPの存在下または不存在下でのvcMMAEのNACysとの反応。1A:VCMMAEはリン酸(pH7)緩衝液中でのイン

50

キュベーション後に N A c C y s 付加物に完全に変わる。B ~ E : ホウ酸緩衝液中の v c M M A E のインキュベーション過程での副産物の出現。F ~ I : ホウ酸緩衝液 (p H 9) 中かつ T C E P の存在下での副産物の出現。

【図 2 4】システインと反応できず、したがって C R 0 1 1 と結合体化することのできないリテンションタイム 9 . 2 分の副産物の L C M S による同定。

【図 2 5】ホウ酸緩衝液 (p H 9 . 0) 中、T C E P の存在下または不存在下でのインキュベーション後の N A c C y s - v c M M A E 形成と副産物 (スクシンイミジル - v c M M A E) 形成の速度論。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 4 】

(発明の詳細な説明)

本明細書中で使用される「抗体」との用語は、免疫グロブリンまたはその断片または誘導体を指し、インビトロまたはインビボで産生するにかかわらず抗原結合部位を含有するポリペプチドを包含する。この用語には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体、非特異的抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、突然変異抗体、改変抗体およびグラフト化抗体が含まれるが、これらに限定されない。「インタクトな抗体」等の「インタクトな」との用語によって特に修飾されていない限り、本開示の目的のための「抗体」との用語は、F a b、F (a b ')₂、F v、s c F v、b i - s c F v、b i - A b、F d、d A b 等の抗体断片および抗原結合機能 (すなわち、G P N M B に特異的に結合する能力) を保持する他の抗体断片も包含する。

【 0 0 2 5 】

本明細書中で使用される「抗原結合領域」および「抗原結合断片」および「結合断片」との用語は、抗体と抗原との間の特異的な結合に關与するアミノ酸を含有する抗体分子の部分を用いる。例えば、抗原が大きい場合、抗原結合領域は抗原の一部のみに結合するだけであろう。抗原結合領域との特異的な相互作用に關与する抗原分子部分は、「エピトープ」または「抗原決定基」と称される。

【 0 0 2 6 】

抗原結合領域は、典型的には、抗体軽鎖可変領域 (V_L) と抗体重鎖可変領域 (V_H) とを含むが、両方を含むことは必ずしも必要ではない。例えば、いわゆる F d 抗体断片は V_H 領域のみからなるが、それでもなおインタクトな抗体の一部の抗原結合機能を保持している。

【 0 0 2 7 】

本明細書中で使用される「レパートリー」との用語は、発現させる免疫グロブリンをコードする配列に完全または部分的に由来するヌクレオチドの遺伝的に多様な集団をいう。これらの配列は、例えば、H鎖のV、DおよびJセグメント、および例えば、L鎖のVおよびJセグメントのインビボ再編成により生じる。もしくは、それら配列は、再構成を引き起こすインビトロ刺激によって細胞系から生じさせてよい。もしくは、それら配列の一部または全ては、例えば、未再構成のVセグメントをDセグメントおよびJセグメントに、ヌクレオチド合成、ランダム変異導入法および他の方法 (例えば、米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号に開示された方法) によって組み合わせ得てもよい。

【 0 0 2 8 】

本明細書中で使用される「特異的相互作用」および「特異的結合」との用語は、比較的安定な結合体を生理学的条件下に形成する2つの分子をいう。特異的結合は、高親和性と低~中容量とにより特徴付けられ、これは中~容量を有する低親和性を通常有する非特異的結合と区別される。典型的には、親和性定数 K_A が 1 0⁶ M⁻¹ よりも高いか、またはさらに好ましくは 1 0⁸ M⁻¹ より高い場合に、結合は特異的であるとみなされる。必要であれば、非特異的結合は、特異的結合に実質的に影響を与えずに、結合条件を変えることにより低減させることができる。抗体の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合させる時間、ブロッキング剤 (例えば、血清アルブミン、ミルクカゼイン) の濃度等の適当

10

20

30

40

50

な結合条件は当業者により通常の技術を用いて最適化されるだろう。

【0029】

本明細書中で使用される「実質的に示されている」との用語は、本発明の関連するCDR、V_HまたはV_L領域が、配列の示された特定領域（例えば、CDR）と同一であるか、またはごく僅かな違いを有するだけであることを示す。ごく僅かな違いとして、特定領域の配列中のいずれか5個のアミノ酸のうち1個または2個のアミノ酸の置換等、マイナーなアミノ酸変化が挙げられる。

【0030】

本明細書中で使用される「CR011」との用語は、GPNMBに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体をいう。一部実施態様において、CR011は本出願の表2A～表2Dに同定されている抗体をいう。一部実施態様において、CR011は本発明に記載されるMab1.15.1をいう。

【0031】

「GPNMB」および「CG56972」との用語はここでは互換的に使用される。本明細書中で使用される「GPNMB」または「CG56972」との用語は、配列番号289に示されるアミノ酸配列を有する膜貫通糖タンパク質、その類似体、誘導体または断片、またはGPNMBを含む融合タンパク質、その類似体、誘導体または断片をいう。一定の実施態様において、「GPNMB」との用語は、GPNMBの成熟したプロセス形をいう。他の実施態様において、「GPNMB」との用語は、GPNMBの細胞外領域をいう。

【0032】

本明細書中で使用される「GPNMB活性」との用語は、GPNMBに関連する1種類以上の活性をいう。GPNMB活性を「調節する」とは、GPNMBにより観察され、かつGPNMBに帰することのできるベースライン結果を変更することである。GPNMB活性を「中和する」とは、1種類以上の効果、例えば、GPNMBにより観察され、かつGPNMBに帰することのできる活性を無効にすることである。

【0033】

本明細書中で使用される「単離された」との用語は実質的にその自然環境にない分子をさす。例えば、単離されたタンパク質は、それが由来する細胞源または組織源の細胞物質または他のタンパク質を実質的に含まない。「単離された」との用語は、単離されたタンパク質が、医薬組成物として投与されるのに十分純粋であるか、または少なくとも70～80%（w/w）純粋、より好ましくは少なくとも80～90%（w/w）純粋、さらにより好ましくは90～95%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%（w/w）純粋である調製物をいう。

【0034】

本明細書中で使用される「阻害する」または「の阻害」との用語は、測定可能な量までの減少、または完全に阻害することをいう。

【0035】

細胞に対する作用薬の効果に関して本明細書中で使用される「細胞障害効果」は細胞の死滅を意味する。「細胞静止作用」とは細胞増殖の阻害をいう。「細胞毒性薬」とは、細胞に対して細胞障害または細胞静止作用を有することで細胞集団内の細胞の成長をそれぞれ枯渇させるか、または阻害する物質をいう。

【0036】

本明細書中で使用される「妨げる」、「予防する」、「妨げている」、「予防している」、「阻止」および「予防」との用語は、治療薬の投与または複数の治療薬の組合せの投与から得られる被験体中のGPNMBの異常な発現および/または活性に関連した疾患（例えば、癌）の発達または発症の阻害、またはGPNMBの異常な発現および/または活性に関連した疾患（例えば、癌）の1つ以上の症状の再発、発症または発達の阻止をいう。

【0037】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される「有効量」との用語は、患者の症状の改善をもたらすか、所望の生物学的成果を達成するために、GPNMBの活性を減少するのに十分な投与量または量をいう。

【0038】

本明細書中で使用される「予防効果のある量」との用語は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連する疾患（例えば、癌）またはその1つ以上の症状の発達、再発または発症の阻止をもたらすか、または別の治療薬の予防効果を増強または向上するのに十分な治療薬の量をいう。

【0039】

本明細書中で使用される「プロトコール」は投与スケジュールおよび投与計画を含む。ここでのプロトコールは使用方法であり、予防プロトコールと治療プロトコールを含む。

【0040】

本明細書中で使用される「被験体」および「患者」との用語は互換的に用いられる。本明細書中で使用される「被験体」および「患者」との用語は動物、好ましくは、哺乳類、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス）および霊長類（例えば、カニクイザル等のサル、チンパンジーおよびヒト）、より好ましくはヒトをいう。

【0041】

ここで使用される「治療剤」との用語は、本発明において、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連する疾患（例えば、癌）またはその1つ以上の症状の阻止、治療、処置または改善に用いることのできる物質をいう。一定の実施態様において、「治療剤」とは、GPNMBに免疫特異的に結合する抗体をいう。一定の他の実施態様において、「治療剤」との用語はGPNMBに免疫特異的に結合する抗体以外の物質をいう。

【0042】

本明細書中で使用される「治療」および「治療剤」との用語は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連する疾患（例えば、癌）またはその1つ以上の症状の阻止、治療、処置または改善に用いることのできるプロトコール、方法および/または物質をいう。一定の実施態様において、「治療」および「治療剤」との用語は、癌、または医療関係者等の当業者に知られているその1つ以上の症状の治療、処置、予防または改善に有用な抗癌治療、生物学的治療、支持療法および/または他の治療をいう。

【0043】

本明細書中で使用される「治療する」、「治療」および「治療している」との用語は、原発性、局所的または転移性癌組織の根絶、除去、緩和または調節、またはGPNMBの異常な発現および/または活性に関連した疾患の進行、重症度および/または期間の減少または改善、または1つ以上の療法剤の投与から生じるそれらの1つ以上の症状の改善をいう。一定の実施態様において、癌の文脈におけるそのような用語は、癌性細胞の成長の低下、癌性細胞の数の減少および/または腫瘍の成長、形成および/または容積の減少をいう。他の実施態様において、そのような用語は、そのような疾患を有する被験体に1つ以上の療法剤を投与することから生じる癌の広がりの最小化または遅延をいう。治療として、例えば、症状の重症度、症状の数または再発の頻度の低減を挙げることができる。

【0044】

特に定めのない限り、ここに記載の本発明に関連して使用される科学および技術的用語は、当業者により共通して理解される意味を有するものとする。さらに、文脈により必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。一般的に、ここに記載の細胞および組織培養、分子生物学およびタンパク質とオリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド化学およびハイブリダイゼーションに関連して利用される用語は当分野でよく知られ、常用されている。標準的な技術が組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成および組織培養と形質転換（例えば、電気穿孔法、リポフェクション）のために用いられる。酵素反応および精製技術は、製造業者の指示書によるか、または当分野で通常達成されるように、またはここに記載のように実施する。前記技術と手順は、一

10

20

30

40

50

般的に、当分野でよく知られた慣用の方法によるか、または本明細書全体にわたって引用され、論じられる多様な一般的な文献やさらに特定の文献に記載されるように実施する (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y. 1989 を参照)。ここに記載の分析化学、合成有機化学および医薬品化学と製薬化学に関連して利用される用語および実験手順と技術は当分野でよく知られており、慣用されるものである。標準的な技術が、化学合成、化学分析、医薬品、製剤および投与ならびに患者の治療のために用いられる。

【 0 0 4 5 】

本発明は、GPNMB に対して特異性を有する V_H と V_L 領域 FR と CDR 領域の塩基配列やアミノ酸配列等、生殖系列ヒト抗体重鎖 V、D、J の組合せと軽鎖 V、J の組合せを提供する。

【 0 0 4 6 】

抗原にさらされると、生殖系列配列に基づく抗原結合特異性を有する B 細胞は活性化され、増殖し、分化して、異なるアイソタイプの免疫グロブリンを産生し、ならびに体細胞突然変異および / または親和性成熟を受けて、抗原に対するさらに高い親和性を有する免疫グロブリンを産生する。本発明は、GPNMB に対する特異性を有するそのような親和性成熟 V 領域 FR と CDR 領域の塩基配列とアミノ酸配列を提供する。

【 0 0 4 7 】

抗体分子の抗原結合部分を含む Fab タイプの抗体断片は、V 領域と第一定常領域を有する H 鎖の一部にジスルヒド結合により共有結合した L 鎖からなっておりよい。一本鎖 Fv 抗体断片 (scFv) はポリペプチドリンカーにより L 可変領域に結合した H 可変領域を有する。本発明は、GPNMB に対して特異的に結合する抗体の生殖系列領域または親和性成熟 V 領域に由来する配列を有する Fab 分子や scFv 分子等の抗体断片を提供する。

【 0 0 4 8 】

二重特異性抗体や二機能性抗体は、2 つの異なる重 / 軽鎖対および 2 つの異なる結合部位を有する人工的ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合や Fab ' 断片の結合等の多様な方法により作ることができる (例えば、Songsivilai & Lachmann, 1990 Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321; Kostelny et al., 1992 J. Immunol. 148: 1547 - 1553 を参照)。二重特異性抗体は、単一結合部位を有する断片の形態 (例えば、Fab、Fab ' および Fv) では存在しない。

【 0 0 4 9 】

そのような二機能性抗体や二重特異性抗体が本発明で意図され、本発明に包含されることが理解されよう。GPNMB、および細胞傷害性 T リンパ球上の CD3 抗体に対して特異性を有する二重特異性一本鎖抗体は、これら T 細胞を、GPNMB を発現する腫瘍細胞に向かわせ、腫瘍のアポトーシスと根絶を引き起こすために使用することができる。この目的のための二重特異性 scFv 構築物がここに記載される。GPNMB に対して特異的な scFv 成分は、ここに記載の抗 GPNMB 抗体から得ることができる。一部実施態様において、ここに開示される抗 GPNMB 抗体成分は、GPNMB に対する生物学的活性 scFv を作るために用いることができる。治療に役立つ二重特異性 scFv の抗 CD3 scFv 成分はジェンバンクに寄託された配列 (受託番号 CAE85148) から得られた。CD3 または他の T 細胞抗原を標的とすることが知られている別の抗体は、一本鎖骨格にあらうが、完全な IgG にあらうが、抗 GPNMB に結合させた場合に悪性腫瘍を治療するために同様に有効であらう。

【 0 0 5 0 】

GPNMB 結合性ヒト抗体は、L カッパまたはラムダ定常領域等の H または L 定常領域またはアイソタイプ H 定常領域を含んでよい。本発明の一実施態様において、GPNMB に対する結合特異性を有するヒト抗体は、下記重鎖 V 領域: VH1 - 2 (配列番号 308

10

20

30

40

50

)、VH2-5(配列番号360)、VH3-11(配列番号361)、VH3-21(配列番号362)、VH3-30(配列番号363)、VH3-33(配列番号364)、VH4-31(配列番号365)、VH4-59(配列番号366)またはVH5-51(配列番号367);下記重鎖D領域:D1-20(配列番号375により翻訳されるアミノ酸配列)、D1-26(配列番号376により翻訳されるアミノ酸配列)、D3-10(配列番号377により翻訳されるアミノ酸配列)、D3-16(配列番号:378により翻訳されるアミノ酸配列)、D3-22(配列番号379により翻訳されるアミノ酸配列)、D3-9(配列番号380により翻訳されるアミノ酸配列)、D4-17(配列番号381により翻訳されるアミノ酸配列)、D5-24(配列番号382により翻訳されるアミノ酸配列)、D6-13(配列番号383により翻訳されるアミノ酸配列)またはD6-19(配列番号384により翻訳されるアミノ酸配列);下記重鎖J領域:JH3b(配列番号385)、JH4b(配列番号386)、JH5b(配列番号387)またはJH6b(配列番号388);軽鎖Vカップ領域A2(配列番号373)、A3(配列番号371)、A20(配列番号370)、A27(配列番号369)、A30(配列番号374)、L2(配列番号372)またはO1(配列番号368);およびJ領域JK1(配列番号389)、JK2(配列番号390)、JK3(配列番号391)、JK4(配列番号392)またはJK5(配列番号393)等の生殖細胞系列配列を含む。(一般的には、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1987 and 1991;さらに、Chothia & Lesk 1987 J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. 1989 Nature 342:878-883を参照されたい)。発明の特定の実施態様において、GPNMBに対する結合特異性を有するヒト抗体は表1に示されるように組み合わせられた生殖細胞系列領域である。

表1:ヒト抗GPNMB抗体生殖細胞系列領域組合せ

【0051】

【表1】

Ab	VH	D	JH	VL	JL
1.10.2	VH4-59	D6-19	JH4b	A3	JK5
1.15.1	VH4-31	D1-20	JH4b	L2	JK1
1.2.2	VH2-5	D3-16	JH4b	O1	JK5
1.7.1	VH4-31	D1-20	JH4b	L2	JK1
2.10.2	VH3-30	D3-10	JH6b	A3	JK5
2.15.1	VH3-33	D4-17	JH4b	A20	JK4
2.16.1	VH3-11	D6-13	JH3b	L2	JK3
2.17.1	VH1-2	D6-19	JH5b	A2	JK4
2.21.2	VH3-21	D1-26	JH4b	A20	JK5
2.22.1	VH4-31	D3-22	JH6b	A30	JK1
2.24.1	VH5-51	D5-24	JH4b	A27	JK1
2.3.1	VH1-2	D3-10	JH4b	A2	JK4
2.7.1	VH3-33	D3-10	JH4b	A20	JK4
2.8.1	VH2-5	D3-9	JH4b	O1	JK4

本発明の実施態様において、単離された抗体は、配列番号2、配列番号20、配列番号38、配列番号56、配列番号74、配列番号92、配列番号110、配列番号128、配列番号146、配列番号164、配列番号182、配列番号200、配列番号218、

配列番号 236、配列番号 253、配列番号 256、配列番号 260、配列番号 265、配列番号 270、配列番号 274、配列番号 277、配列番号 281 および配列番号 285 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ポリペプチドを有する。そのようなアミノ酸配列は、配列番号 1、配列番号 19、配列番号 37、配列番号 55、配列番号 73、配列番号 91、配列番号 109、配列番号 127、配列番号 145、配列番号 163、配列番号 181、配列番号 199、配列番号 217 および配列番号 235 からなる群から選択される塩基配列によってコードされうる。別の実施態様において、本発明は、GPNMB に特異的に結合し、かつ配列番号 11、配列番号 29、配列番号 47、配列番号 65、配列番号 83、配列番号 101、配列番号 119、配列番号 137、配列番号 155、配列番号 173、配列番号 191、配列番号 209、配列番号 227 および配列番号 245 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ポリペプチドを有する単離された抗体を提供する。そのようなアミノ酸配列は、配列番号 10、配列番号 28、配列番号 46、配列番号 64、配列番号 82、配列番号 100、配列番号 118、配列番号 136、配列番号 154、配列番号 172、配列番号 190、配列番号 208、配列番号 226 および配列番号 244 からなる群から選択される塩基配列によってコードされうる。さらに別の実施態様において、本発明は、GPNMB に特異的に結合し、かつ配列番号 2、配列番号 20、配列番号 38、配列番号 56、配列番号 74、配列番号 92、配列番号 110、配列番号 128、配列番号 146、配列番号 164、配列番号 182、配列番号 200、配列番号 218、配列番号 236、配列番号 253、配列番号 256、配列番号 260、配列番号 265、配列番号 270、配列番号 274、配列番号 277、配列番号 281 および配列番号 285 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチドを有し、かつ配列番号 11、配列番号 29、配列番号 47、配列番号 65、配列番号 83、配列番号 101、配列番号 119、配列番号 137、配列番号 155、配列番号 173、配列番号 191、配列番号 209、配列番号 227 および配列番号 245 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチドを有する単離された抗体を提供する。本発明のさらに別の実施態様において、抗 GPNMB 抗体は、下記の H または L の CDR ポリペプチド配列：配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62、配列番号 67、配列番号 69、配列番号 71、配列番号 76、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 85、配列番号 87、配列番号 89、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 98、配列番号 103、配列番号 105、配列番号 107、配列番号 112、配列番号 114、配列番号 116、配列番号 121、配列番号 123、配列番号 125、配列番号 130、配列番号 132、配列番号 134、配列番号 139、配列番号 141、配列番号 143、配列番号 148、配列番号 150、配列番号 152、配列番号 157、配列番号 159、配列番号 161、配列番号 166、配列番号 168、配列番号 170、配列番号 175、配列番号 177、配列番号 179、配列番号 184、配列番号 186、配列番号 188、配列番号 193、配列番号 195、配列番号 197、配列番号 202、配列番号 204、配列番号 206、配列番号 211、配列番号 213、配列番号 215、配列番号 220、配列番号 222、配列番号 224、配列番号 229、配列番号 231、配列番号 233、配列番号 238、配列番号 240、配列番号 242、配列番号 247、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 254、配列番号 257、配列番号 261、配列番号 266、配列番号 271、配列番号 278、配列番号 282、配列番号 286、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 262、配列番号 267、配列番号 272、配列番号 275、配列番号 279、配列番号 283、配列番号 287、配列番号 259、配列番号 263、配列番号 264、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 273、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 284 および配列番号 288 の少なくとも 1 つの CDR を含む。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

特定の実施態様において、ヒト抗GPNMB抗体は、Mab1.10.2、Mab1.15.1、Mab1.2.2、Mab1.7.1、Mab2.10.2、Mab2.15.1、Mab2.16.1、Mab2.17.1、Mab2.21.2、Mab2.22.1、Mab2.24.1、Mab2.3.1、Mab2.7.1およびMab2.8.1である。これらの抗体は、表2A～表2Dに示されるように本出願で同定されたアミノ酸配列と、それらをコードする核酸配列を有する。

表2A：抗体の塩基（DNA）配列とアミノ酸配列

【0053】

【表2A】

遺伝子断片	1.10.2	1.15.1	1.2.2	1.7.1
H可変DNA	配列番号 1	配列番号 19	配列番号 37	配列番号 55
H可変アミノ酸	配列番号 2	配列番号 20	配列番号 38	配列番号 56
HFR1	配列番号 3	配列番号 21	配列番号 39	配列番号 57
HCDR1	配列番号 4	配列番号 22	配列番号 40	配列番号 58
HFR2	配列番号 5	配列番号 23	配列番号 41	配列番号 59
HCDR2	配列番号 6	配列番号 24	配列番号 42	配列番号 60
HFR3	配列番号 7	配列番号 25	配列番号 43	配列番号 61
HCDR3	配列番号 8	配列番号 26	配列番号 44	配列番号 62
HFR4	配列番号 9	配列番号 27	配列番号 45	配列番号 63
L可変DNA	配列番号 10	配列番号 28	配列番号 46	配列番号 64
L可変アミノ酸	配列番号 11	配列番号 29	配列番号 47	配列番号 65
LFR1	配列番号 12	配列番号 30	配列番号 48	配列番号 66
LCDR1	配列番号 13	配列番号 31	配列番号 49	配列番号 67
LFR2	配列番号 14	配列番号 32	配列番号 50	配列番号 68
LCDR2	配列番号 15	配列番号 33	配列番号 51	配列番号 69
LFR3	配列番号 16	配列番号 34	配列番号 52	配列番号 70
LCDR3	配列番号 17	配列番号 35	配列番号 53	配列番号 71
LFR4	配列番号 18	配列番号 36	配列番号 54	配列番号 72

10

20

表2B：抗体の塩基（DNA）配列とアミノ酸配列

【0054】

【表2B】

遺伝子断片	2.10.2	2.15.1	2.16.1	2.17.1
H可変DNA	配列番号 73	配列番号 91	配列番号 109	配列番号 127
H可変アミノ酸	配列番号 74	配列番号 92	配列番号 110	配列番号 128
HFR1	配列番号 75	配列番号 93	配列番号 111	配列番号 129
HCDR1	配列番号 76	配列番号 94	配列番号 112	配列番号 130
HFR2	配列番号 77	配列番号 95	配列番号 113	配列番号 131
HCDR2	配列番号 78	配列番号 96	配列番号 114	配列番号 132
HFR3	配列番号 79	配列番号 97	配列番号 115	配列番号 133
HCDR3	配列番号 80	配列番号 98	配列番号 116	配列番号 134
HFR4	配列番号 81	配列番号 99	配列番号 117	配列番号 135
L可変DNA	配列番号 82	配列番号 100	配列番号 118	配列番号 136
L可変アミノ酸	配列番号 83	配列番号 101	配列番号 119	配列番号 137
LFR1	配列番号 84	配列番号 102	配列番号 120	配列番号 138
LCDR1	配列番号 85	配列番号 103	配列番号 121	配列番号 139
LFR2	配列番号 86	配列番号 104	配列番号 122	配列番号 140
LCDR2	配列番号 87	配列番号 105	配列番号 123	配列番号 141
LFR3	配列番号 88	配列番号 106	配列番号 124	配列番号 142
LCDR3	配列番号 89	配列番号 107	配列番号 125	配列番号 143
LFR4	配列番号 90	配列番号 108	配列番号 126	配列番号 144

30

40

表2C：抗体の塩基（DNA）配列とアミノ酸配列

【0055】

【表 2 C】

遺伝子断片	2.21.2	2.22.1	2.24.1	2.3.1
H可変DNA	配列番号 145	配列番号 163	配列番号 181	配列番号 199
H可変アミノ酸	配列番号 146	配列番号 164	配列番号 182	配列番号 200
H FR1	配列番号 147	配列番号 165	配列番号 183	配列番号 201
H CDR1	配列番号 148	配列番号 166	配列番号 184	配列番号 202
H FR2	配列番号 149	配列番号 167	配列番号 185	配列番号 203
H CDR2	配列番号 150	配列番号 168	配列番号 186	配列番号 204
H FR3	配列番号 151	配列番号 169	配列番号 187	配列番号 205
H CDR3	配列番号 152	配列番号 170	配列番号 188	配列番号 206
H FR4	配列番号 153	配列番号 171	配列番号 189	配列番号 207
L可変DNA	配列番号 154	配列番号 172	配列番号 190	配列番号 208
L可変アミノ酸	配列番号 155	配列番号 173	配列番号 191	配列番号 209
L FR1	配列番号 156	配列番号 174	配列番号 192	配列番号 210
L CDR1	配列番号 157	配列番号 175	配列番号 193	配列番号 211
L FR2	配列番号 158	配列番号 176	配列番号 194	配列番号 212
L CDR2	配列番号 159	配列番号 177	配列番号 195	配列番号 213
L FR3	配列番号 160	配列番号 178	配列番号 196	配列番号 214
L CDR3	配列番号 161	配列番号 179	配列番号 197	配列番号 215
L FR4	配列番号 162	配列番号 180	配列番号 198	配列番号 216

10

表 2 D : 抗体の塩基 (DNA) 配列とアミノ酸配列

【 0 0 5 6 】

【表 2 D】

遺伝子断片	2.7.1	2.8.1
H可変DNA	配列番号 217	配列番号 235
H可変アミノ酸	配列番号 218	配列番号 236
H FR1	配列番号 219	配列番号 237
H CDR1	配列番号 220	配列番号 238
H FR2	配列番号 221	配列番号 239
H CDR2	配列番号 222	配列番号 240
H FR3	配列番号 223	配列番号 241
H CDR3	配列番号 224	配列番号 242
H FR4	配列番号 225	配列番号 243
L可変DNA	配列番号 226	配列番号 244
L可変アミノ酸	配列番号 227	配列番号 245
L FR1	配列番号 228	配列番号 246
L CDR1	配列番号 229	配列番号 247
L FR2	配列番号 230	配列番号 248
L CDR2	配列番号 231	配列番号 249
L FR3	配列番号 232	配列番号 250
L CDR3	配列番号 233	配列番号 251
L FR4	配列番号 234	配列番号 252

20

30

(VH 4 - 3 1 由来の抗 G P N M B 抗体)

特定の実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 VH 4 - 3 1 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 0 5 7 】

40

【化 1】

X₁SGPGLVKPSQX₂LSLTCTVS GGSIS SX₃X₄YX₅WX₆ WIRX₇HPGKGLEWIG
YIYYSGX₈TYX₉NPSLKS RVX₁₀ISVDTSKNQFSLX₁₁LSSVTAADTAVVYCAR

ここで: X₁は Eまたは Qである
X₂は Tまたは Nである
X₃は A, Fまたは Gである
X₄は Nまたは Gである
X₅は Yまたは Fである
X₆は Tまたは Sである
X₇は Qまたは Hである
X₈は Sまたは Nである
X₉は C, Sまたは Yである
X₁₀は Iまたは Tである
X₁₁は Kまたは Tである
(配列番号 253).

10

特定の実施態様において、配列番号 2 5 3 は D 3 - 2 2 または D 1 - 2 0 に組み合わせられる。さらに、配列番号 2 5 3 と D 3 - 2 2 または D 1 - 2 0 との組み合わせが J H 6 b または J H 4 b と組み合わせられ、特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらの G P N M B 結合性ヒト抗体、例えば、M a b 1 . 1 5 . 1、M a b 1 . 7 . 1 および M a b 2 . 2 2 . 1 は配列番号 2 0、配列番号 5 6 および配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 9、配列番号 5 5 および配列番号 1 6 3 の塩基配列によりコードされる。

【 0 0 5 8 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖 C D R 1 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 4 - 3 1 C D R またはその親和性成熟配列である：

20

【 0 0 5 9 】

【化 2】

CDR1: GGSIS SX₃X₄YX₅WX₆

ここで: X₃は A, Fまたは Gである
X₄は Nまたは Gである
X₅は Yまたは Fである
X₆は Tまたは Sである
(配列番号 254).

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 2 2、配列番号 5 8 および配列番号 1 6 6 から選択される C D R 1 配列を含む。

30

【 0 0 6 0 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 2 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 4 - 3 1 C D R またはその親和性成熟配列である：

【 0 0 6 1 】

【化 3】

CDR2: YIYYSGX₈TYX₉NPSLKS

ここで: X₈は Sまたは Nである
X₉は C, Sまたは Yである
(配列番号 255).

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 2 4、配列番号 6 0 および配列番号 1 6 8 から選択される C D R 2 配列を含む。

40

【 0 0 6 2 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、配列番号 1 7 0 を有する D 3 - 2 2、J H 6 b の組合せである。もしくは、特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、配列番号 2 6 または配列番号 6 2 を有する D 1 - 2 0、J H 4 b の組合せである。

【 0 0 6 3 】

(V H 1 - 2 由来の抗 G P N M B 抗体)

特別な実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 V H 1 - 2 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 0 6 4 】

50

【化4】

QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT GX₁YMH WVRQX₂PGQGLEWMG
WINPNSGGTX₃YX₄QKFQX₅ RVTMTRDTSISTX₆YMELSRRLRSDDTAVYYCAR

ここで: X₁はYまたはFである
X₂はAまたはTである
X₃はNまたはYである
X₄はAまたはVである
X₅はDまたはGである
X₆はAまたはVである
(配列番号 256).

特定の実施態様において、配列番号256はD3-10またはD6-19に組み合わされる。さらに、配列番号256とD3-10またはD6-19との組み合わせがJH4b
またはJH5bと組み合わせられ、特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらのG
PNMB結合性ヒト抗体、例えば、Mab2.3.1およびMab2.17.1は配列番
号128および配列番号200のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号127および配列番
号199の塩基配列によりコードされうる。

10

【0065】

さらに、特別な実施態様において、H鎖CDR1配列は、下記式の生殖細胞系VH1-
2CDRまたはその親和性成熟配列である：

【0066】

【化5】

CDR1: GYTFTGX₁YMH

ここで: X₁はYまたはFである
(配列番号 257)

20

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号130および配列番
号202から選択されるCDR1配列を含む。

【0067】

特別な実施態様において、H鎖CDR2配列は、下記式の生殖細胞系VH1-2CDR
またはその親和性成熟配列である：

【0068】

【化6】

CDR2: WINPNSGGTX₃YX₄QKFQX₅

ここで: X₃はNまたはYである
X₄はAまたはVである
X₅はDまたはGである
(配列番号 :258).

30

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号132および配列番
号204から選択されるCDR2配列を含む。

【0069】

特別な実施態様において、H鎖CDR3配列は、下記のアミノ酸配列を有する、生殖細
胞系D3-10、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列である：

【0070】

【化7】

CDR3: X₁X₂X₃GSGSX₄X₅

ここで : X₁はYまたはDである
X₂はYまたはFである
X₃はYまたはFである
X₄はYまたはLである
X₅はYまたはLである
(配列番号 :259).

40

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号134および配列番
号206から選択されるCDR3配列を含む。

【0071】

(VH2-5由来の抗GPNMB抗体)

50

特別な実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 V H 2 - 5 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 0 7 2 】

【 化 8 】

ITLKESGPTLVX₁PTQTLTCTFS GFSLS X₂X₃GX₄GVG WIRQPPGKALX₅WLX₆
LIYWNDKX₇YSPSLX₈S RLTIKDTSKNQVVLX₉X₁₀TNMDPVDATYYCAH

ここで： X₁ は K または T である
X₂ は T または A である
X₃ は S または G である
X₄ は M または V である
X₅ は D または E である
X₆ は A または T である
X₇ は R または H である
X₈ は K または R である
X₉ は T または R である
X₁₀ は M または I である
(配列番号 :260)。

10

特定の実施態様において、配列番号 2 6 0 は D 3 - 9 または D 3 - 1 6 に組み合わされ、さらに、 J H 4 b と組み合わされる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらの G P N M B 結合性ヒト抗体、例えば、 M a b 2 . 8 . 1 および M a b 1 . 2 . 2 は配列番号 3 8 および配列番号 2 3 6 のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 7 および配列番号 2 3 5 の塩基配列によりコードされうる。

【 0 0 7 3 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖 C D R 1 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 2 - 5 C D R またはその親和性成熟配列である：

20

【 0 0 7 4 】

【 化 9 】

CDR1: GFSLS X₂X₃GX₄GVG

ここで： X₂ は T または A である
X₃ は S または G である
X₄ は M または V である
(配列番号 :261)。

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 4 0 および配列番号 2 3 8 から選択される C D R 1 配列を含む。

【 0 0 7 5 】

30

特別な実施態様において、H鎖 C D R 2 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 2 - 5 C D R 2 またはその親和性成熟配列である：

【 0 0 7 6 】

【 化 1 0 】

CDR2: LIYWNDKX₇YSPSLX₈S

ここで： X₇ は R または H である
X₈ は K または R である
(配列番号 :262)。

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 4 2 および配列番号 2 4 0 から選択される C D R 2 配列を含む。

【 0 0 7 7 】

40

特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、生殖細胞系 D 3 - 9、J H 4 b の組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【 0 0 7 8 】

【 化 1 1 】

CDR3: X₁YDILTGX₂X₃

ここで、 X 1 は Y または H である；
X 2 は Y または F である；および
X 3 は Y または N である
(配列番号 2 6 3)。

【 0 0 7 9 】

50

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 2 4 2 の C D R 3 アミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 0 】

さらに別の特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、生殖細胞系 D 3 - 1 6、J H 4 b の組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【 0 0 8 1 】

【 化 1 2 】

CDR3:YDYX₁WGS

ここで、X 1 は V または D である

(配列番号 2 6 4)

10

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 4 4 の C D R 3 アミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 2 】

(V H 3 - 3 3 由来の抗 G P N M B 抗体)

特別な実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 V H 3 - 3 3 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 0 8 3 】

【 化 1 3 】

QVQLX₁X₂SGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFX₃X₄YGX₅H WVRQAPGKGLBWVA
VIWX₆DGX₇NKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDX₈AVYYCAX₉

20

ここで：X1は V または E である

X2は E または Q である

X3は S または N である

X4は S または N である

X5は M または I である

X6は Y または F である

X7は S または R である

X8は T または A である

X9は R または K である

(配列番号 :265).

特定の実施態様において、配列番号 2 5 6 は D 3 - 1 0 または D 4 - 1 7 に組み合わせられ、さらに J H 4 b と組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらの G P N M B 結合性ヒト抗体、例えば、M a b 2 . 7 . 1 および M a b 2 . 1 5 . 1 は配列番号 9 2 および配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 9 1 および塩基配列 2 1 7 によりコードされうる。

30

【 0 0 8 4 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖 C D R 1 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 3 - 3 3 C D R またはその親和性成熟配列である：

【 0 0 8 5 】

【 化 1 4 】

CDR1: GFTFX₃X₄YGX₅H

ここで、X 3 は S または N である；

X 4 は S または N である；

X 5 は M または I である；

(配列番号 2 6 6)

40

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 9 4 および配列番号 2 2 0 から選択される C D R 1 配列を含む。

【 0 0 8 6 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 2 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 3 - 3 3 C D R 2 またはその親和性成熟配列である：

【 0 0 8 7 】

【化15】

CDR2: VIWX₆DGX₇NKYYADSVKG

ここで、X₆はYまたはFである；
X₇はSまたはRである
(配列番号267)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号96および配列番号222から選択されるCDR2配列を含む。

【0088】

特別な実施態様において、H鎖CDR3配列は、D3-10、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【0089】

【化16】

CDR3: YYYGSGX₁

ここで、X₁はSまたはLである
(配列番号268)

特定の実施態様は、配列番号224のCDR3アミノ酸配列を有する抗GPNMB抗体2.7.1である。

【0090】

別の実施態様において、H鎖CDR3配列は、D4-17、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【0091】

【化17】

CDR3: DYGD_{X1}

ここで、X₁はYまたはSである；

(配列番号269)

特定の実施態様は、配列番号98のCDR3アミノ酸配列を有する抗GPNMB抗体2.15.1である。

【0092】

(VH3-11由来の抗GPNMB抗体)

特別な実施態様において、本発明のGPNMB結合性ヒト抗体は、生殖細胞系V重鎖領域VH3-11を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【0093】

【化18】

QVQLVESGGGLV_KPGGSLRLS_{CAAS} GFTFS₁YX₂MX₃ WIRQAPGKGLEWV_S
YISX₄SGSX₅X₆X₇YADSVKG RFTX₈SRDNAKNSLYLQMN_{SL}RAEDTAVYYCAR

ここで X₁はD or S である
X₂はS or Y である
X₃はS or T である
X₄はS or I である
X₅はT or I である
X₆はT or I である
X₇はY or H である
X₈はI or M である
(配列番号:270).

特定の実施態様において、配列番号270はD6-13に組み合わせられ、さらにJH3bと組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらのGPNMB結合性ヒト抗体、例えば、Mab2.16.1は配列番号110のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号109の塩基配列によりコードされうる。

【0094】

さらに、特別な実施態様において、H鎖CDR1配列は、下記式の生殖細胞系VH3-11CDR1またはその親和性成熟配列である：

【0095】

【化19】

CDR1: GFTFS X₁YX₂MX₃

10

20

30

40

50

ここで、X 1 は D または S である ;
 X 2 は S または Y である ;
 X 3 は S または T である ;
 (配列番号 2 7 1)

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 1 1 2 の C D R 1 配列を含む。

【 0 0 9 6 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 2 配列は、下記式の生殖細胞系 V H 3 - 1 1 C D R 2 またはその親和性成熟配列である :

【 0 0 9 7 】

【 化 2 0 】

CDR2: Y1SX₄SGSX₃X₆X₇YADSVK_G

ここで、X 4 は S または I である ;
 X 5 は T または I である ;
 X 6 は T または I である ;
 X 7 は Y または H である ;
 (配列番号 2 7 2)

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 1 1 4 の C D R 2 配列を含む。

【 0 0 9 8 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、D 6 - 1 3、J H 3 b の組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む :

【 0 0 9 9 】

【 化 2 1 】

CDR3: X₁X₂AAAG--AFDI

ここで、X 1 は G または D である ;
 X 2 は I または G である ;
 (配列番号 2 7 3)

特定の実施態様は、配列番号 1 1 6 の C D R 3 アミノ酸配列を有する抗 G P N M B 抗体 2 . 1 6 . 1 である。

【 0 1 0 0 】

V H 3 - 2 1 由来の抗 G P N M B 抗体 :

特別な実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 V H 3 - 2 1 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する :

【 0 1 0 1 】

【 化 2 2 】

X₁VQLX₂X₃SGGGLVKPGGSLRX₄SCAASGFTFSYSYMNWVRQAPGKGLEWVSX₅ISS
 SSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAR

ここで、X 1 は E または Q である ;
 X 2 は V または E である ;
 X 3 は E または Q である ;
 X 4 は F または L である ;
 X 5 は S または F である ;
 (配列番号 2 7 4)

特定の実施態様において、配列番号 2 7 4 は D 1 - 2 6 に組み合わせられ、さらに J H 4 b と組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらの G P N M B 結合性ヒト抗体、例えば、M a b 2 . 2 1 . 1 は配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 4 5 の塩基配列によりコードされる。

【 0 1 0 2 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖 C D R 1 配列は、配列番号 1 4 8 の生殖細胞系

10

20

30

40

50

V H 3 - 2 1 C D R 1 またはその親和性成熟配列である。

【 0 1 0 3 】

特別な実施態様において、H鎖CDR2配列は、下記式の生殖細胞系VH3-21CDR2またはその親和性成熟配列である：

【 0 1 0 4 】

【 化 2 3 】

CDR2: X₅ISS SSSYIYYADSVKGG

ここで、X₅はSまたはFである；

(配列番号275)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号150のCDR2配列を含む。

【 0 1 0 5 】

特別な実施態様において、H鎖CDR3配列は、D1-26、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【 0 1 0 6 】

【 化 2 4 】

CDR3: X₁X₂VGAT-FDY

ここで、X₁はGまたはDである；

X₂はIまたはWである；

(配列番号276)

特定の実施態様は、配列番号152のCDR3アミノ酸配列を有する抗GPNMB抗体2.21.1である。

【 0 1 0 7 】

VH3-30由来の抗GPNMB抗体：

特別な実施態様において、本発明のGPNMB結合性ヒト抗体は、生殖細胞系V重鎖領域VH3-30を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 1 0 8 】

【 化 2 5 】

QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFL₁FS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA
VISYDGX₂NKYIYADSVKGG RFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK

ここで、X₁はTまたはAである；

X₂はSまたはNである；

(配列番号277)

特定の実施態様において、配列番号277がD3-10に組み合わせられ、さらにJH6bと組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらのGPNMB結合性ヒト抗体、例えば、Mab2.10.2は配列番号74のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号73の塩基配列によりコードされる。

【 0 1 0 9 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖CDR1配列は、下記のアミノ酸配列を有する生殖細胞系VH3-30CDR1またはその親和性成熟配列である：

【 0 1 1 0 】

【 化 2 6 】

GFL₁FS SYGMH

ここで、X₁はTまたはAである；

(配列番号278)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号76のCDR1配列を含む。

【 0 1 1 1 】

特別な実施態様において、H鎖CDR2配列は、下記の生殖細胞系VH3-30CDR2またはその親和性成熟配列である：

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

【化 2 7】

CDR2: VJSYDGX₂NKYYADSVKG

ここで、X 2 は S または N である；

(配列番号 2 7 9)

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 7 8 の C D R 2 配列を含む。

【 0 1 1 3 】

特別な実施態様において、H鎖 C D R 3 配列は、D 3 - 1 0、J H 6 b の組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【 0 1 1 4 】

【化 2 8】

CDR3: X₁X₂X₃VRGX₄X₅X₆

ここで、X 1 は I または D である；

X 2 は T または L である；

X 3 は M または V である；

X 4 は V または I である；

X 5 は I または R である；

X 6 は I または G である；

(配列番号 2 8 0)

特定の実施態様は、配列番号 8 0 の C D R 3 アミノ酸配列を有する抗 G P N M B 抗体 2 . 1 0 . 2 である。

【 0 1 1 5 】

V H 4 - 5 9 由来の抗 G P N M B 抗体：

特別な実施態様において、本発明の G P N M B 結合性ヒト抗体は、生殖細胞系 V 重鎖領域 V H 4 - 5 9 を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【 0 1 1 6 】

【化 2 9】

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GX₁S₁S X₂YYWS WIRQPPGKGLEWIG
YX₃YYSGSTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR

ここで、X 1 は G または D である；

X 2 は S または N である；

X 3 は I または F である；

(配列番号 2 8 1)

特定の実施態様において、配列番号 2 8 1 が D 6 - 1 9 に組み合わせられ、さらに J H 4 b と組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらの G P N M B 結合性ヒト抗体、例えば、M a b 1 . 1 0 . 2 は配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 の塩基配列によりコードされうる。

【 0 1 1 7 】

さらに、特別な実施態様において、H鎖 C D R 1 配列は、下記のアミノ酸配列を有する生殖細胞系 V H 4 - 5 9 C D R 1 またはその親和性成熟配列である：

【 0 1 1 8 】

【化 3 0】

GX₁S₁S X₂YYWS

ここで、X 1 は G または D である；

X 2 は S または N である；

(配列番号 2 8 2)

特定の実施態様において、本発明の抗 G P N M B 抗体は、配列番号 4 の C D R 1 配列を含む。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

特別な実施態様において、H鎖CDR2配列は、下記の生殖細胞系VH4-59CDR2またはその親和性成熟配列である：

【0120】

【化31】

CDR2: YX₃YYSGSTNYPNPSLKS

ここで、X₃はIまたはFである；

(配列番号283)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号6のCDR2アミノ酸配列を含む。

【0121】

特別な実施態様において、H鎖CDR3配列は、D6-19、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【0122】

【化32】

CDR3: X₁X₂GW---DY

ここで、X₁はSまたはDである；

X₂はSまたはRである；

(配列番号284)

特定の実施態様は、配列番号8のCDR3アミノ酸配列を有する抗GPNMB抗体1.10.2である。

【0123】

VH5-51由来の抗GPNMB抗体：

特別な実施態様において、本発明のGPNMB結合性ヒト抗体は、生殖細胞系V重鎖領域VH5-51を含むか、またはそれに由来し、下記のアミノ酸配列を有する：

【0124】

【化33】

QLVQSGA₅EVK₅KPGESLKIS₁CS₁GS₂GYX₂FT₂X₃Y₁W₁I₁G₁W₁VR₁Q₁M₁P₁G₁K₁G₁L₁E₁W₁M₁G₁
X₄I₄Y₄P₄X₅D₅S₅D₅T₅R₅Y₅S₅P₅S₅F₅Q₅Q₅V₅T₅I₅S₅A₅D₅K₅S₅I₅S₅T₅A₅Y₅L₅Q₅W₅S₅S₅L₅K₅A₅S₅D₅T₅A₅X₆Y₆Y₆C₆A₆R₆

ここで、X₁はKまたはQである；

X₂はSまたはIである；

X₃はSまたはNである；

X₄はIまたはVである；

X₅はGまたはDである；

X₆はMまたはIである；

(配列番号285)

特定の実施態様において、配列番号285がD5-24に組み合わせられ、さらにJH4bと組み合わせられる。特定の実施態様において、親和性成熟後に、これらのGPNMB結合性ヒト抗体、例えば、Ma b 2.24.1は配列番号182のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号181の塩基配列によりコードされうる。

【0125】

さらに、特別な実施態様において、H鎖CDR1配列は、下記のアミノ酸配列を有する生殖細胞系VH5-51CDR1またはその親和性成熟配列である：

【0126】

【化34】

GYX₂FT₂X₃Y₁W₁I₁G₁

ここで、X₂はSまたはIである；

X₃はSまたはNである；

(配列番号286)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号184のCDR1配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

特別な実施態様において、H鎖CDR2配列は、下記の生殖細胞系VH5-51CDR2またはその親和性成熟配列である：

【 0 1 2 8 】

【 化 3 5 】

CDR2: X₄Y₁YPX₂DSDTRYSPSFQG

ここで、X₄はIまたはVである；

X₅はGまたはDである；

(配列番号287)

特定の実施態様において、本発明の抗GPNMB抗体は、配列番号186のCDR2アミノ酸配列を含む。 10

【 0 1 2 9 】

特別な実施態様において、H鎖CDR3配列は、D5-24、JH4bの組合せまたはその親和性成熟配列であり、下記のアミノ酸配列を含む：

【 0 1 3 0 】

【 化 3 6 】

CDR3: X₁WLQX2--FDY

ここで、X₁はRまたはKである；

X₂はLまたはHである；

(配列番号288)

特定の実施態様は、配列番号188のCDR3アミノ酸配列を有する抗GPNMB抗体2.24.1である。 20

【 0 1 3 1 】

本発明の抗体は、GPNMB(配列番号289)のエピトープに、好ましくはGPNMBの成熟配列内で、さらに好ましくはGPNMBの細胞外領域(ECD)内で結合する。

【 0 1 3 2 】

本発明の抗体は、 $10^{-6} \sim 10^{-11}$ の親和性でGPNMBに結合する。好ましくは、 10^{-7} 以上、さらに好ましくは 10^{-8} 以上の親和性で結合する。好ましい実施態様において、ここに記載の抗体は非常に高い親和性(K_d)でGPNMBに結合し、例えば、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、または 10^{-14} M未満、またはこれらいずれかの範囲または値等の、しかし、これらに限定されないK_dでGPNMBに結合することができるヒト抗体である。親和性および/または結合活性の測定は、ここに記載するように、KinExA(登録商標)および/またはBIACORE(登録商標)により測定することができる。特別な実施態様において、本発明の抗体は50~150pMの範囲のK_dでGPNMBに結合する。 30

【 0 1 3 3 】

エピトープマッピングおよび二次構造と三次構造の分析を行なって、開示された抗体およびそれらの抗原との結合体により推定される特定の3D構造を同定することができる(例えば、Epitope Mapping Protocols, ed. Morris, Humana Press, 1996を参照)。そのような方法として、X線結晶構造解析(Biochem. Exp. Biol, 11: 7-13, 1974)および今回開示された抗体の仮想表現のコンピュータモデル(Fletterick et al. (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)が挙げられるが、これらに限定されない。 40

【 0 1 3 4 】

さらに、抗体により認識されるタンパク質免疫原の特定部分を、タンパク質の一部、例えばN末端とC末端ハーフに対する抗体反応性を分析することにより決定してよい。次 50

に、得られる反応性断片は、最小反応性ペプチドが定められるまで免疫原のさらに小さい部分を抗体により継続的に分析することで、さらに細かく調べることができる。もしくは、本発明の抗GPNMB抗体の結合特異性(すなわちエピトープ)を、還元剤の不存在下または存在下のいずれかでGPNMB免疫原をSDS-PAGEに供することにより決定し、イムノプロットングにより分析してよい。エピトープマッピングは、タンパク質-タンパク質相互作用の部位を決定するために用いられるSELDI-SELDIプロテインチップ(登録商標)(LumiCyte)アレイを用いて実施してもよい。GPNMBタンパク質抗原またはその断片は、プロテインチップアレイ表面に共有結合的に固定化した抗体により特異的に捕らえてもよい。結合抗原を、レーザー誘起脱着プロセスにより検出して、直接分析してそれらの質量を決定してよい。

10

【0135】

ここに記載される抗GPNMB抗体により認識されるエピトープは、繊維状ファージ(New England Biolabs)上に示されるランダムペプチド12量体のコンビナトリアルライブラリーにプロテインチップアレイをさらすことにより決定してよい。抗体結合ファージは溶出され、次に増幅され、さらなる結合と増幅サイクルを経て、結合配列に利するプールを濃縮する。3または4ラウンド後に、個々の結合性クローンを、抗原塗布ウエル上で実施されるファージELISAにより結合性についてさらに調べ、陽性クローンの特定のDNA配列決定により特徴付ける。

【0136】

誘導体

さらに、本開示はGPNMBに対して特異的な抗体を得るための方法を提供する。そのような抗体中のCDRは、表1に同定されたHおよびL可変領域の特定の配列に限定されず、GPNMBに特異的に結合する能力を保持する配列の改変体を含んでよい。そのような改変体は、表1に示される配列から、当業者によって当分野でよく知られた技術を用いて得てよい。例えば、アミノ酸置換、欠失または付加をFRおよび/またはCDRに対して行なうことができる。FRの変更は通常抗体の安定性と免疫原性を向上させるように設計するが、CDRの変更は典型的には抗体の、その標的に対する親和性を高めるように設計する。FRの改変体は、天然の免疫グロブリンアロタイプも含む。そのような親和性を高める変更は、CDRの変更と抗体のその標的に対する親和性の試験を伴う日常的な技術により実験的に決定してよい。例えば、保存アミノ酸置換は開示されたCDRのいずれか1つで行なうことができる。多様な変更は当分野に記載される方法にしたがって行なうことができる(Antibody Engineering, 2^{sup}.nd ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995)。これらのものとして、機能的に等しいアミノ酸配列をコードする異なるコドンで配列内で置換して、「サイレント」変化を作って変化させた塩基配列が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、非極性アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸として、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正電荷(塩基性)アミノ酸として、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負電荷(酸性)アミノ酸として、アスパラギン酸とグルタミン酸が挙げられる。配列内のアミノ酸の置換物は、該アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択してよい(表3を参照)。さらに、ポリペプチド内の天然の残基はアラニンと置換してもよい(Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998; Adv. Biophys. 35:1-24, 1998)。

20

30

40

【0137】

表3.アミノ酸の置換

【0138】

【表 3】

元のアミノ酸残基	可能な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
Leu (L)	ノルロイシン Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala Gly	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

本発明の抗体の誘導体および類似体は、組換えや合成法等の当分野でよく知られた多様な技術により作ることができる (Maniatis (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. sup. nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., and Bodansky et al. (1995) The Practice of Peptide Synthesis, 2. sup. nd ed., Spring Verlag, Berlin, Germany)。

【0139】

好ましいアミノ酸置換は、(1) タンパク質分解に対する感受性を減少させる置換、(2) 酸化に対する感受性を減少させる置換、(3) タンパク質結合体を形成する結合親性を変える置換、(4) 結合親性を変える置換、および(4) そのような類似体の他の物理化学的または機能的性質を付与または修飾する置換である。類似体として、天然のペプチド配列以外の配列の多様な変異タンパク質を挙げるができる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換(好ましくは保存アミノ酸置換)は、天然の配列(好ましくは分子間接触を形成する領域の外側のポリペプチド部分)において行なってよい。保存アミノ酸置換は親配列の構造的特徴を実質的に変えてはならない(例えば、置換アミノ酸は親配列で生じるヘリックスを壊したり、親配列を特性付ける他の種類の二次構造を壊したりする傾向があってはならない)。当分野で認識されたポリペプチドの二次および三次構造の例が当分野で記載されている(例えば、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))。

【0140】

一実施態様において、本発明のH可変領域のアミノ酸配列改変体であるH可変領域を作る方法は、今回開示されたH可変領域のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸を付加、欠失、置換または挿入し、任意に、このように提供されたH可変領域を1つ以上のL可変領域に組合せ、H可変領域またはH可変/L可変の組合せを、GPNMBに対する特異的結合について調べ、任意に、そのような抗原結合領域のGPNMB活性を調節する能力を調べる工程からなる。L可変領域は、表1に示されるものと同様であるか、または実質的に示されるアミノ酸配列を有してよい。

【0141】

ここに開示されるL可変領域の1つ以上の配列変化を1つ以上のH可変領域に組み合わせる類似の方法を用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

本開示のさらなる態様は、GPNMBに特異的に結合する抗原結合断片を調製する方法を提供する。本方法は、(a)置換されるCDR3を含むか、もしくはCDR3をコードする領域を欠くH可変領域をコードする核酸の出発レパートリーを提供し；(b)H可変CDR3に関してここで実質的に示されるアミノ酸配列をコードするドナー核酸に該レパートリーを組み合わせて、H可変領域をコードする核酸の産物レパートリーを提供するようにドナー核酸をレパートリー中のCDR3領域に挿入し；(c)産物レパートリーの核酸を発現し；(d)GPNMBに対して特異的な結合断片を選択し；(e)それをコードする特異的な結合断片または核酸を回収することを含む。

【 0 1 4 3 】

さらに、置換されるCDR3を含むか、またはCDR3をコードする領域を欠くL可変領域をコードする核酸のレパートリーに本発明のL可変CDR3を組み合わせる類似の方法を使用してよい。ドナー核酸は、配列番号2、配列番号20、配列番号38、配列番号56、配列番号74、配列番号92、配列番号110、配列番号128、配列番号146、配列番号164、配列番号182、配列番号200、配列番号218、配列番号236、配列番号253、配列番号256、配列番号260、配列番号265、配列番号270、配列番号274、配列番号277、配列番号281、配列番号285、配列番号11、配列番号29、配列番号47、配列番号65、配列番号83、配列番号101、配列番号119、配列番号137、配列番号155、配列番号173、配列番号191、配列番号209、配列番号227および配列番号245に実質的に示されるアミノ酸配列をコードする核酸から選択してよい。本発明のCDR(例えばCDR3)をコードする配列は、組換えDNA技術、例えば、Marks等(Bio/Technology(1992)10:779-783)に記載された方法を用いて各CDR(例えば、CDR3)を欠く多様な領域のレパートリーに導入してよい。特に、可変領域の5'末端に向けられたか、またはそれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトH可変遺伝子の第3フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと併用して、CDR3を欠くH可変領域のレパートリーを提供することができる。このレパートリーを特定の抗体のCDR3に組み合わせてよい。類似の技術を用いて、CDR3由来の配列を、CDR3を欠くH可変またはL可変領域のレパートリーと組み替えて、この組み替えた完全H可変またはL可変領域を同族のL可変またはH可変領域に組み合わせて本発明のGPNMBに特異的な抗体を作製してよい。次に、このレパートリーは、適当な抗原結合断片が選択できるように、WO92/01047に記載されたようなファージディスプレイシステム等の適当な宿主系で提示してよい。

【 0 1 4 4 】

類似の組み替えまたはコンビナトリアル技術を用いてよい(例えば、Stemmer, Nature(1994)370:389-391)。さらなる実施態様において、1つ以上の選択されたH可変および/またはL可変遺伝子のランダム変異導入法、例えば変異性PCR(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1992)89:3576-3580)を用いて、ここに記載の配列から得られた1つ以上の配列を保有する新規なH可変またはL可変領域を作製してよい。使用してよい別の方法は変異誘発をH可変またはL可変遺伝子のCDRに直接向けることである(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1994)91:3809-3813; J.Mol.Biol.(1996)263:551-567)。同様に、一つ以上か、または3つのすべてのCDRをH可変またはL可変領域のレパートリーにグラフトしてよく、次に、これらの可変領域をGPNMBに対して特異的な抗原結合性断片に関してスクリーニングする。

【 0 1 4 5 】

免疫グロブリン可変領域の部分は、実質的にここに示されるCDRsの少なくとも1つ、および任意に、ここに示される介在性フレームワーク領域を含むだろう。この部分は、FR1とFR4のいずれか、または両方の少なくとも約50%を含んでよく、この50%はFR1のC末端の50%とFR4のN末端の50%である。可変領域の実質的な部分の

10

20

30

40

50

N末端側またはC末端側の終端のさらなる残基は、通常は天然の可変領域部には付随しないものである。例えば、組換えDNA技術による抗体の構築は、クローニングまたは他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによりコードされるNまたはC末端残基の導入をもたらすだろう。他の操作工程は、免疫グロブリン重鎖定常領域、(例えば、ジアボディーの産生における)他の可変領域、または以下にさらに詳しく説明するタンパク質性標識等のさらなるタンパク質配列に可変領域を結合させるリンカーの導入をとまなう。

【0146】

実施例で示される実施態様はH可変領域とL可変領域の「マッチング」ペアを含むが、代わりとなる実施態様はL可変領域かH可変領域のいずれかに由来する単一のCDRのみを含む抗原結合断片を含んでよいことを当業者は理解するだろう。単鎖の特定の結合領域のいずれか1つを使用して、例えばGPNMBに結合することのできる二領域特異的抗原結合断片を形成することのできる相補的領域をスクリーニングすることができる。このスクリーニングは、HまたはL鎖クローンのいずれかを含む個々のコロニー用いて、他の鎖(LまたはL)をコードするクローンの完全ライブラリーに感染させ、得られた二重鎖の特定の結合領域を、記載されるようにファージディスプレイ法にしたがって選択するWO 92/01047に開示されたいわゆる階層二重コンビナトリアル手法を用いるファージディスプレイスクリーニング法により達成してよい。

【0147】

ここに記載の抗GPNMB抗体は、別の機能分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(アルブミン、別の抗体等)、毒素、放射性同位元素、細胞毒性薬または細胞分裂阻害剤に連結することができる。例えば、抗体は化学的架橋により、または組換え法により連結することができる。さらに、抗体は、多様な非タンパク質性タンパク質の1つ、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、またはポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号、米国特許第4,496,689号、米国特許第4,301,144号、米国特許第4,670,417号、米国特許第4,791,192号または米国特許第4,179,337号に示される方法で結合してもよい。抗体は、例えば、それらの循環半減期を長くするために、ポリマーへの共有結合によって化学修飾することができる。それらを付着させる例示的なポリマーと方法は、米国特許第4,766,106号、米国特許第4,179,337号、米国特許第4,495,285号および米国特許第4,609,546号にも示されている。

【0148】

開示された抗体は、天然のパターンとは異なるグリコシル化パターンを有するように変更してもよい。例えば、1つ以上の炭水化物部分を欠失させることができ、および/または1つ以上のグリコシル化部位を本来の抗体に付加できる。今回開示の抗体に対するグリコシル化部位の付加は、当分野で知られているグリコシル化部位コンセンサス配列を含むようにアミノ酸配列を変えることにより達成してよい。抗体上の炭水化物部分の数を多くする別の手段は、抗体のアミノ酸残基に対するグリコシドの化学的または酵素的結合によるものである(WO 87/05330; CRC Crit. Rev. Biochem., 22:259-306, 1981)。抗体からの炭水化物部分の除去は化学的または酵素的に達成してよい(Arch. Biochem. Biophys., 259:52, 1987; Anal. Biochem., 118:131, 1981; Meth. Enzymol., 138:350, 1987)。抗体に検出可能な標識または機能標識を付加してもよい。検出可能な標識として、慣用の化学を用いて抗体に付着してよい¹³¹Iまたは⁹⁹Tc等の放射性標識が挙げられる。検出可能な標識として、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等の酵素標識も挙げられる。検出可能な標識として、特定の同族の検出可能な部分(例えば、標識されたアビジン)に対する結合により検出してよいビオチン等の化学部分がさらに挙げられる。

【0149】

抗体の結合価は、親和性と結合活性、結合部位におけるリテンションタイムに影響を与

10

20

30

40

50

えるように、要求にあった設計をしてよい(例えば、Am H. Pathol, 2002 160:1597-1608; J. Med. Chem. 2002 45:2250-2259; Br. J. Cancer 2002 86:1401-1410; Biomol. Eng. 2001 18:95-108; Int J. Cancer 2002 100:367-374を参照)。

【0150】

多重特異性(二機能性)結合試薬を本発明のGPNMBに特異的な配列に基づいて設計してよい(Biomol. Eng. 2001 18:31-40)。例えば、二特異性または二機能性抗体は、2つの異なる重/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二特異性抗体は、ハイブリドーマの融合やFab'断片の結合等の多様な方法により作ることができる(Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; J. Immunol. 199, 2148:1547-1553)。GPNMBに対する特異性と第2分子に対する第2特異性を構成するそのような二特異性抗体はよく知られた技術を用いて作成することができる(Immunol Methods 1994, 4:72-81; Wright and Harris, supra.; Traunecker et al. 1992 Int. J. Cancer(Suppl.)7:51-52)。このようにして作られた二特異性抗体は、GPNMBを発現する細胞を選択的に死滅させる。

【0151】

CDR配列が、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号67、配列番号69、配列番号71、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号112、配列番号114、配列番号116、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号157、配列番号159、配列番号161、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号175、配列番号177、配列番号179、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号193、配列番号195、配列番号197、配列番号202、配列番号204、配列番号206、配列番号211、配列番号213、配列番号215、配列番号220、配列番号222、配列番号224、配列番号229、配列番号231、配列番号233、配列番号238、配列番号240、配列番号242、配列番号247、配列番号249および配列番号251に示されるものとはごくわずかに異なる抗体、および配列番号254、配列番号257、配列番号261、配列番号266、配列番号271、配列番号278、配列番号282、配列番号286、配列番号255、配列番号258、配列番号262、配列番号267、配列番号272、配列番号275、配列番号279、配列番号283、配列番号287、配列番号259、配列番号263、配列番号264、配列番号268、配列番号269、配列番号273、配列番号276、配列番号280、配列番号284、配列番号288が本発明の範囲に含まれる。典型的には、アミノ酸は、類似の電荷、疎水的または立体化学的特性を有する関連アミノ酸により置換される。そのような置換は当業者の通常の技術内に存在するだろう。CDRとは異なり、FRには、抗体の結合特性に悪影響を与えることなしに、さらに実質的な変化を起こしうる。FRの変化として、抗原接触のため、または結合部位の安定化のために重要な一定のフレームワーク残基の設計、例えば、定常部のクラスまたはサブクラスの変化、Fcレセプター結合等のエフェクター機能を変更しうる特定のアミノ酸残基の変化(米国特許第5,624,821号;米国特許第5,648,260号;Lund et al.(1991)J. Immunol. 147:2657-2662;Morgan et al.(1995)Immunology

86:319-324)、または定常部が由来する種の変更が挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

当業者は、上記の誘導体や改変は網羅的ではないこと、他の多くの改変は本開示の技術を鑑みれば当業者に明らかであることを理解するだろう。

【0153】

核酸、クローニングおよび発現系

さらに、本開示は、開示された抗体をコードする単離された核酸を提供する。核酸はDNAまたはRNAからなり、全体的または部分的に合成または組換えであってよい。ここに示される塩基配列への言及は、その特定された配列を有するDNA分子も包含し、文脈上他の意味に解すべき場合を除いて、UがTに置換されている特定された配列を有するRNA分子も包含する。

10

【0154】

ここに提供される核酸は、ここに開示されたCDR、H可変領域および/またはL可変領域をコードする領域を包含する。

【0155】

また、本開示は、ここに開示されたCDR、H可変領域および/またはL可変領域をコードする少なくとも1つの核酸を含むプラスミド、ベクター、ファージド、転写カセットまたは発現カセットの形態の構築物を提供する。

【0156】

20

さらに、本開示は、上記の1種類以上の構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0157】

CDR(HまたはL可変領域のいずれかに由来するCDR1、CDR2、CDR3)、H可変またはL可変領域をコードする核酸、ならびにコードされた産物を作る方法も提供される。本方法は、コード核酸に由来するコードされた産物を発現することを含む。発現は、核酸を含む組換え宿主細胞を適当な条件下で培養することにより達成されるだろう。発現による産生後、H可変またはL可変領域、または特定の結合メンバーは適当な技術を用いて単離および/または精製し、次に必要に応じて使用してよい。

【0158】

抗原結合断片、H可変および/またはL可変領域およびコード核酸分子およびベクターを、それらの自然環境から、実質的に純粋または均一な形で単離および/または精製してよく、核酸の場合、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の起源の核酸または遺伝子を含まないか、または実質的に含まないものであってよい。

30

【0159】

抗体産生に適当な細胞等の多様な異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングと発現のシステムは当分野でよく知られている(Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999)。手短に言えば、適当な宿主細胞として、細菌、植物細胞、哺乳類の細胞および酵母およびバキュロウイルスが挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当分野で利用可能な哺乳類の細胞系として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、NSOマウスミエローマ細胞およびその他多数が挙げられる。通常細菌宿主は大腸菌である。本発明に適合するタンパク質発現系を用いて、開示された抗体を作ってもよい。適当な発現系としてトランスジェニック動物も挙げられる(Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999)。

40

【0160】

適当なベクターは、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアダニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および必要に応じて他の配列等の適当な制御配列を含むように選択し、構築することができる。ベクターはプラスミドであるか、ウイルス性であり、例えば必要に応じてファージまたはファージミドであってよい(Sambrook

50

et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照)。例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、DNAの細胞への導入と遺伝子発現、およびタンパク質の分析における核酸の操作のために多くの知られた技術や手順が当分野で公知である (Current Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992)。

【0161】

また、本発明は、ここに開示の核酸を含む宿主細胞を提供する。さらなる態様は、そのような核酸を宿主細胞に導入することを含む方法を提供する。その導入は利用可能な技術を用いてよい。真核細胞に関しては、適当な技術として、リン酸カルシウム形質移入、DEAEデキストラン、電気穿孔法、リポソーム媒介形質移入、およびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えば、ワクシニアまたは昆虫細胞に関してはバキュロウイルスを用いた形質導入が挙げられるだろう。細菌細胞に関しては、適当な技術として、塩化カルシウム形質転換、電気穿孔法、およびバクテリオファージを用いた形質移入が挙げられよう。核酸の細胞への導入後に、例えば、宿主細胞を遺伝子発現の条件下で培養することにより核酸からの発現を引き起こすか、核酸を発現させる。

10

【0162】

免疫結合体

別の態様において、本発明の抗体は、別の治療物質または細胞毒性物質を、GPNMBを発現する細胞に送達するターゲティング剤として用いることができる。この方法は、治療物質または細胞毒性物質に結合させた抗GPNMB抗体を、該抗体をGPHNMBに結合させる条件下に投与することを含む。

20

【0163】

抗GPNMB抗体は、細胞毒性化合物等の治療剤に結合体化させて、得られた免疫結合体がGPNMB発現細胞に対して細胞毒性作用または細胞静止作用を及ぼすようにする。抗体に対して結合体化させる特に適当な部分は化学療法剤、プロドラッグ変換酵素、または毒素である。例えば、抗GPNMB抗体は、化学療法剤(下記参照)等の細胞毒性剤または毒素(アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素またはジフテリア毒素)に結合体化させることができる。もしくは、抗GPNMB抗体はプロドラッグ変換酵素に結合体化させてよい。プロドラッグ変換酵素は、抗体またはその誘導体に組換え融合させることができ、または公知の方法を用いてそれに化学結合させることができる。例示的なプロドラッグ変換酵素は、カルボキシペプチダーゼG2、 α -グルクロニダーゼ、ペニシリン-V-アミダーゼ、ペニシリン-G-アミダーゼ、 β -ラクタマーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトロレクターゼおよびカルボキシペプチダーゼAである。

30

【0164】

GPNMBを発現する細胞に対して治療効果を及ぼす物質は、本発明の抗GPNMB抗体に結合体化させる物質として用いることができる。有用な種類の細胞毒性剤として、例えば、抗チューブリン剤、オーリスタチン、DNA副溝バインダー、DNA複製インヒビター、アルキル化剤(例えば、シス-プランチン、モノ(プラチナ)、ビス(プラチナ)および三核プラチナ結合体およびカルボプラチン等のプラチナ結合体)、アントラサイクリン類、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン類、エトポシド類、フッ素化プリミジン類、イオノホア、レキシトロプシン類、ニトロソ尿素類、プラチノール類、予備形成化合物、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン類、放射線増感剤、ステロイド類、タキサン類、トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカアルカロイド類等が挙げられる。

40

【0165】

治療剤は細胞毒性薬であることができる。適当な細胞毒性薬として、例えば、ドラスタチン類(例えば、オーリスタチンE、AFP、MMAF、MMAE)、DNA副溝バイン

50

ダー（例えば、エンジン類およびレキシトロブシン類）、キョオカルマイシン類、タキサン類（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル）、ピューロマイシン類、ピンカルカロイド類、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノ-ドキシソルピシン、リゾキシシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、エキノマイシン、コムプレタスタチン、ネトロブシン、エポチロンAおよびB、エストラムスチン、クリプトフィシン類、セマドチン、メイタンシノイド類、ディスコデルモリド、エレウテロピンおよびミトキサントロンが挙げられる。

【0166】

特定の実施態様において、細胞毒性薬または細胞分裂阻害剤はオーリスタチンE（ドラスタチン-10）またはその誘導体（例えば、オーリスタチンEとケト酸との間で形成されたエステル）である。他の典型的なオーリスタチン誘導体として、AFP、MMARおよびMMAEが挙げられる。オーリスタチンEとその誘導体の合成と構造は米国特許出願第20030083263号、PCT/US03/24209、PCT/US02/13435、米国特許第6,323,315号、米国特許第6,239,104号、米国特許第6,034065号、米国特許第5,780,588号、米国特許第5,665,860号、米国特許第5,663,149号、米国特許第5,635,483号、米国特許第5,599,902号、米国特許第5,554,725号、米国特許第5,530,097号、米国特許第5,521,284号、米国特許第5,504,191号、米国特許第5,410,024号、米国特許第5,138,036号、米国特許第5,076,973号、米国特許第4,986,988号、米国特許第4,978,744号、米国特許第4,879,278号、米国特許第4,816,444号、米国特許第4,486,414号に記載されている。

【0167】

特定の実施態様において、抗GPNMB抗体1.15.1を、細胞内プロテアーゼ感受性バリン-シトルリンペプチドリンカーによりモノメチルオーリスタチンEに結合させた（vcMMAE）。免疫結合体を作る方法は、Doronina S.O. et al., 2003 Nature Biotechnology 21(7):778-794に見ることができる。

【0168】

治療剤をタンパク質、特に抗体に結合させる技術は当分野で知られている（例えば、Arnon et al., 1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985; Hellstrom et al., 1987 in Controlled Drug Delivery, Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987; Thorpe 1985, in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. eds., EDITOR, 1985; Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. eds., Academic Press 1985; and Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58を参照）。

【0169】

本発明の一定の実施態様において、GPNMBを発現する細胞に結合する抗GPNMB抗体は内部移行して該細胞内に蓄積する。それにより、抗GPNMB抗体免疫結合体はGPNMBを発現する細胞に蓄積する。典型的に、抗GPNMB抗体免疫結合体が内部移行する場合、該物質は優先的に活動性がある。もしくは、抗GPNMB免疫結合体は内部移行せず、医薬が細胞膜に結合することによって、GPNMBを発現する細胞を枯渇させ、阻害するのに効果的である。治療剤は、抗体から（例えば、加水分解または切断剤により

10

20

30

40

50

）切断されないのであればその活性を減少させるように結合体化することができる。この場合、該物質は、標的の細胞内環境において切断に感受性があるが、細胞外環境には実質的に感受性のない切断性リンカーによって、抗体またはその誘導体に結合させえるので、該結合体は、GPNMBを発現する細胞により内部移行した場合（例えば、エンドソーム環境内、または例えばpH感受性またはプロテアーゼ感受性の理由でリソソーム環境内または小窩内）、抗体またはその誘導体から切断される。

【0170】

免疫結合体治療剤は原形質膜に比べて荷電（例えば、原形質膜に比べて分極しているか、正味荷電）させることにより、細胞によっていったん内部移行したら原形質膜を通過する該物質の能力をさらに最小化することができる。

10

【0171】

抗GPNMB抗体免疫結合体は、治療剤と抗体との間にリンカー部を含むことができる。リンカーは細胞内条件では切断可能であるので、リンカーの切断は細胞内環境で治療物質を抗体から遊離させる。リンカーは、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼ等の、しかし、これらに限定されない細胞内ペプチターゼまたはプロテアーゼ酵素により切断されるペプチジルリンカーであってよい。ペプチジルリンカーはしばしば少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断剤として、カテプシン類およびDおよびプラスミンを挙げることができ、これら全てが標的細胞内で活性のある医薬の放出をもたらすジペプチド医薬誘導体を加水分解することが知られている（Dubowchik and Walker, 1999 Pharm. Therapeutics 83:67-123を参照）。他のリンカーは例えば米国特許第6,214,345号に記載されている。

20

【0172】

リンカーはpH感受性であり、リソソーム中に見られるような酸性条件下でしばしば加水分解可能である（例えば、米国特許第5,122,368号、米国特許第5,824,805号、米国特許第5,622,929号、Dubowchik and Walker, 1999 Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989 Biol. Chem. 264:14653-14661を参照）。そのようなリンカーは血液中のような中性pH条件下で比較的安定であるが、リソソームのpHであるpH5.5または5.0以下では不安定である。リンカーは還元条件下で切断可能となりうる（例えば、ジスルヒドリンカー）（例えば、Thorpe et al., 1987 Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer, C.W. Vogel ed, Oxford U. Press, 1987; 米国特許第4,880,935号を参照）。リンカーはマロン酸エステルリンカー（Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304）または3'-N-アミド類似体（Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-1312）であってよい。

30

40

【0173】

本発明の予防的および治療的使用

本発明の抗体は、それらの使用方法に応じて、GPNMBのアゴニストかアンタゴニストのいずれかとして作用することができる。抗体は、被験体、特にヒトにおいて、内科的疾患を予防、診断または治療するために用いることができる。本発明の抗体はGPNMBまたはGPNMBを発現する細胞の単離にも使用することができる。さらに、抗体は、疾患の危険性があるか、疾患を受けやすい被験体または異常なGPNMB発現または機能に関連した疾患を有する被験体を治療するために用いることができる。本発明の抗体はその

50

ような被験体においてGPNMBを検出するために用いることができる。

【0174】

本発明は、GPNMBを発現する細胞を標的とし、およびGPNMBの発現または機能を阻害し、および/または細胞過剰増殖性細胞疾患に対する治療的または予防的効果を有する有効量の組成物を投与することを含む、被験体におけるGPNMBの過剰発現に関連する疾患または疾患および/または細胞過剰増殖性疾患、特に癌の治療および/または予防のための方法を提供する。一実施態様において、本発明の方法は、本発明の抗体および細胞過剰増殖性細胞疾患に対する細胞毒性薬を含む免疫結合体を含有する組成物を被験体に投与することを含む。別の実施態様において、本発明の方法は、本発明の裸のIgG1抗体および1種類以上の免疫調節物質を含有する組成物をその必要のある被験体に投与することを含む。さらに別の実施態様において、本発明の方法は、細胞毒性薬に結合体化させた単鎖Fv抗体(抗GPNMB)を含有する組成物、または単鎖抗GPNMB抗体成分および抗CD3抗体成分を有する二重特異性抗体を含有する組成物をその必要のある被験体に投与することを含む。好ましい実施態様において、細胞過剰増殖性細胞疾患は癌である。さらに好ましくは、癌は、メラノーマ、または中枢神経系の癌、例えば、星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫または新生物性髄膜炎である。

10

【0175】

本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性により特徴付けられるか、またはそれに関連した疾患またはその徴候の予防および/または治療のために、被験体、好ましくはヒト被験体に、本発明の1つ以上の抗体および該抗体を含有する組成物を投与することを含む治療を提供する。一実施態様において、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性により特徴付けられるか、またはそれに関連した疾患またはその徴候を予防または治療する方法において、本発明の有効量の1つ以上の抗体をその必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。ある実施態様において、本発明の1つ以上の抗体を含む1つ以上の免疫結合体の有効量を、GPNMBの異常な発現および/または活性により特徴付けられるか、またはそれに関連した疾患またはその徴候を予防または治療するために、それを必要とする被験体に投与する。

20

【0176】

また、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に特徴付けられるか、またはそれに関連した疾患を予防または治療する方法において、本発明の1つ以上の抗体および本発明の抗体以外の1つ以上の療法剤(例えば、1つ以上の予防剤または治療剤)を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。本発明の併用療法剤の予防剤または治療剤は経時的または同時に投与することができる。特定の実施態様において、本発明の併用療法剤は、本発明の1つ以上の抗体の有効量、および該抗体とは異なる作用機構を有する少なくとも1つの他の療法剤(例えば、予防剤または治療剤)の有効量を含む。一定の実施態様において、本発明の併用療法剤は、抗体とともに作用することにより相加効果または相乗効果を有する本発明の1つ以上の抗体の予防効果または治療効果を向上する。一定の実施態様において、本発明の併用療法剤は療法剤(例えば、予防剤または治療剤)に関連した副作用を低減する。

30

【0177】

併用療法剤の予防剤または治療剤は、同一の医薬組成物にて、被験体に、好ましくはヒト被験体に投与することができる。もしくは、併用療法剤の予防剤または治療剤は、別々の医薬組成物にて、被験体に同時に投与することができる。予防剤または治療剤は同一または異なる投与経路により被験体に投与してよい。

40

【0178】

特定の実施態様において、ここに記載の本発明の1つ以上の抗体を含有する医薬組成物は、被験体、好ましくはヒトに投与して、GPNMBの異常な発現および/または活性により特徴付けられるか、またはそれに関連した疾患またはその徴候の予防および/または治療する。本発明にしたがえば、本発明の医薬組成物は、本発明の抗体以外の1つ以上の療法剤(例えば、予防剤または治療剤)を含んでもよい。

50

【0179】

本発明の抗体は、(診断方法または効能マーカーとしての使用において)生物試料中のGPNMBの存在を検出するために用いてもよい。検出されたGPNMBの量はGPNMBの発現レベルに関連させてよく、次にこれを、当分野で公知の方法を用いて、疾患、腫瘍型、全身腫瘍組織量または腫瘍の病期に関連させる(例えば、AAPS Ligand Binding Assay Bioanalytical Focus Group (LBA BFG)の推奨 Pharm Res. 2003 Nov; 20(11): 1885-900を参照)。抗体を用いる検出方法は当分野でよく知られ、例えば、ELISA、放射性免疫測定法、免疫プロット、ウエスタンプロット、IHC、免疫蛍光法、免疫沈降法が挙げられる。抗体は、GPNMBを検出するためにこれらの一種類以上の技術を取り込んだ診断キットにて提供してよい。そのようなキットは、タンパク質の検出を助ける他の成分、詰め込み、使用説明書または他の材料を含んでよい。特定の実施態様において、本発明の抗体は放射性同位元素に結合体化してよく、GPNMBを過剰発現する細胞を検出するために被験体に注射する。

10

【0180】

抗体が診断目的に供される場合、例えば、リガンド基(ビオチン等)または検出可能なマーカー基(蛍光基、放射性同位体または酵素)によってそれら抗体を修飾することは望ましいであろう。必要なら、本発明の抗体は慣用技術を用いて標識してよい。適当な検出可能な標識として、例えば、フルオロフォア、クロモフォア、放射性原子、電子密度の高い試薬、酵素、および特定の結合パートナーを有するリガンドが挙げられる。酵素は典型的にはそれらの活性により検出される。例えば、西洋ワサビパーオキシダーゼは、テトラメチルベンジジン(TMB)を分光光度計で定量可能な青色色素へと変換するその能力により検出することができる。検出のために適当な結合パートナーとして、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、IgGとプロテインA、および当分野で知られている多数のレセプター/リガンド対が挙げられるが、これらに限定されない。他の組合せや可能性は当業者には容易に明らかであり、本発明の範囲内の等価物とみなされる。

20

【0181】

本発明の抗体は、治療学として有効なGPNMBの阻害剤を同定するスクリーニング方法に用いることができる。そのようなスクリーニングアッセイにおいて、第1結合混合物はGPNMBと本発明の抗体を組み合わせることにより形成され、第1結合混合物中の結合量(M_0)を測定する。さらに、第2混合物はGPNMB、抗体およびスクリーニングされる化合物または物質を組み合わせることにより形成され、第2結合混合物中の結合量(M_1)を測定する。試験される化合物は、別の抗GPNMB抗体であってよい。次に、第1結合混合物と第2結合混合物中の結合量は例えば M_1/M_0 比を計算することにより比較する。該化合物または物質は、第1結合混合物に比較して第2結合混合物中の結合の減少が観察される場合、GPNMBに関連する応答を調節できるとみなされる。結合混合物の処方と最適化は当分野の技量の範囲にあり、そのような結合混合物は結合を増強または最適化するために必要な緩衝液と塩を含有してもよく、さらなるコントロールアッセイが本発明のスクリーニングアッセイに含めてよい。GPNMB-抗体の結合を少なくとも約10%(すなわち、 $M_1/M_0 < 0.9$)、好ましくは約30%を超えるだけ低下させることがわかった化合物がこうして同定され、次に、必要であれば、下記に記載のように他のアッセイまたは動物模型で疾患を改善する能力について二次的にスクリーニングしてよい。GPNMBと抗体との結合力は、例えば、当分野でよく知られた技術である酵素結合免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、表面プラズモン共鳴に基づく技術(例えば、Biacore)を用いて測定することができる。

30

40

【0182】

次に、化合物を下記の実施例に記載するようにインピットで調べてよい。

【0183】

投与の量と頻度

GPNMBの異常な発現および/または活性により関連するか、またはそれにより特徴

50

付けられる疾患の予防および/または治療に効果的な本発明の予防薬または治療薬または組成物の量は標準的臨床方法により決定することができる。例えば、癌の治療および/または予防に効果的な組成物の投与量は組成物を動物模型に投与することにより決定できる。さらに、インビトロアッセイを任意に用いて最適な投与量範囲の同定に役立ててよい。予備的な投与量を例えば動物試験に基づいて決定し、ヒト投与のための投与量のスケールリングを当分野で受け入れられたプラクティスにしたがって実施する。毒性と治療効力は細胞培養物または実験動物での標準的な製薬手順により決定することができる。細胞培養アッセイまたは動物研究から得られたデータはヒトに使用される投与量範囲を明確に表すのに用いることができる。1つの動物模型で得られる治療効果のある投与量は、他の動物、例えばヒトに使用するために当分野で知られている変換因子を用いて変換することができる(例えば、Freireich et al. (1966) Cancer Chemother. Reports, 50(4): 219-244を参照)。

10

【0184】

好ましい効果的な用量の選択は、当業者に公知の幾つかの因子の考慮に基づき当業者によって(例えば、臨床試験により)決定することができる。そのような因子として、治療または予防すべき疾患、伴う症状、患者の体重、性別、免疫状態、および投与医薬組成物の精度を反映すると当業者に知られている他の因子が挙げられる。適当な投与計画はそのような因子を考慮することにより、および文献に報告され、例えば、米医薬品便覧(第59版、2005年)に推薦される投与量に従うことにより、当業者によって選択することができる。

20

【0185】

製剤に使用される正確な用量は投与経路および癌の程度にも依存し、実施者の判断および各患者の状況にしたがって決定しなければならない。効果的な用量は、インビトロまたは動物模型試験系から得られる用量反応曲線から外挿により求めてよい。

【0186】

患者に投与される他の癌治療剤については、多様な癌療法剤の典型的な用量が当分野で知られている。本発明が与えられれば、一定の好ましい実施態様は、併用治療計画で、単一薬の投与に推薦される投与量よりも低い投与量の投与を包含するだろう。

【0187】

特定の実施態様において、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患(例えば、癌)の被験体における予防および/または治療のために投与される本発明の抗体または抗体を含有する免疫結合体の投与量は、30 mg / (患者の体重) kg 以下、25 mg / kg 以下、20 mg / kg 以下、15 mg / kg 以下、好ましくは12 mg / kg 以下、11 mg / kg 以下、10 mg / kg 以下、9 mg / kg 以下、8 mg / kg 以下、7 mg / kg 以下、6 mg / kg 以下、5 mg / kg 以下、4 mg / kg 以下、3 mg / kg 以下、2 mg / kg 以下、または1 mg / kg 以下である。別の実施態様において、GPNMBの異常な発現および/または活性により関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患(例えば、癌)の被験体における予防および/または治療のために投与される本発明の抗体または免疫結合体の投与量は、約0.01 mg / kg ~ 約20 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約10 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約8 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約7 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約6 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約5 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 約4 mg / kg、好ましくは、約0.1 mg / kg ~ 約3 mg / kg、約0.2 mg / kg ~ 3 mg / kg、約0.3 mg / kg ~ 約3 mg / kg、約0.4 mg / kg ~ 約3 mg / kg、約0.6 mg / kg ~ 約3 mg / kg、約0.8 mg / kg ~ 約3 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 2 mg / kg、約0.1 mg / kg ~ 1 mg / kgの単位用量である。一定の実施態様において、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患(例えば、癌)の被験体における予防および/または治療のために投与される本発明の抗体または抗体を含有する免疫結合体の投与量は、約0.1 mg / kg、約0.2 mg / kg、約0.4 mg / kg、約0.6 mg / k

30

40

50

g、約0.8mg/kg、約1.1mg/kg、または約1mg/kgの単位用量である。

【0188】

一定の実施態様において、被験体に、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療するために、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の有効量の1つ以上の用量を投与し、ここで該抗体、免疫結合体、組成物または併用療法剤の効果的量の用量は、当分野でよく知られたインビトロおよび/またはインビボアッセイにおいて、PBS等のコントロールと比較して癌性細胞の増殖を、少なくとも約20%~25%、好ましくは、少なくとも25%~30%、少なくとも30%~35%、少なくとも35%~40%、少なくとも40%~45%、少なくとも45%~50%、少なくとも50%~55%、少なくとも55%~60%、少なくとも60%~65%、少なくとも65%~70%、少なくとも70%~75%、少なくとも75%~80%、少なくとも80%~85%、少なくとも85%~90%、少なくとも90%~95%、または少なくとも95%~98%だけ減少および/または阻害する。

10

【0189】

他の実施態様において、被験体に、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療するために、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の効果的量の1つ以上の用量を投与し、ここで効果的量の用量は、本発明の抗体の少なくとも0.1μg/mL、少なくとも0.5μg/mL、少なくとも1μg/mL、少なくとも2μg/mL、少なくとも5μg/mL、少なくとも6μg/mL、少なくとも10μg/mL、少なくとも15μg/mL、少なくとも20μg/mL、少なくとも25μg/mL、少なくとも50μg/mL、少なくとも100μg/mL、少なくとも125μg/mL、少なくとも150μg/mL、少なくとも175μg/mL、少なくとも200μg/mL、少なくとも225μg/mL、少なくとも250μg/mL、少なくとも275μg/mL、少なくとも300μg/mL、少なくとも325μg/mL、少なくとも350μg/mL、少なくとも375μg/mLまたは少なくとも400μg/mLの血清力価を達成する。さらに別の実施態様において、被験体に本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の効果的量の用量を投与して、抗体の少なくとも0.1μg/mL、少なくとも0.5μg/mL、少なくとも1μg/mL、少なくとも2μg/mL、少なくとも5μg/mL、少なくとも6μg/mL、少なくとも10μg/mL、少なくとも15μg/mL、少なくとも20μg/mL、少なくとも25μg/mL、少なくとも50μg/mL、少なくとも100μg/mL、少なくとも125μg/mL、少なくとも150μg/mL、少なくとも175μg/mL、少なくとも200μg/mL、少なくとも225μg/mL、少なくとも250μg/mL、少なくとも275μg/mL、少なくとも300μg/mL、少なくとも325μg/mL、少なくとも350μg/mL、少なくとも375μg/mLまたは少なくとも400μg/mLの血清力価を達成し、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の効果的量の引き続く用量を投与して、少なくとも0.1μg/mL、少なくとも0.5μg/mL、少なくとも1μg/mL、少なくとも2μg/mL、少なくとも5μg/mL、少なくとも6μg/mL、少なくとも10μg/mL、少なくとも15μg/mL、少なくとも20μg/mL、少なくとも25μg/mL、少なくとも50μg/mL、少なくとも100μg/mL、少なくとも125μg/mL、少なくとも150μg/mL、少なくとも175μg/mL、少なくとも200μg/mL、少なくとも225μg/mL、少なくとも250μg/mL、少なくとも275μg/mL、少なくとも300μg/mL、少なくとも325μg/mL、少なくとも350μg/mL、少なくとも375μg/mLまたは少なくとも400μg/mLの血清力価を維持する。これらの実施態様に従えば、被験体に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上の引き続く用量を投与してよい。

20

30

40

【0190】

50

特定の実施態様において、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療する方法において、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の少なくとも0.01mg/kg、少なくとも0.1mg/kg、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも0.4mg/kg、少なくとも0.6mg/kg、少なくとも0.8mg/kg、少なくとも1mg/kgまたは少なくとも1.1mg/kgの単位用量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療する方法において、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の少なくとも0.01mg/kg、少なくとも0.1mg/kg、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも0.4mg/kg、少なくとも0.6mg/kg、少なくとも0.8mg/kg、少なくとも1mg/kgまたは少なくとも1.1mg/kgの単位用量を、7日毎に1回、好ましくは、10日毎に1回、12日毎に1回、14日毎に1回、16日毎に1回、18日毎に1回、3週間毎に1回または1ヵ月毎に1回、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。好ましい実施態様において、本発明の免疫結合体は、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.4mg/kg、約0.6mg/kg、約0.8mg/kg、約1.1mg/kgまたは約1mg/kgの単位用量で、10~20日毎に1回、2~4サイクルで投与される。

【0191】

本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療する方法において、(a)本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の予防効果または治療効果のある量の1つ以上の用量を、それを必要とする被験体に投与し、(b)抗体または複数の抗体の一定数の用量の投与後に該被験体中の投与された抗体または複数の抗体の血漿レベル/濃度をモニターすることを含む方法を提供する。さらに、好ましくは、用量の一定数が、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の予防効果または治療効果のある量の1、2、3、3、4、5、6、7または8用量である。

【0192】

特定の実施態様において、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療する方法において、(a)本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の少なくとも0.1mg/kg(好ましくは、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも0.4mg/kg、少なくとも0.6mg/kg、少なくとも0.8mg/kg、少なくとも1mg/kgまたは少なくとも1.1mg/kg)の用量を、それを必要とする被験体に投与し、(b)被験体中の投与された抗体または複数の抗体の血漿レベルが0.1μg/mL未満、好ましくは0.25μg/mL未満、0.5μg/mL未満、0.75μg/mL未満、または1μg/mL未満であるときに1つ以上の引き続く用量を投与することを含む方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、GPNMBの異常な発現および/または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および/または治療する方法において、(a)本発明の1つ以上の抗体の少なくとも0.1mg/kg(好ましくは、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも0.4mg/kg、少なくとも0.6mg/kg、少なくとも0.8mg/kg、少なくとも1mg/kg、または少なくとも1.1mg/kg)の1つ以上の用量を、それを必要とする被験体に投与し、(b)一定数の用量の投与後に該被験体中の投与された抗体または複数の抗体の血漿レベルをモニターし、(c)被験体中の投与された抗体または複数の抗体の血漿レベルが0.1μg/mL未満、好ましくは0.25μg/mL未満、0.5μg/mL未満、0.75μg/mL未満、または1μg/mL未満であるときに本発明の抗体または複数の抗体の引き続く1つの用量を投与することを含む方法を提供する。好ましくは、用量の一定数が、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体の有効量の1、2、3、3、4、5、6、7または8用量である。

【0193】

G P N M B の異常な発現および / または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および / または治療するためにこれまで使われてきたか、または現在使われている、本発明の抗体または免疫結合体以外の療法剤（例えば、予防剤または治療剤）は、本発明の方法にしたがって、本発明の1つ以上の抗体または免疫結合体と組み合わせて投与して、G P N M B の異常な発現および / または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を治療および / または予防することができる。好ましくは、本発明の療法剤に組み合わせて用いられる予防剤または治療剤の投与量は、G P N M B の異常な発現および / または活性に関連するか、またはそれにより特徴付けられる疾患を予防および / または治療するためにこれまで使われてきたか、または現在使われているものよりも低い。

10

【0194】

多様な実施態様において、療法剤（例えば、予防剤または治療剤）は、5分しないうちに、30分しないうちに、1時間おいて、約1時間おいて、約1時間～約2時間おいて、約2時間～約3時間おいて、約3時間～約4時間おいて、約4時間～約5時間おいて、約5時間～約6時間おいて、約6時間～約7時間おいて、約7時間～約8時間おいて、約8時間～約9時間おいて、約9時間～約10時間おいて、約10時間～約11時間おいて、約11時間～約12時間おいて、約12時間～18時間おいて、18時間～24時間おいて、24時間～36時間おいて、36時間～48時間おいて、48時間～52時間おいて、52時間～60時間おいて、60時間～72時間おいて、72時間～84時間おいて、84時間～96時間おいて、または96時間～120時間おいて投与される。好ましい実施態様において、2つ以上の療法剤が同一の患者診察のうちに投与される。

20

【0195】

一定の実施態様において、本発明の1つ以上の抗体および1つ以上の他の療法剤（例えば、予防剤と治療剤）は循環的に投与する。循環治療は、第1療法剤（例えば、第1の予防剤または治療剤）の一時期の投与とそれに続く第2療法剤（例えば、第2の予防剤または治療剤）の一時期の投与、任意にそれに続く第3療法剤（例えば、予防剤または治療剤）の一時期の投与などを伴い、これらの続いて行なう投与を繰り返し、すなわち、それらの療法剤の1つに対する耐性の発達を低減させるサイクルを行なって、それら療法剤の1つの副作用を避けるか、低減させ、および / またはそれら療法剤の効能を向上させる。

30

【0196】

医薬組成物と投与方法

本開示は、抗G P N M B 抗体を含有する組成物を提供する。そのような組成物は、薬学的用途と患者への投与に適するものだろう。典型的に、組成物は本発明の1つ以上の抗体と薬学的に許容される賦形剤を含有する。「薬学的に許容される賦形剤」との語句は、医薬品投与に適合性のある、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗かび剤、等張剤および吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性のある物質のそのような媒体や薬剤の使用は当分野でよく知られている。組成物は、追加治療機能、付加治療機能または増強治療機能を提供する他の有効化合物を含んでもよい。医薬組成物は、容器、パックまたはディスペンサーに、投与の指示説明書とともに含まれてもよい。

40

【0197】

本発明の医薬組成物は、意図する投与経路に適合性のあるように処方される。この投与を達成する方法は当業者に知られている。この投与は、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下または経皮であってよい。局所または経口投与してよい組成物、または粘膜を透過できる組成物を得ることもできよう。

【0198】

皮内または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、典型的には、注射用水、食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等の滅菌希釈剤；ベンジルアルコールやメチルパラベン類等の抗菌剤；アスコルビン酸や亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸等のキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩等の緩衝剤；および塩化ナトリウム

50

やブドウ糖等の等張調整剤などの1種類以上の成分を含む。pHは、塩酸または水酸化ナトリウム等の酸または塩基で調節することができる。そのような調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または反復投与バイアルに封入してよい。

【0199】

注射に適する医薬組成物として、滅菌水溶液か分散液と滅菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末とが挙げられる。静脈内投与のために適当な担体として、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, N. J.) またはリン酸緩衝食塩水 (PBS) が挙げられる。すべての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易な注射針通過性が存在する程度に流動的でなければならない。製造と保存の条件下で安定でなければならず、細菌や真菌等の微生物の汚染作用から保護されなければならない。微生物の作用の阻止は、多様な抗菌剤や抗かび剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チロメサル等により達成することができる。多くの場合で、等張剤、例えば、糖類；マンニトール、ソルビトール等のポリアルコール、および塩化ナトリウムを組成物中に含ませることは好ましいであろう。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）およびそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒であってよい。適当な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用により、分散液の場合に必要な粒径の維持により、および/または界面活性剤の使用により維持することができる。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含ませることによってもたすことができる。

10

20

【0200】

一般的に、経口組成物は不活性な希釈剤または可食担体を含む。これらはゼラチンカプセルに封入または錠剤へと圧縮される。経口投与のために、抗体は賦形剤と組み合わせられ、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で用いられる。薬学的に適合性のある結合剤、および/またはアジュバント物質が組成物の一部として含ませることができる。これら錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチン等のバインダー；デンプンまたはラクトース等の賦形剤；アルギン酸、Primogel またはコーンスターチ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムやSterotes等の潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤；スクロースやサッカリン等の甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー等の着香料といった成分または類似の性質の化合物のいずれも含むことができる。

30

【0201】

全身投与は経粘膜的または経皮的手段によってもよい。経粘膜または経皮投与のために、浸透すべきバリアに適当な浸透剤が製剤に用いられる。そのような浸透剤は当分野で一般的に知られており、例えば、洗浄剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、例えば、トローチ剤、鼻腔用スプレー、吸入器または座薬を使用することにより達成してよい。例えば、Fc部分を含む抗体の場合、組成物は、（例えば、米国特許第6,030,613号に記載されたFcRnレセプター仲介経路により）腸、口または肺中の粘膜を透過することができるだろう。経皮投与のために、有効化合物を、当分野で一般的に知られているように軟膏剤、軟膏、ゲルまたはクリームに配合してよい。吸入による投与のためには、抗体は、適当な噴霧剤、例えば、二酸化炭素等の気体を含む加圧容器またはディスペンサーまたはネブライザーからのエアゾールスプレーの形で与えてよい。

40

【0202】

一定の実施態様において、今回開示の抗体は、移植片およびマイクロカプセル化デリバリーシステム等の放出制御製剤等、体からの迅速な排出に対して化合物を保護する担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、多無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸等の生分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような製剤の調製方法は当業者に明らかであろう。今回開示の抗体を含有するリポソーム懸濁液も薬学的に許容される担体として用いることができる。これらは、当業者

50

に公知の方法にしたがって、例えば、米国特許第 4, 522, 811号に記載されたように調製することができる。

【0203】

投与の容易性および投与量の均一性のために、経口または非経口の組成物を投与量単位形で処方することは有利であろう。本明細書中で使用される「投与量単位形」との用語は、単位投与量として治療される被験体に適する物理的に分離した単位をいい、各単位は、必要とされる医薬担体と共同して望まれる治療効果を生じるように計算された所定量の有効化合物を含む。

【0204】

本発明の組成物の毒性と治療効能は、例えば LD_{50} (集団の 50% に対して致死的な用量) および ED_{50} (集団の 50% に治療効果のある用量) を決定するために、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的操作により決定することができる。毒性効果と治療効果の用量比は治療係数であり、これは LD_{50} / ED_{50} の比率として表すことができる。

【0205】

本発明で用いられるいずれの組成物に関しても、治療効果のある用量は細胞培養アッセイから初めに推定することができる。適当なバイオアッセイの例として、DNA複製アッセイ、クローン形成アッセイおよび例えば実施例に記載のような他のアッセイが挙げられる。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータはヒトで使用される投与量の範囲を明確に示す際に用いることができる。用量は、 IC_{50} (すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する抗体の濃度) を含む循環血漿濃度範囲を得るように動物モデルで処方してよい。血漿での循環レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定してよい。特定の投与量の効果は、適当なバイオアッセイでモニターすることができる。投与量は、毒性が在るか無しかの血中濃度の範囲内にあることが好ましい。この投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に基づきながら変えてもよい。

【0206】

抗体は、当分野でよく知られた技術を利用して修飾し、免疫毒素とすることができる (Vitetta 1993, Immunol Today 14:252; 米国特許第 5, 194, 594号)。細胞毒性免疫結合体は当分野で知られており、治療剤として用いられてきた。そのような免疫結合体は、例えばメイタンシノイド類 (米国特許第 6, 441, 163号)、チューブリン重合阻害剤であるオーリスタチン (Mohammad et al, 1999 Int. J. Oncol 15(2):367-72; Doronina et al, 2003 Nature Biotechnology 21(7):778-784)、ドラスタチン誘導体 (Ogawa et al, 2001 Toxicol Lett. 121(2):97-106) 21(3)778-784)、Mylotarg (登録商標) (Wyeth Laboratories, Philadelphia, PA); メイタンシノイド類 (DM1)、タキサンまたはメルタンシン (ImmunoGen Inc.) を用いてよい。

【0207】

抗 GPNMB 抗体を利用する免疫放射性医薬品は、当分野でよく知られる技術を利用して調製してよい (Junghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996); 米国特許第 4, 681, 581号、米国特許第 4, 735, 210号、米国特許第 5, 101, 827号、米国特許第 5, 102, 990号 (RE35, 500)、米国特許第 5, 648, 471号および米国特許第 5, 697, 902号)。免疫毒性および放射標識抗体分子のそれぞれが、GPNMB を発現する細胞を選択的に死滅させる。放射標識は当分野で知られており、診断用または治療用の放射性免疫結合体のために用いられてきた。放射標識の例として、放射性同位元素または放射性核種 (例えば、 3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、

10

20

30

40

50

^{177}Lu 、 ^{105}Rh 、レニウム - 186、レニウム - 188、サマリウム - 153、銅 - 64、スカンジウム - 47) が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、放射性免疫結合体による臨床診断に用いられる放射性核種として、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{67}Ga ならびに ^{111}In が挙げられるが、これらに限定されない。抗体は、標的免疫治療に利用できる可能性のために多様な放射性核種で標識されていてもよい (Peirersz et al., 1987 を参照)。これらの放射性核種として、例えば、 ^{188}Re および ^{186}Re ならびに ^{90}Y が挙げられ、それほどではないが、 ^{199}Au や ^{67}Cu . I - (131) (例えば、米国特許第 5,460,785 号を参照) が挙げられる。放射性治療キレートおよびキレート結合体が当分野で知られている (米国特許第 4,831,175 号、米国特許第 5,099,069 号、米国特許第 5,246,692 号、米国特許第 5,286,850 号および米国特許第 5,124,471 号)。

10

【実施例】

【0208】

実施された実験および得られた結果を含む下記実施例は例示の目的のみに提供されるものであって、本発明を限定するものとして理解されるべきではない。

【0209】

(実施例 1：免疫原)

組換えヒト GPNMB (配列番号 289)、特に細胞外領域 (ECD) を、免疫原として使用するために調製した。一般的に、C 末端 V5-HIS タグを有する GPNMB の ECD をコードする cDNA は HEK293 細胞にトランスフェクトして、発現させて、POROS HS 50 (Applied Biosystems, Foster City, CA) による陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製する。試料を 1M の NaCl で pH 5.5 にて溶出した後に、金属アフィニティークロマトグラフィー (ファルマシア金属キレート、5mL) を行なった。試料を 10CV (カラム体積) にわたる 10~500mM のイミダゾールのリニアグラジエントに対して溶出させた。20mM トリス / 50mM NaCl、pH 7.4 (2L x 2) を用いて透析した。次に、試料を 0.22 μm のフィルターでろ過した。

20

【0210】

(実施例 2：免疫化)

完全ヒト抗体を作るために好ましい方法は、ヒト重鎖遺伝子座とカッパ軽鎖遺伝子座の 245kb と 190kb の大きさの生殖細胞系列配置を含むように設計されたマウスの XenoMouse (登録商標) 株を用いる (Green et al., 1994 Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997 Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovits, 1998 J. Exp. Med. 188:483-495; 米国特許第 6,162,963 号、米国特許第 6,150,584 号、米国特許第 6,114,598 号、米国特許第 6,075,181 号および米国特許第 5,939,598 号)。別法であるミニ遺伝子座法では、外因性 Ig 遺伝子座を、Ig 遺伝子座からの断片 (個々の遺伝子) を包含させることにより模倣する。例えば、1つ以上の V_H 遺伝子、1つ以上の D_H 遺伝子、1つ以上の J_H 遺伝子、ミュー一定常領域、および第 2 定常領域 (好ましくはガンマ定常領域) を、動物に挿入される構築物に形成する (Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonherg et al., (1994), Taylor et al., (1994), and Tuailon et al., (1995), Fishwild et al., (1996); 米国特許第 5,545,807 号、米国特許第 5,545,806 号、米国特許第 5,625,825 号、米国特許第 5,625,126 号、米国特許第 5,633,425 号、米国特許第 5,661,016 号、米国特許第 5,770,429 号、米国特許第 5,789,650 号、米国特許第 5,814,318 号、米国特許第 5,877,

30

40

50

397号、米国特許第5,874,299号、米国特許第6,255,458号、米国特許第5,591,669号、米国特許第6,023,010号、米国特許第5,612,205号、米国特許第5,721,367号、米国特許第5,789,215号、米国特許第5,643,763号、米国特許第5,981,175号)。XenoMouse (登録商標)は、ラムダV領域を利用して抗GPNMB抗体を作るために用いてよいことがわかっている。そのような抗体は本発明の範囲にある。

【0211】

免疫化

(実施例1で調製された)GPNMB-V5His免疫原を抗原として用いた。GPNMBに対するモノクローナル抗体はXenoMouse (登録商標)マウス(XenoMouse (登録商標)XMG2株)、Abgenix社、フレモント、カリフォルニア州を連続的に免疫化することにより発達させた。XenoMouse (登録商標)動物は、すべての注射について足蹠経路によって免疫を行なった。各注射の全体積は1マウスあたり50 μ lであり、1足蹠あたり25 μ lであった。

10

【0212】

同齡集団1(10 \times MG2マウス)に対する最初の免疫化は、1マウスあたり100 μ gのalumゲル(「Adju-Phos」:リン酸アルミニウムゲルアジュバント、Superfos BIOSECTOR(商標)as、E.M. Sergeant Pulp and Chemical社(Clifton, NJ, cat.#1452-250)により配布)と1:1(v/v)で混合させた10 μ gのGPNMB-V5Hisを用いた。それに続く5回の追加免疫はパイロジェンフリーD-PBS中の100 μ gのalumゲルと1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisを用いて行なった。7回目の追加免疫物は、TITERMAX GOLD(登録商標)(Sigma; cat.#T2684)と1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisからなった。8回目の注射液は、100 μ gのalumゲルと1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisからなった。最終的な追加免疫は、パイロジェンフリーDPBS中の5 μ gのGPNMB-V5Hisを用いてアジュバントなしで行なった。XenoMouse (登録商標)マウスはこのプロトコールのために0日目、3日目、6日目、10日目、14日目、17日目、23日目および27日目に免疫化し、融合を31日目に実施した。6回目の追加免疫後の21日目にRetro-Orbital B

20

30

【0213】

同齡集団2(10 \times MG2マウス)に対する最初の免疫化は、1マウスあたり100 μ gのalumゲルと1:1(v/v)で混合させた10 μ gのGPNMB-V5Hisを用いた。それに続く2回の追加免疫は、パイロジェンフリーD-PBS中の100 μ gのalumゲルと1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisを用いて行なった。4回目の追加免疫物は、TITERMAX GOLD(登録商標)(Sigma; cat.#T2684)と1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisからなった。それに続く5回目~7回目の注射液は、100 μ gのalumゲルと1:1(v/v)で混合した5 μ gのGPNMB-V5Hisからなった。8回目の注射と最終的な追加免疫は、パイロジェンフリーDPBS中の5 μ gのGPNMB-V5Hisを用いてアジュバントなしで行なった。XenoMouse (登録商標)マウスはこのプロトコールのために0日目、3日目、7日目、11日目、14日目、17日目、22日目、25日目および74日目に免疫化し、融合を78日目に実施した。6回目の追加免疫後の21日目にRetro-Orbital B

40

【0214】

足蹠注射は、両後足の腹側表面のみを用いて下記プロトコールにより実施した。取り付けた28または30ゲージ \times 1/2"注射針を有するインシュリン1/2mL注射器を用いて筋肉組織を突き刺すことなしに皮膚下に溶液を注射した。注射を受けるマウスは、その首と背中に沿った柔らかい毛をつかんで固定し、反転させて、腹部側にアクセスできる

50

ようにした。マウスの後足をつかんで、注射針を足首に（斜面側面を上にして）挿入し、注射針の先が足に達するまで皮膚の真下を通した。注射針を、足の内側に向かって位置する静脈をさけるために注意して後足の外側長さに沿って挿入した。針の先が足にいったん達したら、抵抗が感じられるまでか、または示された体積が投与されるまでその溶液をゆっくりと注入した。次に、注射針を引き抜き、2番目の後足に同様に注入した。

【0215】

下記の表4はマウスの2集団に関する免疫化スケジュールを提供する。

【0216】

表4：GPNMB抗原（GPNMB可溶性、0.43mg/mL）の免疫化スケジュール

【0217】

【表4-1】

標的	グループNo.	免疫方法		マウスの数	抗原	1回目の注射	2回目の追加免疫
GPNMB	1	足蹠		10	GPNMB-可溶性	10ug/マウス Alum ゲル 0日目	5ug/マウス Alum ゲル 3日目

3回目の追加免疫	4回目の追加免疫	5回目の追加免疫	6回目の追加免疫	失血	7回目の追加免疫	8回目の追加免疫	融合
5ug/マウス Alum ゲル 6日目	5ug/マウス Alum ゲル 10日目	5ug/マウス Alum ゲル 14日目	5ug/マウス Alum ゲル 17日目	21日目	5ug/マウス Titermax Gold 23日目	10ug/マウス D-PBS 27日目	31日目

【0218】

【表4-2】

標的	グループNo.	免疫方法		マウスの数	抗原	1回目の注射	2回目の追加免疫
GPNMB	2	足蹠		10	GPNMB-可溶性	10ug/マウス Alum ゲル 0日目	5ug/マウス Alum ゲル 3日目

3回目の追加免疫	4回目の追加免疫	5回目の追加免疫	6回目の追加免疫	失血	7回目の追加免疫	8回目の追加免疫	9回目の追加免疫	融合
5ug/マウス Alum ゲル 7日目	5ug/マウス Titermax Gold 11日目	5ug/マウス Alum ゲル 14日目	5ug/マウス Alum ゲル 17日目	21日目	5ug/マウス Alum ゲル 22日目	10ug/マウス D-PBS 25日目	10ug/マウス D-PBS 100日目	104日目

力価による収集のための動物の選択

免疫化 Xenomouse（登録商標）マウスからの血清中の抗GPNMB抗体力価はELISAにより決定した。簡単に説明すれば、3セットのELISAを設定した。1μg/mLのGPNMB(+NMB)、1μg/mLのGPNMB(-NMB)および1μg/mLのNMBを、抗原コーティング緩衝液（0.1M炭酸緩衝液、pH9.6、NaHCO₃（分子量84）8.4g/L）中、Costar Labcoatユニバーサルバインディングポリスチレン96ウエルプレート（Corning、Acton、MA）に一晩、4でコーティングした。翌日、プレートを、Biotekプレート洗浄器を用いて洗浄緩衝液（1×PBS中、0.05% Tween20）で3回洗浄した。次に、プレートを200μl/ウエルのブロッキング緩衝液（1×PBS中、0.5% BSA、0.1% Tween20、0.01% チメロサル）でブロックし、室温で1時間インキュベートした。一時間のブロッキング後、プレートを、Biotekプレート洗浄器を用い

10

20

30

40

50

て洗浄緩衝液で3回洗浄した。GPNMBで免疫したXenomouse（登録商標）マウスまたは未処置Xenomouse（登録商標）動物を、0.5%BSA/PBS緩衝液中で、1:100の最初の希釈物からデュプリケートで1:3希釈にて滴定した。最後のウエルをブランクとして残した。これらのプレート室温で2時間インキュベートし、次にプレートを、Biotekプレート洗浄器を用いて洗浄緩衝液で3回洗浄した。ヤギ抗ヒトIgG Fcに特異的な西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP、Pierce、Rockford、IL）結合体化抗体を1µg/mLの最終濃度で加え、1時間室温でインキュベートした。プレートを、Biotekプレート洗浄器を用いて洗浄緩衝液で3回洗浄した。洗浄後、TMB発色基質（BioFxBSTP-0100-01）を加えることにより、10~20分間または陰性コントロールウエルが色を示し始めるまでプレートを展開した。次に、ストック溶液（1ボトルあたり100mLのH₂Oで再構成したTMB用650nMのストック試薬（BioFxBSTP-0100-01））を加えることによりELISAを停止した。各Xenomouse（登録商標）動物の特定の力価を650nmでの光学密度から決定し、下記の表2と表3に示す。力価の値は、バックグラウンドの2倍のODの読みを有する血清の最大希釈の逆数である。したがって、数値が高ければ高いほど、GPNMBに対する液性免疫反応が高かった。結果を表5に示す。

10

【0219】

表5：XENOMOUSE（登録商標）抗GPNMB血清力価

【0220】

【表5】

グループ1マウス、6注射後の21日目の融合			
マウスID	GP NMBに対する反応性	PG NMBに対する反応性 (+GP NMB)	GP NMBに対する反 応性
	h I g Gによる力価	h I g Gによる力価	h I g Gによる力価
1-1	20,000	5,000	225
1-2	5,000	800	200
1-3	35,000	7,500	225
1-4	75,000	22,000	225
1-5	8,000	2,000	325
1-6	6,000	800	1800
1-7	22,000	7,500	225
1-8	6,000	2,000	200
1-9	7,000	2,000	75
1-10	22,000	7,500	200
1-NC1	<100	<100	<100
1-NC2	<100	<100	<100
グループ2マウス、6注射後の21日目の融合			
マウスID	GP NMBに対する反応性 (-GP NMB)	PG NMBに対する反応性 (+GP NMB)	GP NMBに対する反 応性
	h I g Gによる力価	h I g Gによる力価	h I g Gによる力価
2-1	100,000	2,600	50
2-2	8,000	2,600	50
2-3	15,000	4,000	50
2-4	7,000	2,200	75
2-5	22,000	6,500	250
2-6	60,000	22,000	60
2-7	19,000	7,000	50
2-8	5,000	1,200	50
2-9	16,000	3,500	110
2-10	12,000	5,000	110
2-NC1	<100	<100	<100
2-NC2	<100	<100	<100

また、UACC-62、SF539、SKMEL5、U87MGおよびLOXIMVI細胞系に対する反応性に関して免疫化動物からのプールされた抗GP NMB血清をFACSにより評価した。プールされた血清を、抗IL13血清(コントロール)および1:10、1:100で希釈された前失血(コントロール)と比較して、1:10、1:100および1:500で調べた。

【0221】

(実施例3:抗体)

ハイブリドーマ細胞系を、慣用の技術を用いて抗GP NMB力価を有することが示された免疫化マウスから作った(Mendez et al, 1997, Nat Genet. 15:146-156を参照)。

【0222】

免疫マウスを頸椎脱臼により屠殺し、各同齡集団からリンパ節を収集し、プールした。リンパ球をDMEM中で粉碎することで解離させて細胞を組織から遊離し、細胞をDMEMに懸濁した。細胞数を数えて、1億個のリンパ球あたり0.9mLのDMEMを細胞ペレットに加えて細胞を穏やかに、しかし完全に再懸濁した。1億個細胞あたり100μLのCD90+磁気ビーズを用いて、細胞を、4で15分間磁気ビーズとともにインキュベートすることにより標識した。10⁸個までの陽性細胞を含む磁気標識細胞懸濁物(ま

たは 2×10^9 個までの全細胞)をLS+カラムにかけ、このカラムをDMEMで洗浄した。全溶出物をCD90陰性フラクション(これら細胞のほとんどはB細胞であると予想される)として集めた。

【0223】

上記の洗浄された濃縮B細胞と、ATCC(cat.#CRL1580)から購入した非分泌性骨髓腫P3X63Ag8.653細胞(Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550)とを1:1の比率で混合することにより融合を行なった。細胞混合物を800gで遠心することにより穏やかにペレット化した。上清を完全に除去した後、細胞を、2~4mLのPronase溶液(CalBiochem, cat.#53702; PBS中0.5mg/mL)で2分間以内で処理した。次に、3~5mLのFBSを加えて酵素活性を停止し、電気細胞融合溶液ECFS(0.3Mスクロース、Sigma、Cat#S7903、0.1mM酢酸マグネシウム、Sigma、Cat#M2545、0.1mM酢酸カルシウム、Sigma、Cat#C4705)を用いて、懸濁液を40mLの全容積に調節した。上清を遠心後に除去し、細胞を40mLのECFSに再懸濁した。この洗浄工程を繰り返して、細胞をECFSに 2×10^6 細胞/mLの濃度に再懸濁した。

10

【0224】

電気細胞融合(ECF)は、融合発生器、モデルECM2001、Genetronic社、サンジエゴ、カリフォルニア州を用いて実施した。使用された融合チャンバーの大きさは2.0mLであり、Abgenix社の最適機器設定を用いてECFを行なった。

20

【0225】

ECF後、細胞懸濁液を無菌条件下で融合チャンバーから注意して取り出して、同じ体積のハイブリドーマ培養培地(DMEM(JRH Biosciences)と15%FBS(Hyclone)を含み、L-グルタミン、pen/strep、OPI(オキサロアセテート、ピルベート、ウシインシュリン)(すべてSigmaより)およびIL-6(Boehringer Mannheim)を補充した滅菌チューブに移した。細胞を、15~30分間、37°Cでインキュベートし、次に400g(1000rpm)で5分間遠心した。細胞を小体積のハイブリドーマ選択培地(0.5xHA(Sigma, cat.#A9666)を補充したハイブリドーマ培養培地)に穏やかに再懸濁し、その体積を、96ウエルプレートあたり合計 5×10^6 B細胞の最終プレティングとウエルあたり200μLに基づいて、より多くのハイブリドーマ選択培地で適切に調整した。細胞を穏やかに混合し、96ウエルプレートに分注し、成長させた。7日目か10日目に、培地の1/2を除去し、細胞にハイブリドーマ選択培地を再供給した。

30

【0226】

培養の14日後、ハイブリドーマの上清をGPNMBに特異的なモノクローナル抗体についてスクリーニングした。一次スクリーニングにおいて、ELISAプレート(Fisher, Cat.No.12-565-136)を、コーティング緩衝液(0.1M炭酸緩衝液、pH9.6、NaHCO₃、8.4g/L)中の50μL/ウエルのGPNMB(1μg/mL)でコートし、次に4°Cで一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液(PBS中0.05%Tween20)で3回洗浄した。200μL/ウエルのブロッキング緩衝液(1xPBS中、0.5%BSA、0.1%Tween20、0.01%チメロサル)を加え、プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。ハイブリドーマ上清および陽性と陰性のコントロールのアリコート(50μL/ウエル)を加え、プレートを室温で2時間インキュベートした。全体にわたって用いた陽性コントロールは、関連するGPNMBで免疫したXenomouse(登録商標)マウスからの血清であり、陰性コントロールはKLHで免疫したXenomouse(登録商標)の関連株からの血清であった。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。100μL/ウエルの検出抗体ヤギ抗huIgGfc-HRP(Caltag, Cat.No.H10507、使用濃度は1;2000希釈であった)を加えて、プレートを室温で1時間インキュ

40

50

ベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。100 μ l / ウェルのTMB (BioFX Lab. Cat. No. TMSK-0100-01) を加え、(陰性コントロールウェルがやっと色を示し始めるまで) プレートを約10分間発達させた。次に、50 μ l / ウェルの停止溶液 (TMB停止溶液 (BioFX Lab. Cat. No. STPR-0100-01)) を加え、プレートを450 nmの波長でELISAプレートリーダーを用いて読んだ。

【0227】

一次スクリーニングに基づく陽性ハイブリドーマ細胞成長ウェルからの古い培養上清を完全に除去し、IL-1b陽性ハイブリドーマ細胞を新鮮なハイブリドーマ培養培地に懸濁し、24ウェルプレートに移した。培養の2日後、これらの上清を二次確認スクリーニングに使える状態となった。二次確認スクリーニングにおいて、一次スクリーニングの陽性物を、上記のようにGPNMB結合体ELISAと、重鎖および軽鎖の両方について完全にヒト組成であることを示すために二次確認ELISA用の二組の検出系(一組がhIgG検出のためであり、一組がヒトIgC α 軽鎖検出(ヤギ抗hIgC α -HRP、Southern Biotechnology, Cat. No. 2060-05)のためである)とでスクリーニングした。二組のELISAの手順は、3種類の異なる検出抗体を別々に用いた以外は上記と同じである。二次確認ELISAアッセイからのすべての陽性ヒット物はIL-1aと交差反応するものを除外するためにELISAにより免疫原に対する結合に関して対抗スクリーニングを行なった。ELISAプレート(Fisher, Cat. No. 12-565-136)を、コーティング緩衝液(0.1M炭酸緩衝液、pH9.6、NaHCO₃、8.4g/L)中1 μ g/mLの関連V5His融合タンパク質で50 μ l / ウェルにてコートし、次に4で一晚インキュベートした。これ以降の手順は上記と同じである。作られた33種類の完全ヒトGPNMB特異的モノクローナル抗体が存在する。

【0228】

ハイブリドーマ上清を、実施例2に記載のようにELISAにより、GPNMBに対する結合に関してスクリーニングした。結果を表6に示す。

表6. ハイブリドーマ抗GPNMB活性

【0229】

【表6-1】

	3 μ g/mL	1 μ g/mL	333 ng/mL	111 ng/mL	37 ng/mL	12.3 ng/mL
	Avg OD	Avg OD	Avg OD	Avg OD	Avg OD	Avg OD
1.2.2	0.763	0.499	0.356	0.199	0.094	0.049
1.7.3	1.003	0.871	0.760	0.451	0.239	0.094
1.15.1	1.159	1.051	0.902	0.701	0.381	0.168
1.16.2	0.036	0.015	0.010	0.008	0.008	0.007
2-3	1.282	1.204	0.963	0.713	0.359	0.179
2-6	1.254	1.295	1.092	0.875	0.443	0.183
2-7	0.827	0.719	0.680	0.494	0.308	0.156
2-8	0.921	0.635	0.229	0.109	0.056	0.028
2-10	1.095	1.066	0.849	0.583	0.272	0.132
2-15	0.601	0.568	0.578	0.395	0.246	0.127
2-16	0.359	0.173	0.068	0.032	0.017	0.011
2-17	0.053	0.019	0.010	0.009	0.008	0.011

【0230】

【表 6 - 2】

2-22	0.714	0.707	0.538	0.355	0.171	0.068
2-24	0.060	0.042	0.028	0.023	0.016	0.017
アイソタイプコントロール	0.009	0.008	0.009	0.009	0.009	0.011
無関係な抗体	0.009	0.008	0.012	0.013		
二次Abコントロール	0.011					
抗V5Abコントロール	3.066					

一定のハイブリドーマ細胞上清(29)を、研究グレードのCM5センサーチップを備えたBiaCore(登録商標)2000バイオセンサーによりGPNMBに対する結合に関して分析した。細胞上清の1:25希釈物を5分間、プロテインA表面上を通した後、該表面を10分間洗浄した。引き続き、GPNMBを90秒間、該表面上に880nMの濃度で注入した後、解離させた。二重参照結合データは、シグナルをコントロールフローセルから引き、抗原注入直前に注入された緩衝液のベースラインドリフトを引くことにより得られた。各mAbに関するGPNMB結合データを、各表面に捕捉されたmAbの量に関して基準化した。基準化されたドリフト補正応答も測定した。センサーグラムを単純1:1動態模型に適合させた。結果を表7に示す。16の細胞上清がGPNMBと有意に結合したmAbを含み、3種類のMabsである15.1、15.2および15.3がGPNMBに対して強い結合を示した。

【0231】

表7

【0232】

【表7】

試料	Kd (nM)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	発現レベル
15.1	52	16524	8.55E-04	中
15.3	59	13417	7.97E-04	中
15.2	61	12635	7.70E-04	高
2.2	96	9257	8.90E-04	中
10.2	118	3955	4.66E-04	低
7.3	121	9648	1.17E-03	中
7.1	122	11842	1.44E-03	中
7.2	141	9356	1.32E-03	高
10.3	147	3626	5.32E-04	低
10.1	209	4235	8.85E-04	低
8.2	242	7555	1.83E-03	中
8.3	264	6551	1.73E-03	低
8.1	329	6830	2.25E-03	中
12.3	407	1549	6.31E-04	中
12.2	435	1280	5.57E-04	中
12.1	630	1587	1.00E-03	低
1.1	>1000	<1500	nd	高
1.2	>1000	<1500	nd	高
1.3	>1000	<1500	nd	中
2.1	>1000	<1500	nd	中
5.1	>1000	<1500	nd	中
5.2	>1000	<1500	nd	中
5.3	>1000	<1500	nd	中
9.1	>1000	<1500	nd	中
9.2	>1000	<1500	nd	低
9.3	>1000	<1500	nd	低
11.1	>1000	<1500	nd	低
11.2	>1000	<1500	nd	低
11.3	>1000	<1500	nd	低

(実施例4:抗体のグループ化(bin n i n g))

ここに記載の一定の抗体は、米国特許出願第20030157730号に記載されているプロトコールにしたがってグループ化した。MxhIgG結合体化ビーズを一次抗体に対する結合のために調製する。必要とされる上清の容量は式： $(n + 10) \times 50 \mu\text{L}$ （式中、 n = プレート上の試料の総数）を用いて計算される。濃度が知られている場合、 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ を用いる。ビーズ貯蔵物を穏やかにボルテックスで攪拌し、次に上清中で、1ウエルあたり各ビーズの2500の濃度まで、または $0.5 \times 10^5 / \text{mL}$ まで希釈し、シェーカーで暗所、室温で一晩、または $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の知られている濃度の場合、2時間インキュベートする。吸引後、 $50 \mu\text{L}$ の各ビーズをフィルタープレートの各ウエルに加え、次に、 $100 \mu\text{L} / \text{ウエル}$ 洗浄緩衝液を加え、吸引することにより一回洗浄した。抗原とコントロールをフィルタープレートに $50 \mu\text{L} / \text{ウエル}$ で加え、次にカバーをかぶせて、暗所で1時間、シェーカー上でインキュベートする。洗浄工程後、未知の二次抗体を、一次抗体に用いられたのと同じ希釈（または知られている場合は同じ濃度）を用いて、 $50 \mu\text{L} / \text{ウエル}$ で加える。次に、プレートを暗所で2時間、シェーカー上、室温でインキュベートした後、洗浄工程に供する。次に、 $1 : 500$ で希釈した $50 \mu\text{L} / \text{ウエル}$ のビオチニル化m x h I g Gを加えて、暗所で1時間、シェーカー上、室温にてインキュベートする。洗浄工程後、 $50 \mu\text{L} / \text{ウエル}$ のストレプトアビジン - P Eを $1 : 1000$ で加え、暗所で15分間、シェーカー上、室温にてインキュベートする。洗浄工程後、各ウエルを $80 \mu\text{L}$ のプロッキング緩衝液に再懸濁し、L u m i n e xを用いて読む。結果は、モノクローナル抗体は異なるグループに属することを示す。異なるグループ（bin）からの抗体による競争結合は類似または隣接するエピトープに対する抗体特異性を支持する。非競争的結合は独自のエピトープに対する抗体特異性を支持する。

10

20

【0233】

6種類の抗GPNMB抗体の結合をさらに調べるために3種類のグループを作った。グループ1はGPNMB抗体（1.2.1）、（1.10.1）および（2.22.1）を含んだ。グループ2はGPNMB抗体（2.3.1）および（1.15.1）を含み、グループ3はGPNMB抗体（2.10.1）を含んだ。グループ化アッセイの結果を下記の表8と表9に示す。

【0234】

表8

【0235】

30

【表8】

	BB	1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.11	1.12	1.13	1.15	xV5
BB	0	16	58	24	6	25	14	9	8	9	7	15	32
1.1	-16	0	57	16	-29	34	9	-35	-9	-7	-24	35	28
1.2	-42	-16	0	-60	-89	-49	-81	-75	-73	-65	-81	-43	45
1.3	-11	-33	8	0	-75	-40	-49	171	-29	-33	-67	-73	-15
1.5	25	35	64	60	0	20	10	24	17	27	12	-8	61
1.7	-1	76	65	20	-8	0	-8	4	4	6	-3	-3	95
1.8	-7	29	45	35	-3	-7	0	4	-1	0	-6	3	52
1.9	-5	18	47	-7	-10	3	4	0	4	5	-5	-1	17
1.11	18	40	60	29	-11	1	15	16	0	8	5	-23	48
1.12	-10	26	43	27	-5	3	-12	-4	-12	0	-9	-13	57
1.13	1	30	40	27	2	9	2	10	11	17	0	-13	59
1.15	-19	91	79	71	15	21	8	12	10	15	13	0	89
xV5	41	134	239	46	5	443	230	-1	70	267	24	535	0
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		IX			
	1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.15		xV5			
				1.13		1.11							
						1.12							

40

表9

【0236】

50

【表 9】

	1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.11	1.12	1.13	1.15	xV5	BB
1.1	0	72	39	-36	49	8	-14	-3	18	-14	35	28	-2
1.2	10	0	-60	-103	-46	-64	-76	-71	-69	-83	-74	44	-46
1.3	-49	-9	0	-111	-88	-76	261	-66	-57	-93	-115	-89	-33
1.5	81	106	77	0	13	28	17	20	40	2	-3	87	19
1.7	94	77	51	-25	0	-9	-3	12	4	-4	-17	96	17
1.8	42	71	74	-24	2	0	-9	1	-1	-12	-5	61	4
1.9	14	74	28	-24	6	4	0	3	5	-13	8	16	-17
1.11	59	66	77	-20	3	-5	13	0	11	-9	-5	92	21
1.12	84	67	61	-36	-12	-8	-6	-4	0	-16	-34	95	12
1.13	74	93	49	-12	22	12	23	21	19	0	20	98	55
1.15	127	90	51	-9	17	12	19	19	21	5	0	125	59
xV5	189	330	22	14	611	376	-17	113	445	44	750	0	100
BB	25	73	65	3	34	23	14	19	22	13	39	44	0
				I	II	III	IV	V	VI	VII		VIII	
		カットオフ=100		1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.9	1.15		xV5	
								1.8					
								1.11					
								1.12					
								1.13					
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		IX
		カットオフ=80		1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.15		xV5
							1.13		1.11				
								1.12					

10

20

(実施例 5 : GPNMB 免疫組織化学 (IHC) 分析)

抗 GPNMB モノクローナル抗体を、冷凍され固定化された組織試料に対する反応性に関して評価した。組織片 (5 μ m) をホルマリンとパラフィンに包埋された組織試料から切り出し、キシレン、および PBS で終わる段階的なエタノール系中でインキュベートすることにより再水和した。内因性のパーオキシダーゼ活性を、メタノール中の過酸化水素の 3 % 溶液でクエンチした。

【 0 2 3 7 】

組織片をブロッキング緩衝液 (5 % BSA (Sigma)、1 % ヤギ血清 (Jackson Immunolabs, West Grove, PA)、PBS 中) で 1 時間ブロックした。一次抗体と二次抗体を、PBS 中の 5 % BSA と 1 % ヤギ血清中で、1 時間 37 で、抗 GPNMB またはコントロール IgG : 二次ビオチニル化ヤギ抗ヒト IgG (Jackson Immunolabs) の約 10 : 1 のモル比で前結合体化した。結合体をヒト血清の 1 : 2000 希釈物でブロックし、再び 1 時間 37 でインキュベートした。組織片を、ブロッキング緩衝液で希釈した抗 GPNMB 抗体またはアイソタイプコントロール抗体結合体とともに 1 時間インキュベートした。切片を、PBS を 3 回変えてそれぞれ 5 ~ 10 分間洗浄し、ストレプトアジピン結合体化西洋ワサビパーオキシダーゼ (Jackson Immunolabs) の 1 : 200 (ブロッキング緩衝液中) 希釈物とともに 30 分間インキュベートし、次に前と同様に洗浄した。抗体は、DAB 試薬 (Vector labs) を用いて検出した。切片をヘマトキシリン (Fisher Scientific) で対比染色し、アルコールとキシレンにより脱水し、パーマウント (Fisher Scientific) でカバースリップした。

30

40

【 0 2 3 8 】

抗 GPNMB Mabs 2.22.1 および 2.22.2 を用いて、正常なヒト組織と腫瘍ヒト組織のマイクロアレイ (IMPATH, Los Angeles, CA) を染色した。陽性染色が、肺癌、卵巣癌、腎臓癌、食道癌および頭頸部癌、扁平上皮癌、黒色腫および正常な皮膚試料に見られた。黒色腫および肺癌は、膜と細胞質に位置する細胞内染色で最も高い染色強度を示した。また、抗 GPNMB Mab 2.10.2 は原発性黒色腫を染色した。

50

【 0 2 3 9 】

黒色腫組織マイクロアレイの抗 G P N M B 抗体染色は、表 1 0 と表 1 1 に示されるように陽染性である高い比率の黒色腫を示した。

【 0 2 4 0 】

表 1 0 : 抗 G P N M B M a b 黒色腫染色強度

【 0 2 4 1 】

【表 1 0】

染色強度 *	#の試料	%
0	10	17
1	1	2
1-2	2	3
1-3	11	19
2	9	15
2-3	17	29
3	9	15
Total	n=59	100

10

0 (無染色) ~ 3 (強い染色) のスケール

20

表 1 1 : 抗 G P N M B M a b 染色頻度

【 0 2 4 2 】

【表 1 1】

腫瘍反応性% *	#試料	%
0-24	18	31
25-49	6	10
50-74	7	12
75-100	28	47
	n=59	100%

30

* ポジティブ染色を示す腫瘍細胞%

抗 G P N M B 抗体は、一般的な腫瘍組織マイクロアレイにおける肺扁平上皮癌 (S C C) の 1 4 試料のうち 1 0 試料を染色し、 S C C に特異的なアレイ中で 6 0 試料のうち 2 4 試料が陽性であった。

【 0 2 4 3 】

(実施例 6 : 黒色腫細胞系に結合する抗 G P N M B 抗体の F A C S 分析)

黒色腫細胞系 U A C C - 6 2 により発現する細胞膜結合性 G P N M B タンパク質に対する抗 G P N M B 抗体の特異性を F A C S 分析によって分析した。 G P N M B 抗原を発現しない腎臓癌細胞系 T K 1 0 を陰性コントロールとして用いた。アイソタイプにマッチする抗体 p K 1 6 . 3 を陰性コントロールして用いた。細胞を、 P B S (C a と M g とを含まない) で 2 回洗浄し、細胞が脱離するまで 3 7 でヴェルセンとともにインキュベートし、カウントし、 1 アッセイチューブあたり 1 0 0 万細胞を分注した。次に、細胞を 2 回洗浄し、氷冷 F A C S 緩衝液 (0 . 0 1 M H E P E S 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 1 % N a N ₃ および 4 % F B S) に再懸濁した。 1 μ g / m L の一次抗体を細胞に加えた。細胞を氷上で 3 0 分間インキュベートし、 2 ~ 3 回洗浄し、 1 m L の氷冷 F A C S 緩衝液に再懸濁した。 R - P E 結合体化ヤギ抗ヒト抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r y) を 1 : 1 0 0 希釈で加え、細胞を氷上で 3 0 分間インキュベートした。 1 m L の氷冷 F A C S 緩衝液により 3 回洗浄した後、細胞を P B S 中の 0 . 5 ~ 1 m L の 1 % ホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーにより分析し

40

50

た。

【 0 2 4 4 】

GeO平均比として示される結果を表12に要約し、TK10細胞ではなく、UACC-62細胞が2.10.2抗体、2.22.1抗体および1.15.1抗体により検出された細胞表面上でCR011タンパク質を高発現することを示す。

【 0 2 4 5 】

表12：抗GPNMB染色の(pK16に比較した)GeO平均比

【 0 2 4 6 】

【表12】

A. 抗体	B. UACC-62細胞	C. TK10細胞
D. CR011.2.10.2	E. 2.60	F. 1.10
G. CR011.2.22.1	H. 4.46	I. 1.10
J. CR011.1.2.2	K. 1.24	L. 0.98
M. CR011.1.15.1	N. 7.89	O. 0.96
P. CR011.2.6.2	Q. 1.90	R. 1.70

10

黒色腫細胞系間での相対的なGTNMB抗原発現を調べるために、Mab1.15.1抗体を用いて、FACS分析による15黒色腫細胞系の一団を調べた。表13に示されるように、80% (12/15)の細胞系がGPNMB抗原発現を示した。細胞系SK-Mel-2が、調べられた細胞系間で最も高いGeO平均比を示した。

【 0 2 4 7 】

表13：黒色腫細胞系の抗GPNMB染色のGeO平均比

【 0 2 4 8 】

【表13】

細胞系	GeO平均比 (アイソタイプに対する)
SK-Mel 2	16.5
M14	16.1
MEWO	14.1
WM-266-4	13.6
HEMNLP	10.2
G361	8
HT144	7.4
UACC-257	7
RPMI-7951	6
SK-Mel 5	5.7
UACC-62	5.5
A2058	4.1
SK-Mel 24	1.9
WM115	1.3
LOXIMVI	1

20

30

(実施例7：リンパ腫と白血病に結合する抗GPNMB MA bのFACS分析)

造血悪性細胞の表面上のGPNMBの相対的な発現を測定するために、多様なリンパ腫と白血病に由来する細胞系を抗GPNMB抗体とともにインキュベートし、FACSにより分析した。リンパ腫と白血病に由来する細胞を氷冷FACS緩衝液で2回洗浄し、アッセイチューブあたり100万細胞を再懸濁した。1µg/mLのMab1.15.1抗体を細胞に加え、細胞を氷上で30分間インキュベートした。次に、細胞を2~3回洗浄し、1mLの氷冷FACS緩衝液に再懸濁した。R-PE結合体化ヤギ抗ヒト抗体を1:100希釈で加え、細胞を氷上で30分間インキュベートした。細胞を1mLの氷冷FACS緩衝液で3回洗浄し、PBS中の0.5~1mLの1%ホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーにより分析した。

40

50

【 0 2 4 9 】

骨髓細胞系とリンパ系に由来する検査細胞系の約半分はGPNMB細胞表面発現を示した(表14)。細胞系U937は、調べられた細胞系中で最大Geo平均比を示した。

【 0 2 5 0 】

表14：リンパ腫および白血病細胞の抗GPNMB染色のGeo平均比

【 0 2 5 1 】

【表14】

細胞系	Geo平均比
U937 (組織球性リンパ腫、単球)	17.3
Jurkat (急性T細胞白血病)	14.7
SR (未分化大T細胞リンパ腫、ALCL)	7.1
KG-1 (急性骨髄性白血病)	6.9
MOLT-4 (急性T細胞リンパ芽球性白血病)	6.2
THP-1 (急性単球性白血病)	6.1
MV4-11 (骨髓単球性白血病)	1.9
AML-193 (急性単球性白血病)	1.8
HUT-78 (T細胞リンパ腫)	1.5
CCRF-CEM (急性T細胞リンパ芽球性白血病)	10.9
Karpas 299 (ALCL)	10.7
SU-DHL-1 (ALCL)	4.8
SU-DHL-4 (B細胞リンパ腫)	1.8
ML-2 (急性骨髄単球性白血病)	2.1
HH (皮膚T細胞白血病)	1
SUP-M2 (ALCL)	4.8
PL-21 (急性骨髄性白血病)	12
DEL (ALCL)	7.9
SIG-M5 (急性単球性白血病)	2.9
K562 (慢性骨髄性白血病)	2.8
KG1a (急性骨髄性白血病)	2.7
HL-60 (急性前骨髄球性白血病)	2.3
WSU-NH2 (B細胞リンパ腫)	1
EOL-1 (急性骨髄性白血病)	1
HUT-102 (T細胞リンパ腫)	1

10

20

(実施例8：IPとウエスタンブロット分析によるGPNMBタンパク質の検出)

細胞を、PBS(CaとMgとを含まない)で2回洗浄し、細胞が脱離するまで37でヴェルセンとともにインキュベートし、カウントし、集め、溶解緩衝液(0.15M NaCl、0.02Mトリス塩酸、10%グリセロール、1%NP-40、0.01M EDTAおよび臍臓抽出物、プロナーゼ、サーモリシン、キモトリプシンおよびパピインを含むプロテアーゼ阻害剤(Roche, Germany))中で、30分間氷上で溶解した。上清を集めて、タンパク濃度をBCAタンパク質アッセイキット(Pierce, USA)により決定した。一次抗体を細胞溶解物に加え、氷上で3時間インキュベートした後、プロテインGアガロース(Amersham, USA)を2時間加えた。免疫沈澱タンパク質を洗浄し、試料緩衝液中で沸騰させ、4~20%ゲルにより分離した。免疫ブロットのために、タンパク質をPVDF膜(Invitrogen, USA)に移し、抗GPNMB抗体(0.5µg/mL)をプローブに用いて調べた後、HRP結合体化ヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratory)の1:4000希釈物で調べた。免疫結合体をECLウエスタンブロット検出試薬(Amersham, USA)により検出した。

30

40

【 0 2 5 2 】

ウエスタンブロット分析は、抗GPNMB抗体がUACC-62、SK-Mel5およびSK-Mel2の各細胞系の細胞溶解物中に発現したGPNMB抗体を免疫沈降することを示した。これらの結果は、FACSにより決定された細胞表面発現と一致する。

【 0 2 5 3 】

(実施例9：抗GPNMB抗体仲介の間接的細胞死滅)

50

GPNMB抗原を発現する細胞系UACC-62および非発現細胞系TK10を平底96ウエル組織培養プレート(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)にウエルあたり3000細胞の密度で塗布した。細胞がおよそ25%の密集度に一度達したら、100ng/ウエルの二次抗体-毒素結合体(ヤギ抗ヒトIgGサボリン; Advanced Targeting Systems、San Diego、USA、HUM-ZAP; cat.#IT-22)を加えた。抗GPNMB MAbs 2.10.2、2.22.1、1.15.1またはアイソタイプコントロールmAb(pK16.3)を各ウエルに10または50ng/mLの最終濃度で加えた。抗EGFRモノクローナル抗体(MS-269-PABX、NeoMarkers、Fremont、CA、USA)を陽性一次抗体コントロールとして用いた。600μMの化学療法剤5-FUを陽性試薬コントロールとして用いた。5日目に、細胞をトリプシン処理し、6ウエル組織培養プレートに移し、37℃でインキュベートした。プレートを毎日調べ、8~10日の間にすべてのプレートをギムザ染色し、コロニーをカウントした。

10

【0254】

処理後のGPNMB陽性UACC-62の生存率を図2に示す。化学療法剤5-FUは完全な死滅を誘導した一方で、単独またはアイソタイプコントロールpK16.3抗体と組み合わせたサボリン毒素結合体二次抗体の添加は両細胞系の細胞成長に対して効果を持たなかった。UACC-62とTK10細胞系の両方がEGFRタンパク質を発現し、EGFR特異的抗体(50ng/mL)および二次抗体毒素結合体の添加はUACC-62とTK10細胞の完全な死滅をもたらした。同一の用量で、3種類のすべてのGPNMB特異的抗体2.10.2、2.22.1および1.15.1はUACC-62細胞の70%を超える死滅を誘導した。抗GPNMB抗体2.10.2と2.22.1はGPNMB陰性TK10細胞において5%未満の細胞死を誘導し、1.15.1は24%未満の細胞死を誘導した。

20

【0255】

(実施例10: オーリスタチン-E(AE)結合体化抗GPNMB抗体による細胞死滅)

UACC-62とTK10細胞を平底96ウエル組織培養皿(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)に塗布した。2日目または細胞がおよそ25%の密集度に達したら、アイソタイプコントロール、EGFR(NeoMarkers MS-269-PABX、Fremont、CA、USA)、2.22.1または2.10.2等の多様な濃度(1~1000ng/mL)の未結合体化およびオーリスタチンE結合体化抗体(Seattle Genetics、Bothell、WA、USA)を細胞に加えた。MAb2.3.1はFACS分析により示されるようにGPNMB発現細胞に結合しないので本研究におけるアイソタイプコントロールのために選択された。EGFレセプターに対して作られたモノクローナル抗体を用いて、AE結合体化抗体が仲介する特異的な死滅を示した。5日目に、細胞をトリプシン処理し、6ウエル組織培養プレートに移し、37℃でインキュベートした。プレートを毎日調べた。8~10日目に、すべてのプレートをギムザ染色し、プレート上のコロニーをカウントした。

30

【0256】

GPNMB陽性UACC-62細胞および陰性TK10細胞における生存率を図4と図5にそれぞれに示す。結果は、未結合体化およびAE結合体化2.6.2免疫結合体がUACC-62細胞とTK10細胞の両方の成長に対して効果を持たなかったことを示す。しかし、UACC-62とTK10の両細胞系が用量依存的にAE-EGFR免疫結合体仲介の細胞死滅を受け、1000ng/mLで細胞死が95%を超えた。同一の用量で、2.22.1-AE免疫結合体と2.10.2-AE免疫結合体は、アイソタイプコントロールに比べてUACC-62細胞のおよそ75%の細胞死を引き起こした。細胞死滅応答は用量依存性であった。GPNMB陰性TK10細胞生存は同じ用量範囲において2.22.1-AE免疫結合体や2.10.2-AE免疫結合体によって影響を受けることはなかった。これらの結果は、抗原発現細胞に対するAE結合体化抗GPNMB抗体の特異

40

50

的な細胞毒性効果を示す。

【0257】

(実施例11: Mab 1.15.1-AE免疫結合体死滅を受けやすい黒色腫細胞)

黒色腫細胞系を平底96ウエル組織培養プレート(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)に塗布した。2日目または細胞がおよそ25%密集度に達するまで、多様な濃度の未結合体化およびオーリスタチンE結合体化1.15.1を細胞に加えた。MAb 2.6.2-AEも、この研究で結合体化アイソタイプコントロールとして用いた。5日目、細胞をトリプシン処理し、6ウエル組織培養皿に移し、37℃でインキュベートした。プレートを毎日調べた。8~10日目、すべてのプレートをギムザ染色し、プレート上のコロニーをカウントした。

10

【0258】

GPNMB陽性と陰性細胞に対する1.15.1-AE仲介死滅のIC50を表15に示す。非結合体化1.15.1およびAE結合体化2.6.2は調べられたすべての黒色腫細胞系の成長に効果を持たなかった。しかし、細胞系SK-Mel 2、WM-266-4、G361、UACC-257、UACC-62、RPMI-7951およびSK-Mel 5は、用量依存的に1.15.1-AEに感受性があった。SK-Mel 2はこの研究において最も低いIC50を示した(表15)。これらの結果は、GPNMBを発現する黒色腫細胞のほとんどに対してAE結合体化1.15.1の特異的かつ細胞毒性効果を示す。

20

【0259】

表15: Geo平均比および黒色腫細胞の1.15.1-AE死滅のIC50値

【0260】

【表15】

黒色腫細胞系	Geo平均比 (アイソタイプに比較して)	1.15.1-AEによるクローン形成アッセイ	
		ng/mL (pM) のIC50	
SK-Mel 2	16.5	111	(750)
M14	16.1	不確定	
MEWO	14.1	不確定	
WM-266-4	13.6	345	(2300)
HEMNLP	10.2	不確定	
G361	8	1053	(6500)
HT144	7.4	不確定	
UACC-257	7	825	(5500)
RPMI-7951	6	972	(6000)
SK-Mel 5	5.7	237	(1600)
UACC-62	5.5	697	(4300)
A2058	4.1	効果なし	
SK-Mel 24	1.9	データなし	
WM115	1.3	データなし	
LOXIMVI	1	効果なし	

30

(実施例12: リンパ腫と白血病細胞系のMab 1.15.1-AE死滅)

40

6ウエル組織培養プレート(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)への被覆前に、リンパ腫と白血病細胞系を、メチルセルロース基本培地(R&D Systems、USA)と混合し、多様な濃度の非結合体化およびオーリスタチンE結合体化1.15.1抗体と混合した。さらに、Mab 2.6.2-AEはGPNMBを発現する細胞に結合しないので、本研究の結合体化アイソタイプコントロールとして含めた。プレートを37℃でインキュベートし、毎日調べた。14~18日目に、プレート上のコロニーをカウントした。

【0261】

抗原を発現する細胞に対する1.15.1-AE誘導細胞死滅のIC50を表16に示す。非結合体1.15.1およびAE結合体化2.6.2免疫複合体はすべての抗原陽性

50

造血細胞系の成長に対して効果を持たなかった。しかし、表16に示されるように、骨髓系またはリンパ球系に由来する細胞系U937、SRおよびTHP-1は、用量依存的に207 ng/mL (1.4 nM) ~ 340 ng/mL (2.4 nM)の範囲のIC₅₀値をもって1.15.1-AE仲介死滅に感受性があった。これらの結果はGPNMB抗原を発現する造血悪性細胞系の特異的細胞毒性効果を示す。

【0262】

表16: Geo平均比および黒色腫および白血病細胞の1.15.1-AE死滅のIC₅₀値

【0263】

【表16】

細胞系	Geo平均比	1.15.1-AEによるクローン形成アッセイ	
		ng/mL (pM) のIC ₅₀	
U937 (組織球性リンパ腫、単球)	17.3	340	(2400)
Jurkat (急性T細胞白血病)	14.7	効果なし (繰り返し)	
SR (未分化大T細胞リンパ腫、ALCL)	7.1	296	(2000)
KG-1 (急性骨髄性白血病)	6.9	無成長	
MOLT-4 (急性T細胞リンパ芽球性白血病)	6.2	効果なし (繰り返し)	
THP-1 (急性単球性白血病)	6.1	207	(1400)
MV4-11 (骨髄単球性白血病)	1.9	ND	
AML-193 (急性単球性白血病)	1.8	ND	
HUT-78 (T細胞リンパ腫)	1.5	ND	
CCRF-CEM (急性T細胞リンパ芽球性白血病)	10.9	無成長	
Karpas 299 (ALCL)	10.7	不確定	
SU-DHL-1 (ALCL)	4.8	無効果	
SU-DHL-4 (B細胞リンパ腫)	1.8	ND	
ML-2 (急性骨髄単球性白血病)	2.1	ND	
HH (皮膚T細胞白血病)	1	ND	
SUP-M2 (ALCL)	4.8	無成長	
PL-21 (急性骨髄性白血病)	12	無効果	
DEL (ALCL)	7.9	無効果	
SIG-M5 (急性単球性白血病)	2.9	ND	
K562 (慢性骨髄性白血病)	2.8	ND	
KG1a (急性骨髄性白血病)	2.7	ND	
HL-60 (急性前骨髄球性白血病)	2.3	ND	
WSU-NH2 (B細胞リンパ腫)	1	ND	
EOL-1 (急性骨髄性白血病)	1	ND	
HUT-102 (T細胞リンパ腫)	1	ND	
* ND: 行わず			

(実施例13: CR011-vcMMAEはヒトSK-MEL-2黒色腫異種移植片の成長を阻害して胸腺欠損マウスに定着した黒色腫腫瘍の完全な退縮を導く(研究N-386))

研究N-386は、胸腺欠損マウスに定着したヒトSK-MEL-2黒色腫異種移植片に対する抗体-医薬結合体CR011-vcMMAEの効力と治療的効果を評価するために実施された。

【0264】

材料と方法:

試験動物: ヒト腫瘍異種移植片のために用いられる5~6週齢の胸腺欠損マウス(CD-1nu/nuメス)はHarlan Laboratories (Indianapolis, IN)から得た。動物は、実験動物保護の評価認定のための国際協会(Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC International))のガイドラインにしたがって特定のパソゲンフリー条件で収容した。試験動物にはペレット状の餌と水を自由に与え、調節換気(暖房・換気および空調)、温度(22±2

10

20

30

40

50

)、相対湿度(55%±15%)および明期(12時間)を有する部屋に保持した。すべての研究は承認された施設の動物保護と使用のプロトコールにより実施した。

【0265】

ヒト黒色腫異種移植片モデル。CR011-MMAE免疫結合体の腫瘍阻害活性は、既報の方法(Geran et al., Cancer Chemother. Rep. 3:1-104(1972))を参照)にしたがって、胸腺欠損マウスを用いた抗腫瘍異種移植モデルで測定した。簡単に説明すると、胸腺欠損マウス腫瘍ドナーから切り取られたヒト黒色腫(60~125mg)の小断片を、外套針を用いて試験動物に皮下移植した。腫瘍が定着したら(10~20日間)、動物を組み合わせる集団にわけ(n=6マウス/グループ)、静脈内注射(尾静脈)による処置を実施した。

10

【0266】

SK-MEL-2ヒト黒色腫(ATCC#HTB-68)は悪性黒色腫を有する60歳の白色系男性の転移部位(大腿の皮膚)に由来し、SK-MEL-5ヒト黒色腫(ATCC#HTB-70)は悪性黒色腫を有する24歳の白色系女性の転移部位(腋窩リンパ節)に由来した(Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst. 59:221-226(1977))を参照)。両細胞系はアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)から得た。

【0267】

処置の効果は副尺付きカリパスを用いて、2直径に沿った繰り返しの腫瘍測定によりモニターする；腫瘍サイズ(単位:mg)は、比重を1.0とみなして、標準式: $(W^2 \times L) / 2$ を用いて計算した。腫瘍サイズと体重は毎週2回評価した。ただし、マウスは毎日調べ、瀕死の動物は、過剰な痛みやストレスの臨床的徴候(すなわち、衰弱、猫背の姿勢、麻痺/不全麻痺、膨張した腹部、潰瘍形成、膿腫、発作および/または出血)が注意されるのであれば人道的に安楽死させた。2,000mgを超える腫瘍を有する動物は研究から外し、人道的に安楽死させた。

20

【0268】

胸腺欠損マウスにおける異種移植の研究は、多様な物質に関する抗腫瘍効果を効果的に示し、次にそれら物質が臨床的な癌に対して活性を有することが示される(Johnson et al., Br J Cancer 84:1424-1431(2001))。

30

【0269】

結果:

SK-MEL-2黒色腫に対するインビボ抗腫瘍効果。GPNMBを発現する細胞に対してCR011-vcMMAEのインビトロでの効力と細胞毒性に基づいて、抗腫瘍効果をインビボで調べた。

【0270】

皮下のヒトSK-MEL-2黒色腫の成長に対する静脈内CR011-vcMMAE処置の効果を図1に示す。SK-MEL-2腫瘍断片を移植し、腫瘍が定着した後(17日目、61mg)、処置を下記の静脈投与により開始した:CR011-vcMMAE(0.625~20mg/kg静脈内、4日毎に合計4処置(すなわち、q4d×4);食塩水とリン酸緩衝食塩水コントロール(静脈内、q4d×4);および2種類の公知の抗腫瘍参照薬剤である硫酸ピンブラスチン(静脈内、1.7mg/kg、q4d×4)およびパクリタキセル(静脈内、24mg/kg、q2d×4)。参照薬剤は以前の研究において決定された最大許容量(MTD)で投与された。

40

【0271】

食塩水またはPBSで処置した動物中の腫瘍は腫瘍質量が2,000mgに達するまで進行的に成長し、この質量に達した時点で動物を研究から外し、人道的に安楽死させた。SK-MEL-2腫瘍は、免疫が低下したホストにおいて高い「接種」率(97%)と低い自発的退縮率(3%)を有する(Dykes et al., Development of human tumor xenograft models for in

50

v i v o e v a l u a t i o n o f n e w a n t i t u m o r d r u g s ,
i n I m m u n o d e f i c i e n t m i c e i n O n c o l o g y , v o
l . 4 2 (F i e b i g H H a n d B e r g e r D P e e d s) p p 1 - 2
2 , C o n t r i b . O n c o l . B a s e l , K a r g e r (1 9 9 2)) 。
【 0 2 7 2 】

ビンブラスチンは非常にわずかで、顕著ではない抗腫瘍効果 (P 0 . 2 0) を生じた
; この腫瘍モデルや他の腫瘍モデル (例えば、S K - M E L - 5) において、ビンブラス
チンは目立つ腫瘍成長の阻害を生じるが、これが有意であるのはごくわずかである。しか
し、パクリタキセルは、処置の開始後のおよそ2週間、有意な腫瘍成長の阻害と腫瘍静止
(すなわち、100%の成長阻害) を示した (P 0 . 0 0 7 7) 。

10

【 0 2 7 3 】

S K - M E L - 2 を有するマウスに対して静脈内投与されたC R 0 1 1 - v c M M A E
の抗腫瘍効果は著しかった。20、10、5または2.5mg/kgで、腫瘍は試験動物
のほとんどで迅速に大きさが小さくなった ; 顕著な治療効果が治療開始の早くも4日後に
注意された (P 0 . 0 1 4) 。完全に退縮した腫瘍は観察期間中 (> 200日) 再成長
することはなかった。

【 0 2 7 4 】

この研究における動物は肉眼的検査で異常な治療効果を示さなかった。週2回の体重測
定では、C R 0 1 1 - v c M M A E による処置の体重または体重増加に対する観察可能な
、または統計的に有意な効果は示されなかった。

20

【 0 2 7 5 】

結論 :

C R 0 1 1 - v c M M A E は、腫瘍成長の阻害として始まるが、すぐに定着ヒト黒色腫
異種移植片の完全な退縮を導く実質的で、用量依存的な再現性のある抗腫瘍効果を生じる
; この退縮は長く続き、成功した治療後の腫瘍の再成長は観察されなかった。

【 0 2 7 6 】

(実施例 1 4 : 抗体とそれらの対応するDNAの配列決定)

ハイブリドーマからのヒトGPNMB mAb由来の重鎖と鎖の転写物の配列は、p
o l y (A ⁺) DNAから生じたPCR生成物の直接の配列決定により得られた。さらに
、PCR生成物は、TAクローニングキット (I n v i t r o g e n) を用いてp C R I
I にクローニングし、P r i s mダイターミネーター配列決定キットおよびA B I 3 7 7
配列決定装置を用いて両鎖の配列を決定した。各PCR反応は、下記表17に示される5
' センスプライマーの混合物を用いた。

30

【 0 2 7 7 】

表 1 7 : 使用されたプライマー

【 0 2 7 8 】

【表 17】

VH	cacc ATG GAC TGG(C) ACC TGG AGG ATC	配列番号 290
VH	cacc ATG GAC TGG ACC TGG AGA(C) ATC	配列番号 291
VH	cacc ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC	配列番号 292
VH	cacc ATG GAC TGG ATT TGG AGG ATC	配列番号 293
VH	cacc ATG GAC ACA CTT TGC TC(A)C AC	配列番号 294
VH	cacc ATG GAA(G) TTG GGG CTG AGC TGG	配列番号 295
VH	cacc ATG GAG TTG(T) GGA CTG AGC TGG	配列番号 296
VH	cacc ATG GAG TTT GGG CTG(I) AGC TGG	配列番号 297
VH	cacc ATG GAA CTG GGG CTC CGC TGG	配列番号 298
VH	cacc ATG GAG TTG GGG CTG TGC TGG	配列番号 299
VH	cacc ATG GAG TTT TGG CTG AGC TGG	配列番号 300
VH	cacc ATG ACG GAG TTT GGG CTG AGC	配列番号 301
VH	cacc ATG AAA(G) CAC CTG TGG TTC TTC	配列番号 302
VH	cacc ATG AAA CAT CTG TGG TTC TTC	配列番号 303
VH	cacc ATG GGG TCA ACC GCC ATC CTC	配列番号 304
VH	cacc ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC	配列番号 305
VK	ATG GGG TCC CAG GTT CAC CTC	配列番号 306
VK	ATG TTG CCA TCA CAA CTC ATT G	配列番号 307

MACVECTOR (登録商標) と GENEWORKS (商標) を用いて、すべての配列は「V BASE 配列ディレクトリ」(Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) との配列比較により分析した。

【0279】

実施例 15 : 抗 GPNMB 抗体の構造分析

表 17 に示された抗体の可変重鎖および可変軽鎖の配列を決定してそれらの DNA とタンパク質配列を決定した。

抗体 - 1.10.2

重鎖可変領域

塩基配列

【0280】

【化 37】

5' AGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATTTCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTC CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATA GGGCTGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 1)

アミノ酸配列

【0281】

【化 38】

5' QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GDSISNYYS WIRQPPGKLEWIG YFYYSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTA VYYCAR DRGWADY WGQGLVTVSSA 3' (配列番号 2)

表 18 : 1.10.2 重鎖 V 部領域

【0282】

【表 18】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	1-25	配列番号 3
CDR1	GDSISNYYS	26-35	配列番号 4
FR2	WIRQPPGKLEWIG	36-49	配列番号 5
CDR2	YFYYSGSTNYNPSLKS	50-65	配列番号 6
FR3	RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTA VYYCAR	66-97	配列番号 7
CDR3	DRGWADY	98-104	配列番号 8
FR4	WGQGLVTVSSA	105-116	配列番号 9

* 配列番号 2 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 2 8 3 】

【 化 3 9 】

5'GAAATTGTTGACGCGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGGCCACCCTCTCCTGCAGAACCCAGTCAGAGTATTAGCAGCAGCTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCA GGTTCACAGGCTCCTCATCTATGGTGCTTCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTATTGTCAGCAGTATGGTAGCTCGATCACCTTCGGCCAAAGGACACGACTGGAGATTAACG A 3' (配列番号 10)

アミノ酸配列

【 0 2 8 4 】

【 化 4 0 】

5'EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RTSQSISSSYLA WYQKPGQVPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QYQSSIT FGQGRLEIKR 3' (配列番号 11)

10

表 19 : 1 . 1 0 . 2 軽鎖 V 部領域

【 0 2 8 5 】

【 表 1 9 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	1-23	配列番号 12
CDR1	RTSQSISSSYLA	24-35	配列番号 13
FR2	WYQKPGQVPRLLIY	36-50	配列番号 14
CDR2	GASSRAT	51-57	配列番号 15
FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	58-89	配列番号 16
CDR3	QYQSSIT	90-97	配列番号 17
FR4	FGQGRLEIKR	98-108	配列番号 18

20

* 配列番号 11 のアミノ酸残基

抗体 - 1 . 1 5 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 2 8 6 】

【 化 4 1 】

5' CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC TCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTAAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCACCACCCAGGGAAGGCCCT GGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACC ATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCG TGTATTACTGTGCCGAGAGGGTATAACTGGAACTACTTTGACTACTGGGCCAGGGAACCTGTGCACCGT CTCCTCAGCC 3' (配列番号 19)

30

アミノ酸配列

【 0 2 8 7 】

【 化 4 2 】

5' QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSGSTYSNPSLKSRTVIS VDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGLVTVSSA 3' (配列番号 20)

表 20 : 1 . 1 5 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 2 8 8 】

【 表 2 0 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS	1-30	配列番号 :21
CDR1	SNYYWS	31-37	配列番号 :22
FR2	WIRHHPGKGLEWIG	38-51	配列番号 :23
CDR2	YIYYSGSTYSNPSLKS	52-67	配列番号 :24
FR3	RVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCAR	68-99	配列番号 :25
CDR3	GYNWNYFDY	100-108	配列番号 :26
FR4	WGQGLVTVSSA	109-120	配列番号 :27

40

* 配列番号 20 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

50

塩基配列

【 0 2 8 9 】

【 化 4 3 】

5' GAAATAGTGTGATGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTGACAACAACCTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAG
TTCACCTCTACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT
GGCCTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGA 3' (配列番号 28)

アミノ酸配列

【 0 2 9 0 】

【 化 4 4 】

5' EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQVSDNNLVWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT
LTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKR 3' (配列番号 29)

10

表 2 1 : 1 . 1 5 . 1 軽鎖 V 部領域

【 表 2 1 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	1-23	配列番号 30
CDR1	RASQVSDNNLV	24-34	配列番号 31
FR2	WYQQKPGQAPRLLIY	35-49	配列番号 32
CDR2	GASTRAT	50-56	配列番号 33
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	57-88	配列番号 34
CDR3	QQYNNWPPWT	89-98	配列番号 35
FR4	FGQGTKVEIKR	99-109	配列番号 36

20

【 0 2 9 1 】

* 配列番号 2 9 のアミノ酸残基

抗体 - 1 . 2 . 2

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 2 9 2 】

【 化 4 5 】

5' ATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAACCCACACAGACCCTCACGCTGACC
TGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCGCTGGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAG
CCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCATCATTATTGGAATGATGATAAGCGCTAC
AGCCCATCTCTGAGGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTC
CTTACAATTACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTATTGTGCACACAGTCAC
TATGATTACGATTGGGGGAGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGCC 3' (配列番号 37)

30

アミノ酸配列

【 0 2 9 3 】

【 化 4 6 】

5' ITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS GFSLSAGGVGVG WIRQPPGKALEWLA LIYWDDKRY
SPSLRS RLTIKDTSKNQVVLTIINMDPVDATYYCAH SHYDYDWGSYFDY WQQTGLVTVSSA 3'
(配列番号 38)

表 2 2 : 1 . 2 . 2 重鎖 V 部領域

【 0 2 9 4 】

【 表 2 2 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	ITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS	1-24	配列番号 39
CDR1	GFSLSAGGVGVG	25-36	配列番号 40
FR2	WIRQPPGKALEWLA	37-50	配列番号 41
CDR2	LIYWDDKRYSPSLRS	51-66	配列番号 42
FR3	RLTIKDTSKNQVVLTIINMDPVDATYYCAH	67-98	配列番号 43
CDR3	SHYDYDWGSYFDY	99-111	配列番号 44
FR4	WQQTGLVTVSSA	112-123	配列番号 45

40

* 配列番号 3 8 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

50

塩基配列

【 0 2 9 5 】

【 化 4 7 】

5' GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGAC
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTTCCTATCGG
GCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCCAGGCACCTGATTTACACTGAAC
ATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTATAGAGTTT
CCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA 3' (配列番号 46)

アミノ酸配列

【 0 2 9 6 】

【 化 4 8 】

5' DIVMTQTPLSLPVTPEPASISC RSSQSLLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIY TLSYRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGVYYC MQRIEFPIT FGQGRLEIKR 3' (配列番号 :47)

10

表 2 3 : 1 . 2 . 2 軽鎖 V 部領域

【 0 2 9 7 】

【 表 2 3 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISC	1-23	配列番号 :48
CDR1	RSSQSLLDSDDGNTYLD	24-40	配列番号 :49
FR2	WYLQKPGQSPQLLIY	41-55	配列番号 :50
CDR2	TLSYRAS	56-62	配列番号 :51
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGVYYC	63-94	配列番号 :52
CDR3	MQRIEFPIT	95-103	配列番号 :53
FR4	FGQGRLEIKR	104-114	配列番号 :54

20

* 配列番号 4 7 のアミノ酸残基

抗体 - 1 . 7 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 2 9 8 】

【 化 4 9 】

5' CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGCTAATTACTACTGGACCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TGCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGG
TATAACTGGAACCTACTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3'
(配列番号 55)

30

アミノ酸配列

【 0 2 9 9 】

【 化 5 0 】

5' QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GGSISSANYWT WIRQHPGKGLEWIG YIYYSGSTY
CNP SLKS RVIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR GYNWNYFDY WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号 56)

表 2 4 : 1 . 7 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 0 0 】

【 表 2 4 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTV	1-25	配列番号 :57
CDR1	GGSISSANYWT	26-37	配列番号 :58
FR2	WIRQHPGKGLEWIG	38-51	配列番号 :59
CDR2	YIYYSGSTYCNPSLKS	52-67	配列番号 :60
FR3	RVIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	68-99	配列番号 :61
CDR3	GYNWNYFDY	100-108	配列番号 :62
FR4	WGQGLVTVSSA	109-120	配列番号 :63

40

* 配列番号 5 6 のアミノ酸残基

50

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 0 1 】

【 化 5 1 】

5' GATATAGTGTGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGTCAGG
GCCAGTCCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGGAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCATCTA
TGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCCAGCAGTATAATAAGTGGCCCTCCGTGGACG
TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCGAACGAACT 3' (配列番号 64)

アミノ酸配列

【 0 3 0 2 】

【 化 5 2 】

5' DIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSNLA WYQERPGQAPRLLIY GASTRAT
GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNKWPPWT FGQGTKVEIER 3'
(配列番号 65)

10

表 2 5 : 1 . 7 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 0 3 】

【 表 2 5 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	1-23	配列番号 66
CDR1	RASQSVSSNLA	24-34	配列番号 67
FR2	WYQERPGQAPRLLIY	35-49	配列番号 68
CDR2	GASTRAT	50-56	配列番号 69
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	57-88	配列番号 70
CDR3	QQYNKWPPWT	89-98	配列番号 71
FR4	FGQGTKVEIER	99-109	配列番号 72

20

* 配列番号 6 5 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 1 0 . 2

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 0 4 】

【 化 5 3 】

5' CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTCCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGC
AAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAATAATAATACTATGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTCCGAGAGATCTAGTGGTT
CGGGGAATTAGGGGGTACTACTACTACTCTCGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 73)

30

アミノ酸配列

【 0 3 0 5 】

【 化 5 4 】

5' QLVESSGGVVQPGRSLRLSCAAS GFAPSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISYDGNKYYAD
SVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DLVVRGIRGYYYYFGMDV WGQGT
VTVSSA 3' (配列番号 74)

40

表 2 6 : 2 . 1 0 . 2 重鎖 V 部領域

【 0 3 0 6 】

【 表 2 6 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	QLVESSGGVVQPGRSLRLSCAAS	1-23	配列番号 :75
CDR1	GFAPSSYGMH	24-33	配列番号 :76
FR2	WVRQAPGKGLEWVA	34-47	配列番号 :77
CDR2	VISYDGNKYYADSVKG	48-64	配列番号 :78
FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	65-96	配列番号 :79
CDR3	DLVVRGIRGYYYYFGMDV	97-114	配列番号 :80
FR4	WGQGT VTVSSA	115-126	配列番号 :81

50

* 配列番号 74 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 0 7 】
【 化 5 5 】

5' GATATTGTCATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACACTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTCTACAACTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACAGACTGGAGATTAAACGA 3' (配列番号 82)

10

アミノ酸配列

【 0 3 0 8 】
【 化 5 6 】

5' DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCSRSSQSLLESNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIY LGSNRAS
GVPDRFSGSGSCTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGLQTPIT FGQGRLEIKR 3' (配列番号 83)

表 27 : 2 . 1 0 . 2 軽鎖 V 部領域

【 0 3 0 9 】
【 表 2 7 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号 :
FR1	DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCS	1-23	配列番号 :84
CDR1	RSSQSLLESNGYNYLD	24-39	配列番号 :85
FR2	WYLQKPGQSPQLLIY	40-54	配列番号 :86
CDR2	LGSNRAS	55-61	配列番号 :87
FR3	GVPDRFSGSGSCTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	62-93	配列番号 :88
CDR3	MQGLQTPIT	94-102	配列番号 :89
FR4	FGQGRLEIKR	103-113	配列番号 :90

20

* 配列番号 83 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 1 5 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 1 0 】
【 化 5 7 】

5' CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATTCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGTTTATGATGGACGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACGGCGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCC
TTTGACTATGGTGACTCCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGCC 3' (配列番号 91)

30

アミノ酸配列

【 0 3 1 1 】
【 化 5 8 】

5' QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSLCAAS GFTFSNYGIH WVRQAPGKGLEWVA VIWFDGRNKYY
ADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDAAVYYCAR DPFYDGSFFDY WQGQTLVTVSSA 3'
(配列番号 92)

40

表 28 : 2 . 1 5 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 1 2 】

【表 28】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	1-25	配列番号 :93
CDR1	GFTFSNYGIH	26-35	配列番号 :94
FR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	配列番号 :95
CDR2	VIWFDGRNKYYADSVKG	50-66	配列番号 :96
FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDAAVYYCAR	67-98	配列番号 :97
CDR3	DPFDYGDSFFDY	99-110	配列番号 :98
FR4	WGQGLVTVSSA	111-122	配列番号 :99

* 配列番号 92 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

10

塩基配列

【0313】

【化59】

5' CTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAAGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTT
 CCTAATCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCACT
 GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTT
 GCAACTTATTACTGTCAAAGTATAACAGTGCCTCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAG
 GTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 100)

アミノ酸配列

【0314】

【化60】

5' LTQSPSSLSASVRDRVTITC RASQDISNYLA WYQKPGKVPNLLIY AASTLQS GVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYC QKYN SAPLT FGGGTKVEIKR 3' (配列番号 101)

20

表 29 : 2 . 15 . 1 軽鎖 V 部領域

【0315】

【表 29】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	LTQSPSSLSASVRDRVTITC	1-20	配列番号 :102
CDR1	RASQDISNYLA	21-31	配列番号 :103
FR2	WYQKPGKVPNLLIY	32-46	配列番号 :104
CDR2	AASTLQ	47-52	配列番号 :105
FR3	GVPSRFSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYC	53-84	配列番号 :106
CDR3	QKYN SAPLT	85-93	配列番号 :107
FR4	FGGGTKVEIKR	94-104	配列番号 :108

30

* 配列番号 101 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 16 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【0316】

【化61】

5' CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTACTACATGACCTGGATCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTTTCATACATTAGTATTAGTGGTAGTATCACACACTAC
 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATTGTCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
 CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTTACTGTGCGAGAGACGGA
 GCAGCAGCTGGTACCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCACGGGACAAAGGTCACCGTCTCT
 TCAGCC 3' (配列番号 109)

40

アミノ酸配列

【0317】

【化62】

5' QVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAAS GFTFSYYMT WIRQAPGKGLEWVS YISISGSITHY
 ADSVKG RFTMSRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR DGAAAGTDAFDI WGHGKVTVSSA 3'
 (配列番号 110)

50

表 30 : 2 . 1 6 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 1 8 】

【 表 3 0 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	1-25	配列番号 111
CDR1	GFTFSDYYMT	26-35	配列番号 112
FR2	WIRQAPGKGLEWVS	36-49	配列番号 113
CDR2	YISISGSITHYADSVKG	50-66	配列番号 114
FR3	RFTMSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	67-98	配列番号 115
CDR3	DGAAAGTDAFDI	99-110	配列番号 116
FR4	WGHTKVTVSSA	111-122	配列番号 117

* 配列番号 110 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 1 9 】

【 化 6 3 】

5' GAGATAGTGTATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTATCTGTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAATGTTAGCAGCAACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTT
TGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGCTCTGGGACAGAGTTCACCTCTCA
CCATCAGCAGCCTACAGTCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTGACAGTATCATTACTGGCCACTTTCGGC
CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA 3' (配列番号 118)

アミノ酸配列

【 0 3 2 0 】

【 化 6 4 】

5' EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSC RASQNVSSNLA WYQQKPGQAPRLIF GASTRAT
GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYHYWPT FPGGTKVDIKR 3' (配列番号 119)

表 31 : 2 . 1 6 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 2 1 】

【 表 3 1 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSC	1-23	配列番号 120
CDR1	RASQNVSSNLA	24-34	配列番号 121
FR2	WYQQKPGQAPRLIF	35-49	配列番号 122
CDR2	GASTRAT	50-56	配列番号 123
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	57-88	配列番号 124
CDR3	QQYHYWPT	89-96	配列番号 125
FR4	FPGGTKVDIKR	97-107	配列番号 126

* 配列番号 119 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 1 7 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 2 2 】

【 化 6 5 】

5' CAGCTGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGATACACCTTACCAGGCTTCTATATGCACTGGGTGCGACAGACCCCTGGA
CAAGGCTTGGATGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACATATTATGTACAG
AAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCATCAGCACAGTCTACATGGAG
CTGAGCAGGTTGAGATCTGACGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGATGGGTATAGC
AGTGGAGAGGACTGGTTCGACCCTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCC 3'
(配列番号 127)

アミノ酸配列

【 0 3 2 3 】

【 化 6 6 】

5' QLVSQGAEVKPKGASVKVSKAS GYFTGFYMH WVRQTPGQGLEWMG WINPNSGGTYVQ
KFQG RVIMTRDTSISTVYVMEISRLRSDDTAVYYCAR DGYSSGEDWFDW WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号 128)

10

20

30

40

50

表 3 2 : 2 . 1 7 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 2 4 】

【 表 3 2 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	1-23	配列番号 129
CDR1	GYTFTGFYMH	24-33	配列番号 130
FR2	WVRQTPGQGLEWMG	34-47	配列番号 131
CDR2	WINPNSGGTYYYVQKFG	48-64	配列番号 132
FR3	RVTMTRDTSISTVYMELSRRLRSDDTAVYYCAR	65-96	配列番号 133
CDR3	DCYSSGEDWFD	97-108	配列番号 134
FR4	WGQGTLLVTVSSA	109-120	配列番号 135

* 配列番号 1 2 8 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 2 5 】

【 化 6 7 】

5' GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTTCACTGAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 136)

アミノ酸配列

【 0 3 2 6 】

【 化 6 8 】

5' DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLHSGGKTYLY WYLQRPQPPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (配列番号 137)

表 3 3 : 2 . 1 7 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 2 7 】

【 表 3 3 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	配列番号 138
CDR1	KSSQSLHSGGKTYLY	24-39	配列番号 139
FR2	WYLQRPQPPQLLIY	40-54	配列番号 140
CDR2	EVSNRFS	55-61	配列番号 141
FR3	GVPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	62-93	配列番号 142
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	配列番号 143
FR4	FGGGTKVEIKR	103-113	配列番号 144

* 配列番号 1 3 7 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 2 1 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 2 8 】

【 化 6 9 】

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGATTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTATTAGTAGTAGTAGTAGTACATATACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAC
TGGGTGGGAGCTACCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCC 3'
(配列番号 145)

アミノ酸配列

【 0 3 2 9 】

10

20

30

40

【化70】

5' QVQLEQSGGGLVVKPGGSLRFSCAAS GFTFSSYSMN WVRQAPGKGLEWVS FISSSSSYIYY
ADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR EDWVGATFDY WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号:146)

表34: 2.21.1 重鎖V部領域

【0330】

【表34】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FRI	QVQLEQSGGGLVVKPGGSLRFSCAAS	1-25	配列番号 147
CDR1	GFTFSSYSMN	26-35	配列番号 148
FR2	WVRQAPGKGLEWVS	36-49	配列番号 149
CDR2	FISSSSSYIYYADSVKG	50-66	配列番号 150
FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	67-98	配列番号 151
CDR3	EDWVGATFDY	99-108	配列番号 152
FR4	WGQGLVTVSSA	109-120	配列番号 153

10

* 配列番号146のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【0331】

【化71】

5' GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCCGGCGAGTCAGGGCATTAGGAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCTTCCGCTTTGAAATTAGGGGTCCCATCT
CGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGTATAACAGTGCCCGATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGACATTAAACGA 3' (配列番号 154)

20

アミノ酸配列

【0332】

【化72】

5' DIQLTQSPSSLSASVGDVRTTIC RASQGIRNYLA WYQQKPGKVPKLLIY AASALKL GVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC QKYNAPIT FGQGTRLDIKR 3' (配列番号 155)

表35: 2.21.1 軽鎖V部領域

【0333】

【表35】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FRI	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTTIC	1-23	配列番号 156
CDR1	RASQGIRNYLA	24-34	配列番号 157
FR2	WYQQKPGKVPKLLIY	35-49	配列番号 158
CDR2	AASALKL	50-56	配列番号 159
FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC	57-88	配列番号 160
CDR3	QKYNAPIT	89-97	配列番号 161
FR4	FGQGTRLDIKR	98-108	配列番号 162

30

* 配列番号155のアミノ酸残基

抗体 - 2.22.1

重鎖可変領域

塩基配列

【0334】

【化73】

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGAACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTATTTCTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAACACCTAC
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTTGACACGCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGAC
TATTACTATGATACTAGTGGTTTTTCTACCGTTACGACTGGTACTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGACACCGTCCCGTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 163)

40

50

アミノ酸配列

【 0 3 3 5 】

【 化 7 4 】

5' QVQLEQSGPGLVKPSQNLSTCTVS GGSISSGGYFWS WIRQHPKGLEWIG YIYYSGNTY
 YNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DYYYDTSGFYSYRYDWYYGMDV
 WGQGTTVTVSSA 3' (配列番号 164)

表 3 6 : 2 . 2 2 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 3 6 】

【 表 3 6 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	QVQLEQSGPGLVKPSQNLSTCTVS	1-25	配列番号 165
CDR1	GGSISSGGYFWS	26-37	配列番号 166
FR2	WIRQHPKGLEWIG	38-51	配列番号 167
CDR2	YIYYSGNTYYNPSLKS	52-67	配列番号 168
FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	68-99	配列番号 169
CDR3	DYYYDTSGFYSYRYDWYYGMDV	100-120	配列番号 170
FR4	WGQGTTVTVSSA	121-132	配列番号 171

10

* 配列番号 1 6 4 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 3 7 】

【 化 7 5 】

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAATGGGGTCCCATCA
 AGGTTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAACATAATACTTACCCGGCGTTCCGGCCAAGGG
 ACCAAGGTGGAAATCAAACGA 3' (配列番号 172)

アミノ酸配列

【 0 3 3 8 】

【 化 7 6 】

5' DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC RASQGIRNDLG WYQKPGKAPKRLIY AASSLQN GVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC LQHNTYPA FGQGTKVEIKR 3' (配列番号 173)

30

表 3 7 : 2 . 2 2 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 3 9 】

【 表 3 7 】

領域	配列	アミノ酸残基 *	配列番号 :
FR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC	1-23	配列番号 174
CDR1	RASQGIRNDLG	24-34	配列番号 175
FR2	WYQKPGKAPKRLIY	35-49	配列番号 176
CDR2	AASSLQN	50-56	配列番号 177
FR3	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	57-88	配列番号 178
CDR3	LQHNTYPA	89-97	配列番号 179
FR4	FGQGTKVEIKR	98-108	配列番号 180

40

* 配列番号 1 7 3 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 2 4 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 4 0 】

【化77】

5' CAGCTGGTG CAGTCTGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
CAGGGTTCTGGATACATCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG
AAAGCCTGGAGTGGATGGGGGTCATCTATCCTGATGACTCTGATACAGATACAGCCCG
TCCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCCGCTACCTGCAG
TGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATATATTAATCTGTGCGAGACAAAAATGGCTA
CAACACCCCTTGTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 181)

アミノ酸配列

【0341】

【化78】

5' QLVQSGAEVKKPGESLKISCQGS GYIFTNYWIG WVRQMPGKGLEWMG VIYPDDSDTRYSP
SFQG QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCAR QKWLQHPFDY WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号:182)

10

表38: 2.24.1 重鎖V部領域

【0342】

【表38】

Table with 4 columns: 領域, 配列, アミノ酸残基*, 配列番号. Rows include FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 with their respective sequences and amino acid ranges.

20

* 配列番号182のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【0343】

【化79】

5' GAAATTGTGTGTGACGCAGTCACCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACC
CTCTCATGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGATACTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACAGTATGGTAGCTCACCTCGGACGTTCCGGC
CAAGGACCAAGGTGGAATCAAACGA 3' (配列番号 190)

30

アミノ酸配列

【0344】

【化80】

5' EIVLTQSPGTLTSLSPGERVTLSC RASQSVSSRYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPRT FGQGTKVEIKR 3' (配列番号 191)

表39: 2.24.1 軽鎖V部領域

【0345】

【表39】

Table with 4 columns: 領域, 配列, アミノ酸残基*, 配列番号. Rows include FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 with their respective sequences and amino acid ranges.

40

* 配列番号191のアミノ酸残基

抗体 - 2.3.1

重鎖可変領域

塩基配列

50

【 0 3 4 6 】

【 化 8 1 】

5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC
TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCCGGCTACTATATGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTT
CAGGACAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCACATGGAGCTGAGCAGGC
TGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGATTTCTTTGGTTCCGGGAGTCTCCTC
TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 199)

アミノ酸配列

【 0 3 4 7 】

【 化 8 2 】

5' QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFDQ
RVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDFFGSGSLLLYFDYWQGTTLVTVSSA 3'
(配列番号 200)

表 4 0 : 2 . 3 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 4 8 】

【 表 4 0 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	1-25	配列番号 201
CDR1	GYTFTGYMH	26-35	配列番号 202
FR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	配列番号 203
CDR2	WINPNSGGTNYAQKFDQ	50-66	配列番号 204
FR3	RVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR	67-98	配列番号 205
CDR3	DDFGSGSLLLYFDY	99-111	配列番号 206
FR4	WGQGTTLVTVSSA	112-123	配列番号 207

* 配列番号 2 0 0 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 4 9 】

【 化 8 3 】

5' GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTCTCTGGAGTCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 208)

アミノ酸配列

【 0 3 5 0 】

【 化 8 4 】

5' DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLHSGGKTYLY WYLQRPQPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (配列番号 209)

表 4 1 : 2 . 3 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 5 1 】

【 表 4 1 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	配列番号 210
CDR1	KSSQSLHSGGKTYLY	24-39	配列番号 211
FR2	WYLQRPQPQLLIY	40-54	配列番号 212
CDR2	EVSNRFS	55-61	配列番号 213
FR3	GVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYC	62-93	配列番号 214
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	配列番号 215
FR4	FGGGTKVEIKR	103-113	配列番号 216

* 配列番号 2 0 9 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 6 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 5 2 】

【 化 8 5 】

5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC
TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAACGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTT
CAGGACAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGC
TGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGATTTCTTTGGTTCGGGGAGTCTCCTC
TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 309)

アミノ酸配列

【 0 3 5 3 】

【 化 8 6 】

5' QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GYFTFGYYMH WVRQAPGQGLEWMG WINPNSGGTNYAQKFQD
RVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCAR DFFGSGSLLYFDY WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号 310)

10

表 4 2 : 2 . 6 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 5 4 】

【 表 4 2 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS	1-25	311
CDR1	GYFTFGYYMH	26-35	312
FR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	313
CDR2	WINPNSGGTNYAQKFQD	50-66	314
FR3	RVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCAR	67-98	315
CDR3	DFFGSGSLLYFDY	99-112	316
FR4	WGQGLVTVSSA	113-124	317

20

* 配列番号 3 1 0 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 5 5 】

【 化 8 7 】

5' GATATGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCAACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 318)

30

アミノ酸配列

【 0 3 5 6 】

【 化 8 8 】

5' DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLHSGGKTYLY WYLQRPQPPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEVDGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (配列番号 319)

表 4 3 : 2 . 6 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 5 7 】

【 表 4 3 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号：
FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	320
CDR1	KSSQSLHSGGKTYLY	24-39	321
FR2	WYLQRPQPPQLLIY	40-54	322
CDR2	EVSNRFS	55-61	323
FR3	GVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEVDGVYYC	62-93	324
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	325
FR4	FGGOTKVEIKR	103-113	326

40

* 配列番号 3 1 9 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 7 . 1

重鎖可変領域

50

塩基配列

【 0 3 5 8 】

【 化 8 9 】

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATGAG
GAATACTACTATGTTTCGGGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCCACCGTCTCC
TCAGCC 3' (配列番号 217)

アミノ酸配列

【 0 3 5 9 】

【 化 9 0 】

5' QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFNNGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYY
ADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DEEYVVVSGLDY WGQGTTLVTVSSA 3'
(配列番号 218)

表 4 4 : 2 . 7 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 6 0 】

【 表 4 4 】

Table with 4 columns: 領域, 配列, アミノ酸残基*, 配列番号. Rows include FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 with their respective amino acid ranges and sequence numbers.

* 配列番号 2 1 8 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 6 1 】

【 化 9 1 】

5' CTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGCTCTGCATCTGTAAGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCGAGTCAGACATATGCAATATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGTT
CCTAATCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTT
GCAACTTATTACTGTCAAAGTATAACAGTGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG
GTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 226)

アミノ酸配列

【 0 3 6 2 】

【 化 9 2 】

5' LTQSPSSLSASVRDRVITC RASQDISNYLA WYQQKPGKVPNLLIY AASTLQS GVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYC QKYNAPLTPGGGTKVEIKR 3' (配列番号 227)

表 4 5 : 2 . 7 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 6 3 】

【 表 4 5 】

Table with 4 columns: 領域, 配列, アミノ酸残基*, 配列番号. Rows include FRI, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 with their respective amino acid ranges and sequence numbers.

* 配列番号 2 7 7 のアミノ酸残基

抗体 - 2 . 8 . 1

重鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 6 4 】

【 化 9 3 】

5' CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGACACCCACACAGACCCTCACGCTG
ACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTGGTGGAAATGGGTGTGGGCTGGATCCGT
CAGCCCCCAGGAAAAGGCCCTGGACTGGCTTACACTCATTTATTGGAATGATGATAAGCAC
TACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTTACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG
GTCCTTAGAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACTTATTACTGTGCACACCTG
CATTACGATATTTGACTGGTTTTAACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCC 3' (配列番号 235)

アミノ酸配列

【 0 3 6 5 】

【 化 9 4 】

5' QITLKESGPTLVPTQTLTLTCTFS GFSLSSTGGMGVG WIRQPPGKALDWLT LIYWNDKDH
YSPSLKS RLITTKDTSKNQVLRMTNMDPVDATATYYCAH LHYDILTGFNFDY WGQGLVTVSSA 3'
(配列番号 236)

表 4 6 : 2 . 8 . 1 重鎖 V 部領域

【 0 3 6 6 】

【 表 4 6 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FR1	QITLKESGPTLVPTQTLTLTCTFS	1-25	配列番号 237
CDR1	GFSLSSTGGMGVG	26-37	配列番号 238
FR2	WIRQPPGKALDWLT	38-51	配列番号 239
CDR2	LIYWNDKDHYSPLKS	52-67	配列番号 240
FR3	RLITTKDTSKNQVLRMTNMDPVDATATYYCAH	68-99	配列番号 241
CDR3	LHYDILTGFNFDY	100-112	配列番号 242
FR4	WGQGLVTVSSA	113-124	配列番号 243

* 配列番号 2 3 6 のアミノ酸残基

軽鎖可変領域

塩基配列

【 0 3 6 7 】

【 化 9 5 】

5' GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGG
TCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTC
TCCACAGCTCCTGATCTATAACGCTTTCCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCAGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTGAG
GCAGTATTTACACTGAAAATCAGCAGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTATA
GAGTTTCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (配列番号 244)

アミノ酸配列

【 0 3 6 8 】

【 化 9 6 】

5' DIVMTQTPLSLPVTPEEPASISC RSSQSLLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIY TLSYRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQRIEFPLT FGGGTKVEIKR 3' (配列番号 245)

表 4 7 : 2 . 8 . 1 軽鎖 V 部領域

【 0 3 6 9 】

【 表 4 7 】

領域	配列	アミノ酸残基*	配列番号:
FR1	DIVMTQTPLSLPVTPEEPASISC	1-23	配列番号 246
CDR1	RSSQSLLDSDDGNTYLD	24-40	配列番号 247
FR2	WYLQKPGQSPQLLIY	41-55	配列番号 248
CDR2	TLSYRAS	56-62	配列番号 249
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	63-94	配列番号 250
CDR3	MQRIEFPLT	95-103	配列番号 251
FR4	FGGTKVEIKR	103-114	配列番号 252

* 配列番号 2 4 5 のアミノ酸残基

(実施例 1 6 : 診断剤としての抗 G P N M B 抗体の使用)

試料中の G P N M B 抗原の検出 :

10

20

30

40

50

下記は、試料中のGPNMB抗原を検出するための酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)のプロトコールである。この測定法において、96ウエルマイクロタイタープレートや384ウエルマイクロタイタープレート等のマイクロタイタープレートのウエルをGPNMBに対する第一の完全ヒトモノクローナル抗体により数時間吸着させる。固定化抗体は、試験試料に存在するかもしれないGPNMBのいずれかに対する捕捉抗体として働く。ウエルをすすぎ、分析物の非特異的吸着を妨げるために、乳タンパク質やアルブミン等のブロッキング剤で処理する。

【0370】

続いて、GPNMB抗原を含むと疑われる試験試料、または標準量のGPNMB抗原を含む溶液でウエルを処理する。そのような試料は、例えば、病理の診断指標となると考えられる血中のGPNMBレベルを有すると疑われる被験体からの血清試料であってよい。

10

【0371】

試験試料またはスタンダードを洗い流した後、ビオチンによる結合体化によって標識された第二完全ヒトモノクローナル抗GPNMB抗体によりウエルを処理する。標識された抗GPNMB抗体は検出抗体として働く。過剰な第二抗体を洗い流した後、アビジン結合体化西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)と適当な発色性基質で処理する。試験試料中の抗原の濃度はスタンダード試料から作成した標準曲線との比較により決定する。

【0372】

このELISAアッセイは、試験試料中のGPNMB抗原の検出のために非常に特異的でありとても感受性のあるアッセイを提供する。

20

【0373】

患者中のGPNMB抗原濃度の決定：

サンドイッチELISAはヒト血清中のGPNMBレベルを定量するために用いることもできる。サンドイッチELISAに使用される2種類の完全ヒトモノクローナル抗GPNMB抗体はGPNMB分子上の異なるエピトープを認識する。このELISAは下記の通り実施する：コーティング緩衝液(0.1M NaHCO₃, pH9.6)中、2μg/mLの濃度で50μlの捕捉用抗GPNMB抗体をEISAプレート(Fisher)にコートする。4で一晚のインキュベーション後、プレートを200μlのブロッキング緩衝液(PBS中、0.5%BSA、0.1%Tween20、0.01%チメロサール)で1時間、25で処理する。プレートをPBS中の0.05%のTween20(洗浄緩衝液WB)で洗浄する(3x)。正常血清または患者血清(Clinomics、Bioreclamation)を、50%ヒト血清を含むブロッキング緩衝液で希釈する。プレートを血清試料とともに一晚、4でインキュベートし、WBで洗浄し、次に100μl/ウエルのビオチニル化検出用抗GPNMB抗体とともに1時間、25でインキュベートする。洗浄後、プレートをHRP-ストレプトアビジンとともに15分間インキュベートし、前と同じように洗浄し、次に色の発生のためにH₂O₂中の100μl/ウエルのo-フェニレンジアミン(Sigma展開溶液)で処理する。反応は50μl/ウエルのH₂SO₄(2M)で停止させ、ELISAプレートリーダーを用いて492nmで分析した。血清試料中のGPNMBの濃度は4パラメーター曲線適合プログラムを用いて精製GPNMB抗原の希釈物と比較することにより計算する。

30

40

患者の癌の段階付け：

上記診断例で示され、論じられた結果に基づいて、GPNMB抗原の発現レベルに基づき被験体の癌の段階付けができることが理解されよう。癌の一定の種類(例えば、黒色腫)について、疾患の進行の多様な段階および/または癌の治療的処置における多様な時点で診断される患者からの血液試料を採取する。血液試料に存在するGPNMB抗原の濃度を、存在する抗原の量を特異的に決定する方法を用いて決定する。そのような方法には、ELISA法、例えば前記の診断例に記載した方法がある。進行または治療の各段階に関する統計的に有意な結果を提供する試料集団を用いて、各段階に特徴的と見なされる抗原の濃度範囲が明確に示される。

【0374】

50

研究下の患者の癌の進行を段階付けるために、または被験体の治療コースに対する応答を特徴付けるために、血液試料を被験体から採取し、試料中に存在するGPNMB抗原の濃度を決定する。このように得られた濃度は、その値がどの範囲の濃度に入るのかを同定するために用いられる。このように同定された範囲は、診断被験体の多様な集団で同定された進行段階または治療段階に関連し、よって、研究下の被験体の段階が提供される。

【0375】

(実施例17：GPNMBに対する抗体による癌の診断)

卵巣癌腫瘍を有すると疑われる被験体を同定し、疑われた腫瘍からの組織試料を試験するために取り出す。次に、取り出された組織を、比色分析用標識を有する抗GPNMB抗体に接触させる。抗GPNMB抗体が取り出された組織に特異的に結合するかどうかを決定する。結合は癌性組織を示す一方で、結合の欠如は非癌性組織を示す。このように患者の状態を診断して、引き続く試験、カウンセリングおよび/または治療を容易にする。

10

【0376】

(実施例18：GPNMBに対する抗体による癌の治療)

腫瘍細胞上のGPNMBの標的化は癌の危険があるか、または癌に苦しむ被験体を治療するために有用である。そのような被験体は、本発明の抗GPNMB抗体による治療から恩恵を受けるだろう。典型的には、抗体は、外来患者の設定で、ゆっくりとした静脈内(IV)注射により約0.1~1.0mg/kgの用量にて週1回の投与で投与する。抗体の適当な治療効果のある用量は治療を行う医師により選択され、おおよそ1μg/kg~20mg/kg、1μg/kg~10mg/kg、1μg/kg~1mg/kg、10μg/kg~1mg/kg、10μg/kg~100μg/kg、100μg/kg~1mg/kgおよび500μg/kg~5mg/kgの範囲にあるだろう。

20

【0377】

さらに、抗体はGPNMB関連疾患に関連する疾患を予防し、および/またはその重症度および/または症状を低減するために用いられる。

【0378】

ヒトにおける抗体の臨床的有効性を調べるために、特に卵巣癌、肺癌または結腸癌等の、しかしこれらに限定されない癌を有する個人を同定し、治療集団にランダム化する。治療集団は、抗体治療を受けない集団および異なる用量の抗GPNMB抗体で治療する集団を含む。個人は前向きにフォローされ、抗体治療を受ける個人は状態の改善を示す。

30

【0379】

(実施例19：CR011-vcMMAEの抗腫瘍効果の特異性(CR011-ONC-1))

この研究は抗体-医薬結合体の構成成分とその製剤の抗腫瘍効果を決定し、これらの結果をインタクティブな免疫結合体の抗腫瘍効果に関連付けるために行なった。

【0380】

結果：

SK-ME-2黒色腫の断片を外殻針によりマウスに移植し、腫瘍が定着した後、CR011-vcMMAEと多様な成分による治療を調べて、この物質の抗腫瘍効果の特異性を示した。リン酸緩衝食塩水(ベヒクル)または免疫結合体調製物の成分(3%DMSO、スクロース、リン酸媒体)のいずれかが投与されたコントロールグループは腫瘍サイズを最大2,000mgまで絶えず増加させて、この時点でそれら動物を研究から排除した。明らかな、または統計的に有意な抗腫瘍効果は観察されなかった。しかし、CR011-vcMMAE治療(5mg/kg/治療、q4d×4)は最初の2投与後に測定可能な障害を生じた。腫瘍成長障害は、認識可能な腫瘍がすべての6試験動物で検出されなくなるまで続いた(図4)。予備試験において、腫瘍退縮は完全であり、長期にわたる観察期間(200日まで)にもかかわらず腫瘍の再増殖がその後起こることはなかった。

40

【0381】

結論：

免疫結合体により生じる退縮は、免疫結合体の個々の成分によるものではなく、また該

50

免疫結合体の製剤の成分によるものでもない。このことは、CR011抗体のみの処理（グループ3）または遊離モノメチルオーリスチンEによる処理（グループ4）（適用される用量はインタクトな免疫結合体に含まれるものと同じである）の後に腫瘍成長の阻害がないことにより示される。さらに、遊離のMMAEで注意された抗腫瘍効果の欠如は、抗体-医薬結合体からの持続放出の結果としてのMMAEの抗腫瘍効果が免疫結合体の抗腫瘍効果を説明するものではないと示唆する。抗体-MMAE結合体からのMMAEの放出は、インビトロで非常に遅いプロセスであることが示され（抗CD30抗体-オーリスチンE免疫結合体の場合で $T_{1/2} = 6.0$ 日（Sanderson et al., Clin. Cancer Res. 11: 843-852 (2005)）、ヒト黒色腫異種移植片の成長を低減するのに効果的ではなかった本研究に用いられた「大量瞬時投与量」よりもさらにかなり低い血漿または血清濃度を提供するにちがいない。

10

【0382】

（実施例20：CR011-vcMMAEはヒトSK-MEL-5黒色腫異種移植片の成長を阻害して胸腺欠損マウスに定着した黒色腫瘍の完全な退縮を導く（CR011-ONC-3））

この研究は、定着したヒト黒色腫であるSK-MEL-5異種移植片の第2モデルに対する抗体-医薬結合体であるCR011-vcMMAEの効力と治療有効性を評価するために実施された。

【0383】

結果：

20

起源は無関係であるが、SK-MEL-5は細胞膜の表面上でGPNMBを発現し、CR011-vcMMAEによりインビトロで死滅させられる。この研究において、ベヒクルPBSと食塩水および参照薬剤のピンラスチンとパクリタキセルとともに、CR011免疫結合体の抗腫瘍効果を調べた。SK-MEL-2腫瘍と同じように、ピンラスチンは、食塩水とPBSコントロールグループと比較した場合に、目立つが、有意ではない腫瘍成長阻害（ $P = 0.21$ ）を生じた（図5）。しかし、パクリタキセルによる治療の開始後すぐに、有意な腫瘍成長阻害が治療開始の3日後には観察され（ $P = 0.039$ ）、この抗腫瘍効果が続いて、100%成長阻害（静止）を生じた。SK-MEL-5を有する試験動物のピンラスチンとパクリタキセルに対する応答は短いものであった。最大許容用量での治療の休止後、腫瘍は迅速な進行性の成長を再開した。長期で無腫瘍の一匹の生存動物がパクリタキセルグループに存在し、一つの自然退行が食塩水で処理されたグループに存在した。

30

【0384】

CR011-vcMMAEによる治療後、実質的な腫瘍成長阻害ならびに腫瘍成長の遅延と完全な退縮がSK-MEL-5癌を持った動物で起こり、これらの効果は用量に依存した。10mg/kg/処置において、食塩水（ $P = 0.0096$ ）に比較して処置が始まった後、早くも7日目（2処置に相当）と、PBS処置のコントロール（ $P = 0.039$ ）に比較して、処置が始まった後、早くも10日目に有意な抗体効果が認められた。用量依存的にCD011-vcMMAEは腫瘍の成長の遅れを生じて、定着したSK-MEL-5黒色腫異種移植片の完全な退縮をもたらした（完全な退縮を有する動物の比率に関しては、図5の表挿入を参照されたい）。完全な退縮が、1.25mg/kg/処理ではなく、2.5mg/kg/処置のCR011-vcMMAE用量で起こった。

40

【0385】

以前の研究にあるように、免疫結合体による毒性の徴候は体重または体重増加に対する効果の死亡率からもわかるように治療動物に起こらなかった。

【0386】

結論：

CR011-vcMMAEは、SK-MEL-5ヒト黒色腫の定着異種移植片に対して実質的で用量依存性の抗腫瘍効果を及ぼす。一回または二回だけの処置後、有意な腫瘍成長の阻害が注意され、長期の腫瘍のない生存動物を導く。完全な退縮が2.5mg/kg

50

g の静脈内 (q 4 d × 4) 用量で生じた。

【 0 3 8 7 】

(実施例 2 1 : C R 0 1 1 - v c M M A E (C R 0 1 1 - P K - 1 A) の薬物動態)

この研究の目的は、予想される臨床的投与経路である静脈内注射の後の C R 0 1 1 - v c M M A E のインビボ安定性を示すことにあった。

【 0 3 8 8 】

材料と方法

C R 0 1 1 - v c M M A E の C R 0 1 1 抗体成分をサンドイッチタイプの酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) により測定した。この E L I S A では、血清を、C R 0 1 1 抗体に対する同種抗原 (G P N M B 、 C G 5 6 9 7 2 - 0 3) で被覆したマイクロタイタープレート (10) のウエルに加え、ヒト抗体の量を信号発生剤 (西洋ワサビパーオキシダーゼ) に結合体化させた抗グロブリンにより検出した。

【 0 3 8 9 】

結果：

薬物動態。C R 0 1 1 - v c M M A E の抗体成分の化合物利用性の持続性を胸腺欠損マウスにおける薬物動態研究で調べた (研究 C R 0 1 1 - P K - 1 、 図 6) 。抗体 - 医薬結合体の血清濃度 - 時間プロフィールを、C R 0 1 1 - v c M M A E の静脈内投与後に胸腺欠損マウスで決定し、その結果を図 6 に示す。1 または 1 0 m g / k g を静脈内で受けた胸腺欠損マウスはサンプリング時間の全期間 (4 2 日間) にわたって用量に比例する血清濃度を示した。濃度 - 時間のパターンは二相性であった。しかし、初期相 () は全 A U C の < 2 % に寄与するだけの小さいものであった。それにもかかわらず、化合物は末梢血液から非常にゆっくりと消失し ($T_{1/2} = 10.3$ 日間) 、 $1 \mu g / mL$ と $10 \mu g / mL$ の血清濃度が投与後 6 週間血液に残存した。 (20)

【 0 3 9 0 】

C R 0 1 1 - v c M M A E の薬物動態パラメーターの推定を表 4 8 に示す。一つのパラメーターが注目に値する。定常状態での分配量 (V_{ss}) は非常に低く、理論的最小値に近づいている；このことは、化合物が血管外空間の外側に分布していないことを示唆する。C R 0 1 1 - v c M M A E の分布パターンならびに 排出相は一般的に抗体に関して得られた値と十分一致し (*Reviews by Mahmood and Green, Clin. Pharmacokinetics* 44: 331 - 347 (2005) ; または *Lobo et al. J. Pharm. Sci.* 93: 2645 - 2668 (2004) を参照) 、類似の医薬負荷を有する抗体 - オーリスタチン E 免疫結合体について得られた値に一致する (*Hamblett et al., Clin. Cancer Res.* 10: 7063 - 7070 (2004)) 。 (30)

表 4 8 . 静脈内投与後の C R 0 1 1 - v c M M A E に関する P K パラメーター。

【 0 3 9 1 】

【表 4 8】

パラメーター	単位	1 mg/kg	10 mg/kg
A	µg/mL	8.97	74.6
B	µg/mL	9.82	113
アルファ	1/h	0.179	0.0812
ベータ	1/h	0.00269	0.00281
AUC	h*µg/mL	3712	41210
アルファ半減時間	h	3.88	8.531
ベータ半減時間	h	258	247
体積	mL/kg	53.2	53.2
Cmax	µg/mL	18.8	188
Cl	mL/h/kg	0.269	0.243
MRT	h	368	348
Vss	mL/kg	99.0	84.5

略号： A：アルファ相の前指数関数的定数； Alpha：アルファ相の指数関数的速度定数； AUC：0から無限までの曲線下の全領域； B：ベータ相の前指数関数的定数； Beta：ベータ相の指数関数的速度定数； Cl：総クリアランスまたは全身クリアランス； C_{max}：最大の観察濃度； MRT：平均滞留時間； 体積：中心コンパートメントの体積； V_{ss}：定常状態分配量 薬物動態パラメーターの推定を表48に示す。一つのパラメーターが注目に値する。定常状態での分配量（V_{ss}）は理論的最小値に近づいている。これらのデータは、化合物が血管外空間の外側に分布しないことを示唆する。総合すれば、これらのデータは、-vcMMAE細胞毒性部分を有する他の免疫結合体に関するデータと十分一致する（Hamblett et al., Clin. Cancer Res. 10:7063-7070(2004)を参照）。

【0392】

結論：

CR011-vcMMAE抗体-医薬結合体は、黒色腫異種移植片の破壊と根絶に十分な連続的な曝露を好ましいとする血清-濃度プロファイルを有する。静脈内投与後の免疫結合体は、腫瘍細胞の長期間の曝露を確実にする十分に長い半減時間（ $T_{1/2} = 10.3$ 日間）を有し、頻繁な投与を必要としないだろう。CR011-vcMMAEのインビボ（例えば、胸腺欠損マウス）での持続性は他のオーリスタチンE免疫結合体に匹敵する。

【0393】

（実施例22：CR011-vcMMAEの抗腫瘍効果のスケジュール依存性（CR011-ONC-1））

本研究の目的は、CR011抗体-医薬結合体の治療的抗腫瘍効果が投与計画に依存する程度を決定し、可能であれば、この異種移植モデルの最適投与間隔を決定することであった。

【0394】

材料と方法：

本研究のプロトコールを表49に示す。治療的抗腫瘍効果が投与スケジュールにより影響されるとの仮説を調べるために、CR011-vcMMAEの抗腫瘍効果を5つの異なる投与間隔（すなわち、治療間の0、1、4、8および16日間）で測定し、各投与間隔で3つの投与量レベルを用いた（すなわち、2、8および32mg/kgの蓄積量）；各グループに関して、n=6匹の胸腺欠損マウス。

【0395】

注意：この実験におけるすべての5組のグループ（例えば、グループ5、6および7は1つの組を表し、それぞれ32、8および2mg/kgの蓄積量を受けた）が同一の蓄積量を受けたが、「大量瞬時投与量」を受けた最初の組は他の4組とは異なることに注意さ

10

20

30

40

50

りたい。4組のグループが4処理を受けたのに対し、第一の組がただ1つの「大量瞬時投与」しか受けなかった（下記表49のカラム7を参照）、「大量瞬時投与」組の各グループの C_{max} は他の4組の C_{max} よりもおそらく4倍高かったであろう（静脈内投与後の用量直線性の薬物動態に関するセクションを参照されたい）。

表49. 投与間隔研究のプロトコール (CR011-PHM-2)

【0396】

【表49】

グループ	処置	ROA	用量 (mg/kg)	投与計画	投与間隔 (日数)	処置回数 (n)	累積用量 (mg/kg)
1	リン酸緩衝食塩水			大量瞬時投与	0	1	N.A.
2	CR011-AE	静脈内	32	大量瞬時投与	0	1	32
3	CR011-AE	静脈内	8	大量瞬時投与	0	1	8
4	CR011-AE	静脈内	2	大量瞬時投与	0	1	2
5	CR011-AE	静脈内	8	qd x4	1	4	32
6	CR011-AE	静脈内	2	qd x4	1	4	8
7	CR011-AE	静脈内	0.5	qd x4	1	4	2
8	CR011-AE	静脈内	8	q4d x4	4	4	32
9	CR011-AE	静脈内	2	q4d x4	4	4	8
10	CR011-AE	静脈内	0.5	q4d x4	4	4	2
11	CR011-AE	静脈内	8	q8d x4	8	4	32
12	CR011-AE	静脈内	2	q8d x4	8	4	8
13	CR011-AE	静脈内	0.5	q8d x4	8	4	2
14	CR011-AE	静脈内	8	q16d x4	16	4	32
15	CR011-AE	静脈内	2	q16d x4	16	4	8
16	CR011-AE	静脈内	0.5	q16d x4	16	4	2
17	賦形剤	静脈内	N.A.	q16d x4	16	4	N.A.

結果：

この研究のために、5つの異なる投与間隔を実験的に調べた後（すなわち、治療間の0、1、4、8および16日間）、長期の腫瘍のない生存動物による完全な完全退縮の頻度を決定した。1つの組が、段階的な用量レベルであるが一つの投与間隔の3グループと定義される（グループ5、6および7が1組を表し、これらのすべてのグループが1日の投与間隔で処置された）グループの各組の総合応答を図7に示す。CR011-vcMMAEに应答する試験動物の総合応答は、大量瞬時投与と1日と4日の投与間隔とが、投与間の8日や16日等の長い間隔と比較して治癒比率にごくわずかな利点を提供することを示唆するように思える。しかし、この効果は有意ではなかった（ $P < 0.2904$ ）。したがって、これらのデータは、SK-MEL-2モデルにおけるCR011-vcMMAEの抗腫瘍効果がスケジュールに左右されないことを示唆する。この結論は、他のグループよりもおよそ4倍も高い血漿濃度にさらされた大量瞬時投与組の試験動物（グループ2、3および4）が治癒被験体の高い比率を示さなかったことから支持される。

【0397】

多様な投与量レベルの効果の検討を含むように本研究の当初の設計を拡大した。各組について、1グループの動物は、4日の投与間隔を用いた以前の研究で長期の腫瘍のない動物を導く一致した治療効果を提供した8mg/kgの累積用量を受けさせた。さらに、2mg/kgと32mg/kgの累積用量を用いた。

【0398】

多様な投与間隔と併せた投与量レベルの効果を図8に示す。32mg/kgの累積用量を受けた胸腺欠損マウスは、投与間隔とは関係なく各グループの100%において完全な退縮を示した；すなわち、32mg/kgの累積用量はスケジュール非依存性であり、試験動物の100%（6匹の動物/グループの5グループ=30試験動物）で完全な退縮に十分な用量よりもはるかに高い用量を示す。8mg/kgの累積用量を受けた動物はスケジュール依存性を示さず、完全な退縮のほとんど同一の比率を示した（すなわち、28/

30 = 93%)。2 mg / kg (累積用量)を受けた試験動物は(q 4 d × 4の正規化投与計画を用いた)予備研究において治療の閾値以下であることが認められ、これは有意ではないがスケジュール依存性であると思われ、かなり低い完全縮退比率(すなわち、13%)を生じた。

【0399】

結論：

投与間隔研究からのデータは、SK-MEL-2 黒色腫異種移植片の応答がCR011-vcMMAEの投与スケジュールに依存しないことを示す。大量瞬時投与または低い投与間隔による投薬計画には何の利点も示すことができなかったが、一定の閾値累積用量未満では、複数の処置を単一の大量瞬時投与へと組み合わせることには幾つかの利点が存在するとの示唆がある。

10

【0400】

(実施例23：ヒト黒色腫におけるGPNMB転写物の発現)

GPNMBは、神経膠芽腫で発現し、神経膠芽腫由来の腫瘍細胞のインビトロとインビボでの侵襲性を仲介することが最近示された(例えば、Loging et al., Genome Res. 10:1393-1402(2000);およびRich et al., J. Biol. Chem. 278:15951-15975(2003))。これらの発見を確認し、これら発見をさらなる癌型まで拡張するために、ヒト癌細胞系と組織中のGPNMB転写物の発現を調べた。

【0401】

20

材料と方法：

DNase消化工程を有するRNeasyキット(Qiagen Inc., Valencia CA)を用いて、全RNAを単離した。ワンステップRT-PCRキット(Qiagen)を用いてRT-PCRを下記のように実施した。RT:1サイクルにつき50で45分間および95で15分間。PCR:95で1分間、50で1分間および72で2分間を30サイクル、72で10分間の最終伸長。生成物は、2%アガロース/0.33%低融点アガロースゲルで分離し、臭化エチジウム染色により可視化した。各RNA試料の統合性を、GAPDHを増幅するために設計されたプライマーを用いたRT-PCRにより検証した。使用された特定のプライマー(5'-3')は以下の通りである：

30

【0402】

【化97】

GPNMB: 順方向-GAATTCAGAGTTAAACCTTGAG (配列番号327)

逆方向-CAGGAATCTGATCTGTTACCAC (配列番号328)

MART-1: 順方向-CTGACCCTACAAGATGCCAAGAG (配列番号329)

逆方向-ATCATGCATTGCAACATTTATTGATGGAG (配列番号330)

チロシナーゼ: 順方向-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC (配列番号331)

逆方向-AGGCATTGTGCATGCTGCTT (配列番号332)

pMEL-17: 順方向-TATTGAAAGTGCCGAGATCC (配列番号333)

逆方向-TGCAAGGACCACAGCCATC (配列番号334)

40

RTQ-PCR分析は、TaqMan試薬(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いたABI Prism7700配列決定システムにより実施した。等量の(複数の)正規化RNAを、GPNMBに特異的なプライマーを用いる40サイクルのPCR反応で鋳型として用いて閾サイクル(C_T)値を得た。下記のプライマー(5'-3')を用いた：

【0403】

【化98】

順方向 -TCAATGGAACCTTCAGCCTTA (配列番号 335)

逆方向 -GAAGGGGTGGGTTTTGAAG (配列番号 336)

プローブ -TET-CTCACTGTGAAAGCTGCAGCACCAG -TAMRA (配列番号 337)

結果：

我々の転写物発現分析は、GPNMBが高い比率のヒト転移性黒色腫試料中で強く発現することを示した。GPNMBは、調べられた5/7黒色腫細胞系および5/5黒色腫の臨床種で高度に発現($CT < 27.0$)していることがRTQ-PCRを用いてわかった(表50)。対照的に、GPNMBは、我々の実験で陰性コントロールとして用いられた腎臓癌細胞TK-10では発現しなかった。

10

表50：ヒト黒色腫細胞系と臨床種におけるGPNMB転写物の発現

【0404】

【表50】

試料の詳細		発現*
細胞系		
UACC-62	転移性黒色腫	21.2
M14	転移性黒色腫、メラニン欠乏性	22.2
SK-Mel-5	転移性黒色腫、腋窩部リンパ節	22.9
SK-Mel-28	転移性黒色腫、皮膚	24.1
WM-266-4	転移性黒色腫、皮膚	24.5
A-375	転移性黒色腫、皮膚	29.0
LOXIMVI	転移性黒色腫、メラニン欠乏性	30.9
TK-10	腎臓細胞癌	40.0
臨床種		
#1	転移性黒色腫	26.6
#2	黒色腫	26.4
#3	黒色腫	26.9
#4	転移性黒色腫	24.1
#5	転移性黒色腫	25.3

20

* RTQ-PCR分析からの閾サイクル(C_T)値。

【0405】

30

これらの結果を拡大するために、17種類の黒色腫細胞系の一団中のGPNMBの発現を半定量RT-PCRにより調べた(表51)。これらの結果は、GPNMB転写物が15/17の黒色腫細胞系で高く発現し、1/17の黒色腫細胞系(A-375)で低く発現し、1/17の黒色腫細胞系(LOXIMVI)やコントロールTK-10では検出不能であることを示す。

【0406】

表51. RT-PCR分析

【0407】

【表 5 1】

細胞系	注釈	発現*			
		GPNMB	MART-1	チロシナーゼ	pMel-17
M14	転移性黒色腫、メラニン欠乏性	+++	+++	+++	+++
SK-Mel-5	転移性黒色腫、腋窩部リンパ節	+++	+++	+++	+++
SK-Mel-28	転移性黒色腫、皮膚	+++	+++	+++	+++
WM-266-4	転移性黒色腫、皮膚	+++	+++	+++	+++
SK-Mel-2	転移性黒色腫、皮膚	+++	+++	+++	+++
UACC-257	転移性黒色腫	+++	+++	+++	+++
A2058	転移性黒色腫、リンパ節	+++	+++	+++	+++
G361	転移性黒色腫、皮膚	+++	+++	+++	+++
HT-144	転移性黒色腫、皮膚	+++	+++	+++	+++
MEWO	転移性黒色腫、リンパ節	+++	+++	+++	+++
SK-Mel-3	転移性黒色腫、リンパ節	+++	+++	+++	+++
MALME-3M	転移性黒色腫	+++	+++	+++	+++
UACC-62	転移性黒色腫	+++	+++	+++	-
SK-Mel-24	転移性黒色腫、リンパ節	+++	-	+++	-
RPMI-7951	転移性黒色腫、リンパ節	+++	-	+	-
A-375	転移性黒色腫、皮膚	+	-	-	-
LOXIMV1	転移性黒色腫、メラニン欠乏性	-	-	-	-
TK-10	腎臓細胞癌	-	-	-	-

10

* R T - P C R 分析：強（+++）、弱（+）または検出不能（-）。

20

【0408】

さらに、黒色腫細胞系におけるGPNMB転写物の発現を公知の黒色腫/メラニン形成細胞関連癌転写物(MART-1、チロシナーゼおよびpMEL-17)と比較(表51)すると、MART-1、チロシナーゼおよびpMEL-17はそれぞれ13/17、14/17および12/17の黒色腫細胞系において強い発現を示した。注目すべきは、12/17の試料が高いレベルのGPNMBおよび3種類すべての黒色腫/メラニン形成細胞関連遺伝子を共発現した。検出不可能なGPNMB発現を有したLOXIMVIとTK-10の両細胞系は、調べられた3種類の黒色腫/メラニン形成細胞関連遺伝子の発現も欠いた。

【0409】

30

(実施例24:CR011-vcMMAEの成長阻害活性はGPNMB発現に依存する)

材料と方法

フローサイトメトリー：細胞系の細胞表面上のGPNMB発現の定量的分析はフローサイトメトリーにより決定した。約 1×10^6 個の細胞を収集し、洗浄し、PBS(pH7.4)、4%FBSおよび0.1%NaN₃を含む染色緩衝液中のCR011またはアイソタイプ対応コントロール抗体のいずれかの飽和量(10μg/mL)とともに30分間氷上でインキュベートした後、洗浄し、1:100のR-フィコエリトリン(PE)結合体化ヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA)による30分間の氷上の染色を行なった。細胞を1%パラホルムアルデヒド/PBSに固定化し、Becton Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターにより調べた。データ分析をBecton Dickinson Cell Questソフトウェアバージョン3.3を用いて実施し、幾何学的蛍光強度比(GMR)を細胞タイプのそれぞれで決定した。

40

【0410】

細胞表面結合抗体の内部移行は、改良型フローサイトメトリー操作により評価した。簡単に説明すると、細胞懸濁液を10μg/mLの非結合体またはMMAE結合体化のCR011で氷上30分間標識した。細胞の洗浄後、インキュベーションを37°Cに1時間シフトして、結合体化抗体を内部移行させた。氷上に残った細胞(全表面結合)または37°Cでインキュベートした細胞(内部移行)をPE結合体化ヤギ抗ヒト抗体(1:100)

50

で30分間染色して、細胞表面に保持されたCR011を検出した。標識された細胞を上記のようにフローサイトメトリーで分析した。内部移行した抗体の比率をGMRおよび下記式を用いて決定した。内部移行比率 = 全表面結合(4) - 全表面結合(37) / 全表面結合(4) × 100 免疫沈降および免疫プロット分析：細胞を採取し、1% NP-40、0.15M NaCl、0.02M トリス塩酸、10% グリセロール、0.01M EDTA および完全プロテアーゼ阻害剤混合物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を含む溶解緩衝液中、30分間氷上で溶解した。上清を集め、タンパク質濃度をBCAプロテインアッセイキット (Pierce, Rockford, IL) で決定した。免疫沈降のために、2μgの一次抗体を0.5~1mgの全細胞溶解物に加え、4で3時間インキュベートした後、プロテインAアガロース (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) とともに氷上で2時間インキュベートした。アガロースビーズを氷冷TBS-T (0.1% Tween-20を有するPBS) 中で洗浄した。免疫沈降物を、Laemmli 試料緩衝液中で沸騰させ、遠心した後、上清から回収した。

10

【0411】

免疫プロット分析のために、全細胞溶解物(50μg)または免疫沈澱物を還元条件下で4~20% トリスグリシゲル (Invitrogen) で分離し、電気泳動により0.45μmのPVDF膜 (Invitrogen) に移した。膜を、TBS-T中の3% BSA (Sigma, St. Louis, MO) で3時間ブロックし、ウサギ抗GPNMBポリクローナル抗体(1:1000)をプローブとして用いて3時間調べた。パーオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ウサギIgG(H+L)二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs) を加え、30分間インキュベートした。膜をTBS-T中で洗浄し、製造業者のプロトコールにしたがって増強化学発光 (Amersham) に供した。

20

【0412】

クローン形成アッセイ：CR011-vcMMAEの成長阻害活性をクローン形成アッセイにより決定した。細胞を96ウエルプレートにコートし、一晚回復させた。非結合体CR011、遊離MMAE、CR011-vcMMAEまたはアイソタイプ対応vcMMAE結合体化抗体を多様な濃度でサブコンフルエントな細胞培養物に加え、4日間37でインキュベートした。次に、細胞を6ウエルプレートに移し、コロニーを形成させた。コロニーをギムザ染色 (Sigma) で染色し、カウントした。生存細胞フラクションを、処理試料と未処理コントロールの比率に基づいて計算した。結果を、GraphPad Prismバージョン4ソフトウェアを用いたコントロールの比率として表した。IC50は、未処理のコントロール培養物に比較してコロニー形成の50%の減少をもたらす濃度と定義した。

30

【0413】

結果：

CR011-vcMMAE成長阻害活性がGPNMB発現に依存することを示すために、全長GPNMBタンパク質をHEK293細胞中に異所的に発現させた。免疫プロット (図9A) およびFACS (図9B) 分析により、GPNMBがGPNMB/プラスミド移入細胞で発現したことを確認した。CR011-vcMMAEによる細胞の処理とそれに続くクローン形成アッセイにより、GPNMBを発現するHEK293細胞は、GPNMB発現を欠くコントロール細胞よりも、CR011-vcMMAE仲介成長阻害に対してさらに感受性があることを示した (図9C)。

40

【0414】

これらの発見をさらに検証するために、GPNMBを発現するSK-Mel-2細胞にsiRNAをトランスフェクトして、内在性GPNMB発現を特異的に阻害した。トランスフェクションの2日後と4日後に実施された免疫プロットとFACS分析は、全GPNMB (図10A) と表面GPNMB (図10B) タンパク質レベルが、トランスフェクション後のSK-Mel-2細胞中で、コントロールトランスフェクタントに比較して有意

50

に減少することを示した。GPNMB発現の量はトランスフェクション後、少なくとも7日間減少した。CR011-vcMMAEによるこれらの細胞の処理は、SK-Mel-2細胞が、siRNA仲介GPNMBのノックダウン後のCR011-vcMMAEの成長阻害活性に対して感受性がさらに低いことを示した(図10C)。まとめると、これらのデータは、CR011-vcMMAEの成長阻害活性が細胞表面GPNMB発現を必要としたことを示す。

【0415】

(実施例25: CR011-vcMMAEによる細胞周期停止とアポトーシスの誘導)
成長阻害のCR011-vcMMAEの機構を評価するために、細胞周期分析を実施した。

10

【0416】

材料と方法:

CR011-vcMMAEの細胞周期効果は、細胞を完全成長培地で24時間または48時間処理した後に評価した。簡単に説明すると、示された時間間隔で30 μ Mのプロモデオキシウリジン(BrdU, Sigma)のパルスを経験した細胞に30分間与え、細胞を固定し、メタノール中で透過処理した。新生DNA合成を抗プロモデオキシウリジン-FITC(BD Biosciences, San Jose, CA)染色により検出した。全DNA含量はヨウ化プロピジウム(PI, Sigma)を用いて検出した。アポトーシス分析のために、細胞を上記のように処理し、アネキシンV-FITCで標識した後、製造者のプロトコールにしたがってアネキシンV-FITCアポトーシス検出キットI(BD Pharmingen, San Diego, CA)を用いてヨウ化プロピジウムを排除した。(以前の実施例に記載した)フローサイトメトリーを用いて、細胞周期とアポトーシス研究を評価した。

20

【0417】

結果:

GPNMB陽性SK-Mel-2細胞または陰性TK-10コントロール細胞を、CR011-vcMMAEで多様な時間処理した後、プロモデオキシウリジンで30分間処理して、新生DNA合成を検出し、最後にヨウ化プロピジウムで処理して、全DNA含量を検出した。DNA合成と細胞周期進行をフローサイトメトリーで決定した(表52)。

表52. CR011-vcMMAE処理細胞の細胞周期の分析

30

【0418】

【表52】

処理 (ng/mL)	% G ₁	S相の%	% G ₂ /M	% Sub-G ₁
SK-Mel-2				
24時間				
未処置	55.2	30.0	9.9	0.5
CR011 (1000)	63.6	25.2	6.4	0.5
IgG ₂ -vcMMAE (1000)	65.9	21.8	5.8	0.8
CR011-vcMMAE (100)	56.0	26.9	12.4	0.2
CR011-vcMMAE (1000)	43.7	20.0	28.5	1.1
TK-10				
24時間				
未処置	39.7	43.7	7.0	0.5
CR011 (1000)	42.0	39.8	6.3	0.3
IgG ₂ -vcMMAE (1000)	42.8	40.2	5.9	0.3
CR011-vcMMAE (100)	51.1	35.1	4.5	0.7
CR011-vcMMAE (1000)	52.6	34.2	3.9	0.8

40

細胞周期分析はフローサイトメトリーにより実施し、細胞サイクルの各相の細胞のパーセントをCell Questソフトウェア(Becton Dickinson)により決定した。

50

【 0 4 1 9 】

1 0 0 0 n g / m L の C R 0 1 1 - v c M M A E に対する (しかし、イソタイプコントロール I g G 2 - v c M M A E に対してではない) G P N M B 陽性細胞の 2 4 時間の曝露は、未処置細胞と比較して G 1 と S 相の細胞の減少比率 (1 0 %) と G 2 / M の細胞の増加比率 (1 8 . 6 %) をもたらした。対照的に、C R 0 1 1 - v c M M A E は G P N M B 陰性細胞の周期に影響を与えなかった。処置の 4 8 時間後に、C R 0 1 1 - v c M M A E は G 1 と S 相の細胞の比率 (1 1 %) を減少し、G 2 / M の細胞の比率 (2 4 %) を増加させた。

【 0 4 2 0 】

C R 0 1 1 - v c M M A E 処置後の亜 G 1 集団の増加はアポトーシスの開始を示唆した。この可能性を調べるために、アネキシン V 表面結合とヨウ化プロピジウム (P I) 排除の損失を用いてアポトーシスの分析を実施した。我々の結果は、C R 0 1 1 - v c M M A E 処置の 4 8 時間に続いて単一染色された (アネキシン - V + / P I -) 細胞の 1 1 % の増加により示されるように、1 0 0 0 n g / m L の C R 0 1 1 - v c M M A E は G P N M B を発現する細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導することを示した (表 5 3)。表 5 3 . C R 0 1 1 - v c M M A E によるヒト黒色腫細胞におけるアポトーシスの誘導

10

【 0 4 2 1 】

【表 5 3】

AnnV ⁺ /PI ⁻ 処置 (ng/mL) LR	% AnnV ⁺ /PI ⁺	% AnnV ⁺ /PI ⁺	% AnnV ⁺ /PI ⁻	%
	UL	UR	LL	
SK-Mel-2				
4 8 時間				
未処置	1.23	1.23	94.37	
3.16				
CR011 (1000)	0.36	0.45	94.45	
4.74				
IgG ₂ -vcMMAE (1000)	0.17	0.51	95.93	
3.39				
CR011-vcMMAE (100)	0.30	0.40	89.93	
9.37				
CR011-vcMMAE (1000)	2.08	2.02	82.08	30
13.83				
TK-10				
4 8 時間				
未処置	0.54	0.66	96.92	
1.87				
CR011 (1000)	0.83	0.34	98.27	
0.55				
IgG ₂ -vcMMAE (1000)	0.62	0.95	97.09	
1.33				
CR011-vcMMAE (100)	0.71	0.57	97.72	
1.00				
CR011-vcMMAE (1000)	0.86	0.83	97.75	40
0.56				

20

30

40

アポトーシスの分析はフローサイトメトリーにより実施し、4分円UL (左上)、UR (右上)、LL (左下) およびLR (右下) 中の細胞のパーセントをCellQuestソフトウェア (Becton Dickinson) により決定した。AnnV : アネキシン V - F I T C および P I : ヨウ化プロピジウム

さらに、C R 0 1 1 - v c M M A E 処置後の二重染色 (アネクチン - V + / P I +) 細胞の増加は C R 0 1 1 免疫結合体が細胞死を増強することを示した。総合すると、これらの結果は C R 0 1 1 - v c M M A E が G 2 / M 細胞周期停止を選択的に誘導した後にアポトーシス性の細胞死をもたらすことを示唆する。

【 0 4 2 2 】

50

(実施例 26 : C R 0 1 1 : 抗体依存性細胞傷害 (A D C C) の機構を利用する黒色腫治療に用いられる裸の完全ヒト I g G 1)

黒色腫と脳腫瘍細胞の表面に顕著に観察される抗原である C G 5 6 9 7 2 / G P N M B に対する完全ヒトモノクローナル抗体 (m A b) - I g G 2 を作った。裸の C R 0 1 1 I g G 2 m A b (m A b 1 . 1 5) は、C G 5 6 9 7 2 を発現する細胞に対してインビトロでもインビボでも効果を持たなかった。よって、I g G 2 から I g G 1 にスイッチするアイソタイプは、m A b に、A D C C エフェクター機能によりヒト黒色腫細胞を死滅させることができるのかどうかを調べた。

【 0 4 2 3 】

簡単に説明すると、C R 0 1 1 を I g G 2 から I g G 1 抗体にスイッチするために、I g G 1 (アロタイプ G m (f)) の定常領域をコードする二本鎖 D N A を合成し、重複 P C R アプローチを用いて、I g G 2 定常領域を I g G 1 定常領域に置換した。それらの配列を下記に示す：

C R 0 1 1 m A b 1 . 1 5 . 1 成熟重鎖 (I g G 2) :

【 0 4 2 4 】

【 化 9 9 】

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSEFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSG
STYSNPSLKSRTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGGQ
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVEE
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 394)

C R 0 1 1 m A b 1 . 1 5 . 1 成熟重鎖 (I g G 1) :

【 0 4 2 5 】

【 化 1 0 0 】

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSEFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSG
STYSNPSLKSRTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGGQ
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 395)

最初に、細胞表面上に C G 5 6 9 7 2 を発現し、C R 0 1 1 I g G 2 に結合することが示されている S K - M E L - 2 黒色腫細胞上の I g G 1 と I g G 2 完全ヒトモノクローナル抗体の結合性を分析した。図 1 1 に示されるように、I g G 1 と I g G 2 の両方の m A b が、アイソタイプコントロール m A b に比べて S K - M E L - 2 細胞上の同程度の F A C S シフトを引き起こし (図 1 1)、両方のアイソタイプが、同程度の飽和密度と親和性をもって C G 5 6 9 7 2 / G P N M B に結合することを示した。

【 0 4 2 6 】

次に、C R 0 1 1 I g G 1 m A b は、ヒト P B M C の存在下の培養液中の S K - M E L - 2 細胞に A D C C を誘導できるのかどうかを調べた。ヒト P B M C を、F i c o l

10

20

30

40

50

1 - P l a q u eを用いて全血から単離した。簡単に説明すると、50 mLのチューブ中で、15 mLのP B Sを、10 mLのF i c o l l - P l a q u eを下層にした20 mLの全血に加えて、チューブを2000 RPMで遠心した。単核細胞を界面から集め、P B Sで3回洗浄した。A D C Cアッセイを、P e r k i n - E l m e rの細胞溶解用蛍光アッセイ (D E L F I A E u T D A細胞毒性アッセイ)を用いて、96ウエルプレート中で実施した。この操作は標的細胞に蛍光増強リガンド (B A T D A、ビス (アセトキシメチル) ターピリジン - ジカルボキレート) を負荷することに基づく。この親水性リガンドは膜を迅速に通過する。細胞内で、そのエステル結合は加水分解して、膜をもはや通過できない親水性リガンド (T D A、ターピリジン - ジカルボン酸) を形成する。細胞溶解後、リガンドは遊離し、ユウロピウム溶液に導かれる。ユウロピウムとリガンドは高い発光性があり安定なキレート (E u T D A) を形成する。蛍光強度は、励起と発光の波長をそれぞれ $e x = 340 \text{ nm}$ と $e m = 613 \text{ nm}$ を用いて記録する。

【0427】

S K - M E L - 2細胞における抗体依存性仲介細胞毒性を、10、30、60および100のエフェクター：標的比と、C G 5 6 9 7 2 / G P N M Bに対するI g G 1またはI g G 2 m A bの多様な濃度 (2、5、10 $\mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$) とを用いてP B M CとC R 0 1 1モノクローナル抗体の存在下で検定した。我々のデータは、30 ~ 100倍のP B M C、I g G 1 m A bが用量依存的にS K - M E L - 2細胞の細胞溶解を引き起こす一方で (図12A)、I g G 2 m A bは細胞溶解を示さないこと (図12B) を示した。したがって、我々は、C G 5 6 9 7 2 / G P N M Bに対するC R 0 1 1 I g G 1 m A bは、G 5 6 9 7 2 / G P N M Bを発現する細胞をインピトロで殺すことができ、A D C Cエフェクター機能によりインピボで潜在的にヒト黒色腫を殺すことができると結論する。C R 0 1 1 I g G 1 m A bは、高用量I L - 2、インターフェロン - ガンマまたはT N F - アルファ等の転移性黒色腫にいくつかの臨床的有益性を提供できる免疫エフェクターサイトカイン類に組み合わせることも有用となりうる。C R 0 1 1は、ワクチン免疫治療、M D X - 0 1 0等の免疫調節物質、放射線治療および/または化学療法と組み合わせることで黒色腫を治療するために用いることもできる。

【0428】

(実施例27：星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫およびC N Sの他の腫瘍の治療)

星細胞腫 / 神経膠芽腫は、満たされていない顕著な医療ニーズを代表する医薬難治性腫瘍である。これらのヒト癌組織と癌細胞系で高度に発現するヒト遺伝子 (G P N M Bとしても知られる) としてC G 5 6 9 7 2を同定した。C G 5 6 9 7 2はヒト脳において非常に限定された発現パターンを有する小胞輸送に潜在的に関与するタイプIの膜貫通タンパク質である。我々は、C G 5 6 9 7 2細胞外領域 (アミノ酸23 ~ 480) に対する完全ヒトモノクローナル抗体を作った。C R 0 1 1 - v c M M A Eと命名した我々の主要なモノクローナル抗体は生物化学的に特性付けられ、星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫または神経外胚葉起源のヒト脳腫瘍に由来する細胞系に対する治療活性について調べられた。

【0429】

転写物発現の分析は、星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫に由来する脳腫瘍または神経外胚葉起源の腫瘍における高度に上昇したC G 5 6 9 7 2 m R N Aの発現を示すが、正常な脳では制限された低い発現を示した。C R 0 1 は、F A C S分析により、脳腫瘍細胞系上の表面C G 5 6 9 7 2に結合した。C R 0 1 1 m A bのウエスタンブロットは100と120 k D aの遺伝子産物を予測した。クローン形成アッセイはC R 0 1 1 - v c M M A E m A bが脳腫瘍細胞系の成長を阻害することを示した。

【0430】

材料と方法

細胞系と培養条件：すべてのヒト細胞系であるS K - M E L - 2、X F - 4 9 8、S N B - 7 8、U - 1 1 8 - M G、S F - 5 3 9、H 7 9 M G、D 3 9 2 - M G、D 5 3 4 - M G、S K - N - S H、U - 2 5 1、S F - 2 9 5、D 4 5 0 - M G、U 8 7 M G、S F - 2 6 8、T 9 8 GおよびS W - 1 7 8 3はアメリカ培養細胞系統保存機関 (M a n a s

10

20

30

40

50

sas、VA)から得るか、またはNCI(Bethesda、MD)から購入した。細胞は、10%FBS(Gemini Bio-Products、Woodland、CA)およびペニシリン-ストレプトマイシンを含有するDMEMまたはRPMI(Invitrogen、Carlsbad、CA)中に維持した。

【0431】

リアルタイム定量的RQR(RTQ-PCR)：全RNAは、DNase消化工程を用いるRNeasyキット(Qiagen Inc.、Valencia)を用いて単離した。RNA試料は、市販されている正常ヒト組織(Clontech、Palo Alto、CA；Invitrogen、Carlsbad、CA)から得るか、または仕様書にしたがって成長させた細胞系から得た。RNAを収集し、TaqMan(登録商標)試薬(PE Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いて、PCRを既に記載されているように実施した(Shimkets RA et al. Nat Biotechnol.、1999. 17-8:798-803)。アクチンとグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)TaqMan(登録商標)プローブを製造業者の指示にしたがって用いることでRNAを基準化した。等量の基準化RNAを、CG56972に特異的な試薬を用いるPCR反応で鋳型として用いて、閾サイクル(CT)値を得た。グラフで表現するために、CT数を、最大レベルの発現を示す試料に対する相対的な発現に変換した。RTQ-PCR分析は、TaqMan試薬(PE Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いたABI Prism7700配列決定システムにより行なった。下記プライマー(5'-3')が用いられた：

【0432】

【化101】

順方向 -TCAATGGAACCTTCAGCCTTA(配列番号 338)

逆方向 -GAAGGGGTGGGTTTTGAAG(配列番号 339)

プローブ -TET-CTCACTGTGAAAGCTGCAGCACCCAG-TAMRA(配列番号 340)

CuraChip(商標)：組織をトリゾールに溶解した。15mgの全RNAをpoly(T)プライマーとともに用いることによりピオチン標識cDNAを作った。11,000個のオリゴヌクレオチドプローブの専売CuraChipマイクロアレイ(CuraGen、New Haven、CT)にハイブリダイズさせることにより遺伝子発現を評価した。スライドを一定の回転で15時間、30でハイブリダイズし、30分間、室温で洗浄し、ストレプトアビジン溶液中でインキュベートし(4、30分間)、15分間室温で洗浄し、Cy3結合体化検出緩衝液中でインキュベートし(4、30分間)、15分間、室温で3回洗浄した。スライドをスキャンし(GMS418スキャナー、Genetic Microsystems、Woburn、MA)、IMAGENEソフトウェア(BioDiscovery、Marina Del Rey、CA)を用いることにより分析した。データを90番目のパーセントイル正規化に供し、CG56972遺伝子の発現をハウスキーピング遺伝子GAPDHの発現と比較して分析した。CG56972を検出するために用いたオリゴヌクレオチドは、5'-TGATCAGTAAGGATTTCACTCTGTTTGTAA(配列番号341)である。GAPDHを検出するために用いたオリゴヌクレオチドは、GAPDH転写物(受託番号NM_002046)の塩基対1243~1272に対応する5'-ACCTTGTCATGTACCATCAATAAGTACCC(配列番号342)である。

【0433】

フローサイトメトリー：細胞系の表面上のCG56972発現の定量分析はフローサイトメトリー(FACS)により決定した。およそ 1×10^6 個の細胞を採取し、洗浄し、PBS(pH7.4)、4%FBSおよび0.1%NaN₃を含む染色緩衝液中で飽和量(10μg/mL)のCR011またはアイソタイプ適合コントロール抗体のいずれかとともに30分間、氷上でインキュベートした後、洗浄し、1:100のR-フィコエリトリン(PE)結合体化ヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch

10

20

30

40

50

Laboratories, Inc, West Grove, PA) により 30 分間、氷上で染色した。細胞を 1% パラホルムアルデヒド / PBS で固定し、Becton Dickinson FACSCalibur フローサイトメーターで調べた。データ分析は Becton Dickinson Cell Quest ソフトウェア、バージョン 3.3 を用いて実施し、各細胞タイプの幾何平均蛍光強度比 (GMR) を決定した。

【0434】

免疫プロット分析: SK-MEL-2、XF-498、SNB-78、U-118-MG、SF-539、H79MG、D392-MG、D534-MG、SK-N-SH、U-251、SF-295、D450-MG、U87MG、SF-268、T98G および SW-1783 の各細胞を採取し、1% NP-40、0.15M NaCl、0.02M トリス塩酸、10% グリセロール、0.01M EDTA および完全なプロテアーゼ阻害剤混合物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を含む溶解緩衝液中で、氷上、30 分間溶解した。上清を集め、タンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイキット (Pierce, Rockford, IL) で決定した。免疫プロットアッセイのために、6 ウエル Falcon 組織培養皿から採取した集密的な細胞の 1 ウエルからの 40 μ l の全細胞溶解物を Laemmli 試料緩衝液中で沸騰し、遠心し、還元条件下で 4~20% トリス-グリシンゲル (Invitrogen) により分離した。ゲルを 0.45 μ m の PVDF 膜 (Invitrogen) に電気泳動により移した。膜を TBST 中の 3% BSA (Sigma, St. Louis, MO) により 3 時間ブロックし、抗 GPNMB ポリクローナル IgG (R&D Systems; 1 μ g/mL、合計 10 μ g) をプローブとして用いて 3 時間調べた。パーオキシダーゼ結合体化抗ヤギ第二抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs) を加え、30 分間インキュベートした。膜を TBST 中で洗浄し、製薬業者のプロトコールにしたがって増強化学発光 (Amersham) に供した。

【0435】

クローン形成アッセイ: CR011-vcMMAE の成長阻害活性はクローン形成アッセイにより決定した。細胞を 96 ウエルプレートに蒔き、一晚回復させた。CR011-vcMMAE またはアイソタイプ適合モノクローナル抗体を多様な濃度でサブコンフルエントな細胞培養物に加え、4 日間、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。次に、細胞を 6 ウエルプレートに移し、コロニーを形成させた。コロニーをギムザ染色 (Sigma) で染色し、カウントした。生存細胞フラクションは処置細胞と未処置細胞の比率に基づいて計算した。結果は GraphPad Prism Version 4 ソフトウェアを用いてコントロールの比率として表した。IC50 は、未処置コントロール培養物に比較して、コロニー形成の 50% の減少をもたらす濃度と定義された。

【0436】

結果:

1. ヒト星細胞腫、神経膠芽腫、髄芽腫、および神経外胚葉起源の腫瘍における CG56972 転写物の発現

ヒト癌細胞系および組織における CG56972 転写物の発現を調べた (図 13A と 13B)。この転写物発現分析は、CG56972 が、調べられた全ての (15/15) ヒト脳癌細胞系において強く発現することを示した (図 13A)。RTQ-PCR を用いて、CG56972 が、混合された神経膠芽腫/星細胞腫起源、神経膠芽腫/神経膠腫、星細胞腫および転移性神経芽細胞腫の細胞で発現することがわかった。脳または CNS の腫瘍細胞系のほとんどが CT < 27 の高レベルの発現を示した。注目すべきは、CG56972 が、XF-498、U-118-MG、SNB-78 および SF-539 の各細胞において高度に発現する (CT < 27.0) ことがわかった。図 13B に示されているように、CG56972 は、4/5 の神経膠腫ヒト生検および 1/4 の髄芽腫ヒト生検でも高レベルで発現した。ヒト遺伝子の大きな一団 (図 13C) を含むインハウスチップからのマイクロアレイ分析を用いて、CG56972 は星細胞腫または神経膠芽腫起源の 5/9 の脳腫瘍ならびに 4/9 の乏突起細胞腫に高度に発現することがわかった。これらの腫瘍

発現プロフィールの分析は、CG56972メッセージが正常な脳組織においてかなり低い程度まで検出されることを示した。これらのデータは、ニューロンやグリア細胞等の正常なヒト脳におけるCR011染色の欠如を示した我々の免疫組織化学的データとも一致する。総合すると、これらのデータは、CG56972転写物は脳腫瘍や乏突起細胞腫細胞系、およびヒト腫瘍から単離された試料において非常に高い量で発現していることを示す。

2. CG56972 / GP NMB に対する完全ヒトCR011モノクローナル抗体の産生
CG56972タンパク質はタイプ1の膜貫通糖タンパク質であると予想されている。CG56972転写物の高度発現と、ヒト癌試料におけるこのタンパク質の潜在的な細胞表面局在化は、モノクローナル抗体(mAb)を潜在的な癌治療剤として作る自信を我々に与えた。したがって、我々はヒトCG56972細胞外領域(ECD; アミノ酸23~480)をクローニングした。クローニングされたcDNAの配列決定は、エキソン6/7境界での選択的スプライシングのためによると思われるインフレームの36塩基挿入の存在を明らかにし、これは、公になったGP NMBタンパク質配列の339残基後にさらなる12アミノ酸(ATTLKSYDSNTP)(配列番号343)を付加した。36塩基挿入の確実性をRT-PCRにより実証した。次に、このcDNAをヒトHEK293細胞に発現した。得られたタンパク質を回収し、馴化培地から精製し、免疫原として用いて、CG56972-ECDに対する完全ヒトmAbを作った。Xenomouse(登録商標)の免疫後、CG56972-ECDタンパク質をELISAにより特異的に認識するmAbを作った。1.15と命名された我々の主要なmAb、すなわち精製CG56972-ECDに対するCR011は、精製CG56972-ECDタンパク質に対して52nMのKdを示し、詳細な特性付けのために選択され、この実例の残り部分の焦点となるだろう。

3. ヒト脳腫瘍におけるCG56972タンパク質発現のCR011 mAb 1.15による検出

多様な脳腫瘍細胞系上のCG56972タンパク質の表面発現をフローサイトメトリーで調べるために、CR011モノクローナル抗体をさらに用いた(図14と表54)。FACS分析は、脳腫瘍細胞系であるXF-498、U-118-MG、SNB-78およびSF-539(これらすべてはCG56972転写物発現に対して陽性である)が、CR011モノクローナル抗体により、アイソタイプコントロールmAbバックグラウンドを超える少なくとも1.5倍の表面染色を示した(図14)。CG56972転写物発現に対して特に弱く陽性(CT>32)であった細胞系SF-268(図13Cおよび表54)はコントロールmAbバックグラウンドを超える約1.5倍と予想される最小表面染色を示した。CG56972発現に対する陽性コントロールであるSK-MEL-2黒色腫細胞系は強い細胞表面染色を示した。

【0437】

脳腫瘍細胞系の一団中のCG56972タンパク質の発現を調べるために、全細胞溶解物を回収し、SDS-PAGEで分離し、膜フィルターに移し、CG56972ポリクローナル抗体による免疫プロット分析に供した。図15に示されるように、CG56972ポリクローナル抗体は、CG56972転写物を発現することが示された多様な脳腫瘍細胞系から約100と120kDaのCG56972の差別的なグリコシル化産物である2つのタンパク質種を検出した(図13A)。CG56972タンパク質は、XF-498、SNB-78およびH79-MGおよびSF-539の各細胞において高度に発現した。p100とp120の両種は、U-118-MG、U251、D534-MGおよびD450-MGにおいて低い程度で検出された。CG56972タンパク質は、CG56972転写物を弱く発現する細胞系SF-268でほとんどまたはまったく発現されなかった。アイソタイプ適合コントロールIgG2抗体は調べられた細胞系のいずれからもCG56972を免疫沈降させなかった。これらのすべてのデータは脳腫瘍における予想された分子量のCG56972タンパク質の細胞表面発現と一致する。

4. CR011-vcMMAEによる星細胞腫/神経膠芽腫細胞系のインビトロ成長阻害

10

20

30

40

50

CG56972は非常に限定されたヒト組織発現パターンを有する。予備研究では、CR011は、直接に用いられた場合、CG56972を発現する癌細胞系の成長を阻害することはなかった(データは示さず)。CG56972は脳腫瘍と黒色腫上の細胞表面分子であり、CR011はCG56972を発現する細胞とともにインキュベーションした後は内部移行したので、我々は、タンパク質合成阻害剤(サポリン)結合体化第2抗体と組み合わせた場合にCR011が癌細胞の成長を阻害するかどうかを調べた。CR011は、CG56972を発現する癌細胞の成長を特異的に阻害することができることを我々の結果はしめした(データは示さず)。よって、高度に安定であるが、細胞内プロテアーゼにより分解されるバリン-シトルリン(vc)リンカーを用いて、CR011を細胞毒性医薬のモノメチルオーリスタチンE(MMAE)に直接結合した。得られた抗体-医薬結合体をCR011-vcMMAEと命名した。

10

【0438】

CR011-vcMMAEが脳腫瘍細胞の成長を特異的に阻害するのかどうかを調べるために、クローン形成アッセイを実施して、CR011-vcMMAE処置後の細胞生存度を評価した。図16と表54に示されるように、CG56972を発現する細胞は、CR011-vcMMAEにより誘導した成長阻害に対しては感受性があったが、この抗原を十分に発現しない(3µg/mL未満のvcMMAEの濃度)細胞はそうではなかったこと(SF-268とLOXIMVIを参照)を我々の結果は示した。注目すべきことに、CR011-vcMMAEは、XF-498、SNB-78、U-118-MGおよびSF-539の各細胞上で、およそ215、450、1250および1050ng/mLのIC50を有した(図16と表54)。これらの実験において、IC50はFACS分析で測定された細胞表面密度と相関した。対照的に、結合体化コントロールヒトIgG2抗体-vcMMAEは、3µg/mLまでの濃度で調べられたいずれの細胞系(表54)の成長も1.5または4.5µg/mLを超えるIC50で阻害することはできなかった(表54)。

20

表54. RTQ PCR、FACS、およびCR011-mAbによるヒト癌細胞系の成長のインビトロ阻害

【0439】

【表54】

細胞系	説明	CT値	CR011倍シフト	CR011-AE IC50 (ng/ml)	IgG2-AE IC50 (ng/ml)
SK-MEL-2	黒色腫	ND	13.1, 21.4, 17.8	303	>1500
XF-498	神経膠芽腫	+++	10, 9.5	216	>1500
SNB-78	星状細胞腫	+++	8.6	449	>1500
U-118-MG	神経膠芽腫/星状細胞腫	+++	7.4	1254	>1500
SF-539	神経膠芽腫	+	5.4	1030	>4500
H79MG	神経膠芽腫/星状細胞腫	ND	4.7, 3.9	ND	ND
D392-MG	神経膠芽腫	ND	3.1	ND	ND
D534-MG	神経膠芽腫	ND	2.3	ND	ND
SK-N-SH	神経芽細胞腫	+	2	ND	ND
U-251	神経膠芽腫	+++	1.9	ND	ND
SF-295	神経膠芽腫	++	1.8	ND	ND
D450-MG	神経膠芽腫	ND	1.6	ND	ND
U87MG	神経膠芽腫/星状細胞腫	++	1.5	ND	ND
SF-268	神経膠芽腫/星状細胞腫	+	1.5	>1500	>4500
T98G	神経膠芽腫	+	1.3	ND	ND
SW 1783	神経膠芽腫	+	1.1	ND	ND

30

^a CR011-vcMMAE (mAb 1.15) : CT値は材料と方法に記載のようにRTQ PCRにより決定した。幾何平均比(GMR)はフローサイトメトリー分析により決定した。抗体-医薬細胞毒性(ADC)または細胞死滅は記載のようにクローン形成アッセイにより決定した。^b IC₅₀値は、三連ウエルで実施された各実験で代表的なクローン形成アッセイの平均とSDである。

40

【0440】

結論 :

50

これらのデータは、CR011-vcMMAEが、星細胞腫/神経膠芽腫およびそれらの転移ならびに髄芽腫と神経外胚葉起源の脳腫瘍の治療に非常に強力で選択的な物質であることを示す。CR011-vcMMAEは黒色腫の脳への転移や新生物性髄膜炎等の他の脳新生物の治療にも有用でありうる。

【0441】

(実施例28: CR011に由来する改変抗体)

本研究のCR011 bi-scFv(図17を参照)は細胞毒性ヒトTリンパ球上のT細胞レセプターのCD3エピトープに結合し、同時にGPNMBを発現する異常細胞を標的とするように設計され、異常細胞の溶解または破壊を容易にする最終結果をもたらす。

10

【0442】

mAb CR011(クローン1.15)のV_LとV_H領域が下記の3種類のCR011系改変抗体の構築に用いられた:

(1) CR011一本鎖抗体(CR011 scFv)

(2) CR011×抗CD3二重特異性一本鎖抗体(bi-scFv)リンカーセットL4-L2-L4

(3) CR011×抗CD3二重特異性一本鎖抗体(bi-scFv)リンカーセットL4-L4-L4

CR011 scFvタンパク質の成分は、シグナルペプチド-V_L(CR011)-リンカー4-V_H(CR011)-フラグタグであった。CR011×抗CD3 bi-scFv(リンカーセットL4-L2-L4)タンパク質の成分は、シグナルペプチド-V_L(CR011)-リンカー4-V_H(CR011)-リンカー2-V_H(抗CD3)-リンカー4-V_L(抗CD3)-フラグタグであった。CR011×抗CD3 bi-scFv(リンカーセットL4-L4-L4)タンパク質の成分は、シグナルペプチド-V_L(CR011)-リンカー4-V_H(CR011)-リンカー4-V_H(抗CD3)-リンカー4-V_L(抗CD3)-フラグタグであった。

20

【0443】

上で概略した多様なDNA成分を用いて3種類のCR011改変抗体産物を作った。DNA成分はBlue Heronにより合成され、市販のプラスミドベクターに当業者の精通した方法によってクローニングした。次に、これらのプラスミドをPCRを使用して、上記の3例で示した成分を組み合わせて発現ベクター用改変抗体挿入断片を作った。下記の本発明を実施する宿主発現系の例において、CR011発現ベクターのためにCHO K1哺乳類細胞を使用した。発現はこれらの細胞に限定されない;本発明のCR011改変抗体は、pETベクター、誘導ベクターおよび構成的ベクター等の、しかしこれらに限定されない他のベクター、システムおよび細胞を用いて発現できることが当業者により理解され、宿主として、大腸菌、バチルス種、酵母、例えば*Pichia pastoris*または昆虫細胞が挙げられよう。他の発現宿主として、多様な植物種やヤギ等のトランスジェニック動物も挙げることができる。

30

【0444】

SP(シグナルペプチド):分泌される産物を発現するためにシグナルペプチドを我々の構築物に組み込んだ。CHO細胞からの発現に利用されたシグナルペプチドは、免疫グロブリン軽鎖リーダーペプチド(Jirik et al., 1986)またはCR002抗体(CuraGen)から得た。

40

【0445】

bi-scFv成分の順番:抗体可変領域の順番は両bi-scFv構築物中に次の通り固定した:V_LI-L-V_HI-L-V_H2-L-V_L2。4V領域のそれぞれはリンカーセグメントLにより連結した。V_L1とV_H1は、CR011の免疫グロブリンの軽鎖と重鎖のそれぞれの可変領域を表し、V_H2とV_L2は、両bi-scFv構築物に用いられた抗CD3抗体の免疫グロブリンの重鎖と軽鎖のそれぞれの可変領域を表す。V領域の他の順番は、当業者により認識されるように2つのscFv成分のために使うことも

50

でき、それらの産物の生物活性を評価した。

【0446】

タグ：CR011 改変抗体のC末端に8アミノ酸のフラグタグを用いて産物の検出と精製を容易にした(Hickman et al., 2000)。

【0447】

抗CD3 scFv: bi-scFv構築物を作るために用いられた抗CD3抗体のV_LとV_H成分の配列は、NCBIデータベースで受託番号CAE85148(Luttrebuese et al.)に見られるだろう。

【0448】

構築物に用いられるリンカー：2つのモノマーscFv成分をCR011×抗CD3 bi-scFv(L4-L2-L4リンカーセット)中で連結するL2(5アミノ酸の短いリンカー)の配列はG₄S(Mack et al., 1995)である。L4は、205Cリンカー(Denzin et al., 1991)に基づく25アミノ酸のリンカー(LSADDAKKDAKKDDAKKDDL(配列番号344))であり、CR011 bi-scFv種の両方に用いられ、CR011 V_LおよびV_Hと、抗CD3 V_HおよびV_Lとを連結する。CR011×抗CD3 bi-scFv(L4-L4-L4リンカーセット)の場合、L4は2成分scFv成分を連結するためにも用いられる。CR011 scFvについては、L4リンカーが2つの可変領域の連結のために用いられた。

1. CR011 scFvおよびCR011×抗CD3 bi-scFv種の発現用DNAプラスミド構築物

CR011 scFvフラグタグ：CR011 scFvの発現構築物を生じさせるPCR増幅産物は、製造業者の指示通りにF1/R1プライマーを用いた後、F1ネステッド/R1プライマー対(表55)とPfu Turbo DNAポリメラーゼ(Stratagene, cat#600322)を用いたネステッドPCRにより合成DNA鋳型(Blue Heron)から作成した。CR011 scFvカセットをコードするSal I/EcoRI PCR断片は、Fast-Link DNA Ligation キット(Epicentre, cat#LK11025)を用いてpCTNベクター(CuraGen Corporation、哺乳類用発現ベクター)の対応する制限部位にクローニングした。

表55

【0449】

10

20

30

【表 5 5】

名称	配列
F1 プライマー	5'- TCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAATAGTGATGACGCA GTC (配列番号 345)
R1 プライマー	5'- CCGGAATCTTACTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCGCTAGCTGAGGAGACGGT (配列番号 346)
F1 ネステッドプ ライマー	5'- ACGCGTCGACCCACCATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGG CTC (配列番号 347)
F2 プライマー	5'- TCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAATAGTGATGACGCA GTC (配列番号 348)
R2 プライマー	5'- CCGGAATCTTACTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCGCTAGCTTTCAGCTCCAG (配列番号 349)
F2 ネステッドプ ライマー	5'- ACGCGTCGACCCACCATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGG CTC (配列番号 350)
F3 プライマー	5'- ACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACC (配列番号 351)
R3 プライマー	5'-CCGCTCGAGCTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCTTTCAGCTCCAGCTT (配列番号 352)
F3 ネステッドプ ライマー	5'- TCTTCGCGACCACCATGGAACCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGATACCACCGGA (配列番号 353)

10

20

CR011 × 抗CD3 bi-scfv (L4-L2-L4) リンカーセットフラグタグ：(L4-L2-L4) リンカーセットを有するCR011 × 抗CD3 bi-scfv に関するPCR増幅産物は、製造業者の指示通りにF2/R2プライマーを用いた後、F2ネステッド/R2プライマー対(オリゴヌクレオチドの配列については表55を参照されたい)とPfu Turbo DNAポリメラーゼ(Stratagene、cat # 600322)を用いたネステッドPCRにより合成DNA鋳型(Blue Heron)から作成した。CR011 × 抗CD3 (L4-L2-L4) bi-scfvをコードする配列を有するSal I/EcoRI PCR断片は、Fast-Link DNA Ligationキット(Epicentre、cat # LK11025)を用いてpCTNベクターの対応する制限部位にクローニングした。

30

【0450】

CR011 × 抗CD3 bi-scfv (L4-L4-L4) リンカーセットフラグタグ：(L4-L4-L4) リンカーセットを有するCR011 × 抗CD3 bi-scfv に関するPCR増幅産物は、製造業者の指示通りにF3/R3プライマーを用いた後、F3ネステッド/R3プライマー対(表55)とPfu Turbo DNAポリメラーゼ(Stratagene、cat # 600322)を用いたネステッドPCRにより合成DNA鋳型(Blue Heron)から作成した。CR011 × 抗CD3 (L4-L4-L4) リンカーセット) bi-scfvをコードする配列を有するNruI/XhoI PCR断片は、Fast-Link DNA Ligationキット(Epicentre、cat # LK11025)を用いてpEE14.4FL2発現ベクター(Lonza Biologies plc、228 Bath Road、Slough、Berkshire SL1 4DX、UK)の対応する制限部位にクローニングした。

40

【0451】

上記の3種類の発現構築物挿入断片のDNA配列は関連DNA産物の両ストランドの配列決定により確認した。

2. CHOK1細胞におけるCR011改変抗体のタンパク質産生

接着性チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHOK1)細胞(ATCC catalog # CCL-61)を、10%ウシ胎児血清(Gemini、cat # 100106)、GSサプリメント(JRH Biosciences、cat # 58672-100M

50

)および50 mg/Lゲンタマイシン(Invitrogen、cat#15750078)を補ったDMEM培地(Invitrogen、cat#10564-011)にて成長させた。

【0452】

CHOK1細胞に、FuGENE6試薬(Roche、cat#1815075)を製造業者の指示にしたがってインファクトした。発現と分泌はトランスフェクションの約48時間後に実施されたウエスタンブロットにより確認した。分泌された安定なCR011 scFvおよびCR011×抗CD3 bi-scFv(L4-L2-L4リンカーセット)系の選択は選択培地A(表56)中で実施した一方で、分泌された安定なCR011×抗CD3 bi-scFv(L4-L4-L4リンカーセット)系は選択培地B(表57)中で実施した。

【0453】

表56

【0454】

【表56】

CHOK1(接着性)選択培地A	供給メーカー	商品番号	説明
DMEM-グルタミンフリー	JRH Biosciences	51435-1000M	GSシステム(商標)用グルタミンフリーの培地(DMEM/高改変)
10%透析FBS(56°C、30分間で熱失活済)	JRH Biosciences	12117-500M	胎児ウシ血清、透析済(500mL)
1X GSサプリメント	JRH Biosciences	58672-100M	GSサプリメント(50X)
50 mg/Lゲンタマイシン	Invitrogen	15750078	ゲンタマイシン試薬溶液(50 mg/mL)、液体
1 mg/mL G418	Invitrogen	10131027	ジェネテシン (G418)

表57

【0455】

【表57】

CHOK1(接着性)選択培地B	供給メーカー	商品番号	説明
DMEM-グルタミンフリー	JRH Biosciences	51435-1000M	GSシステム(商標)用グルタミンフリーの培地(DMEM/高改変)
10%透析FBS(56°C、30分間で熱失活済)	JRH Biosciences	12117-500M	胎児ウシ血清、透析済(500mL)
1X GSサプリメント	JRH Biosciences	58672-100M	GSサプリメント(50X)
50 mg/Lゲンタマイシン	Invitrogen	15750078	ゲンタマイシン試薬溶液(50 mg/mL)、液体
25 μM MSX	Sigma	M 5379	L-メチオニンスルホキシミン(MSX)

いずれの場合も、分泌産物であるCR011 scFvおよびCR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット) bi-scFv CHOK1の96クローンのうち8クローンを拡大させ、保存した。いずれの場合も生成物を分泌する最も良い安定なクローンを、振盪フラスコ内で選択培地C(表58)を用いて37°Cで5%CO₂での懸濁培養に順応させた。CR011 scFvとCR011×CD3(L4-L2-L4リンカーセット) bi-scFvに関するタンパク質の産生は選択培地D(表59)の4L中、30°Cで5%CO₂にて実施した。

【0456】

表 5 8

【 0 4 5 7 】

【 表 5 8 】

CHOK1ラージスケール(懸濁)選択培地C	供給メーカー	商品番号	説明
Ex-Cell 302	JRH Biosciences	14324-1000M	LグルタミンなしのEx-Cell 302 CHOの無血清培地(1000mL)
5% FBS	JRH Biosciences	12117-500M	胎児ウシ血清、透析済(500mL)
GSサプリメント	JRH Biosciences	58672-100M	GSサプリメント(50X)
HTサプリメント	Invitrogen	11067030	HTサプリメント(100X)
1mg/mL G418	Invitrogen	10131027	ジェネテシン(G418)

10

表 5 9

【 0 4 5 8 】

【 表 5 9 】

CHOK1ラージスケール(懸濁)選択培地D	供給メーカー	商品番号	説明
Ex-Cell 302 + Ex-Cell CD CHO (1:1)	JRH Biosciences	14324-1000M	LグルタミンなしのEx-Cell 302 CHOの無血清培地(1000mL)
	JRH Biosciences	14360-1000M	CD CHO 培地 (1000mL)
5% FBS	JRH Biosciences	12117-500M	胎児ウシ血清、透析済(500mL)
GSサプリメント	JRH Biosciences	58672-100M	GSサプリメント(50X)
HTサプリメント	Invitrogen	11067030	HTサプリメント(100X)
1mg/mL G418	Invitrogen	10131027	ジェネテシン(G418)

20

CR011 × 抗CD3 (L4-L4-L4リンカーセット) bi-scfv CHOK1の200クローンのうちわずかに1クローンのみが分泌産物を産生することがわかった: このクローンを拡大させ、これを保存した。CR011 × 抗CD3 (L4-L4-L4リンカーセット) クローンに対するタンパク質の産生は、セルファクトリー装置(Nunc, cat # 164327)を用いて、選択培地B(表57)、1mM酪酸ナトリウム(Sigma, cat # B5887)中、37℃で10%CO₂にて実施した。

30

3. CR011 改変抗体のタンパク質精製

CR011 scfvフラグとCR011 × 抗CD3 (L4-L2-L4リンカーセット) bi-scfvフラグに関するタンパク質精製は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを含むクロマトグラフィーの3工程で達成された。CR011 × 抗CD3 (L4-L4-L4リンカーセット) bi-scfvフラグタンパク質の精製には、アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを用いた。

40

【 0 4 5 9 】

アフィニティークロマトグラフィーは、BioCAD700E装置(Applied Biosystems)で、抗FLAG M2アフィニティーゲル(Sigma, cat # A2220-25mL)を製造業者の指示にしたがって使用して実施した。イオン交換クロマトグラフィーは、平衡緩衝液として20mMトリス塩酸(pH7.5)および0~1MのNaClのグラジエント溶出を用いるMonoQ 5/50GLカラム(Amersham, cat # 17-5166-01)により実施した。サイズ排除クロマトグラフィーは、BioCAD700E(Applied Biosystems)液体クロマトグラフィー装置でSuperdex 75/10/300GLカラム(Amersham、

50

c a t # 1 7 - 5 1 7 4 - 0 1) を製造業者のプロトコールにしたがって実施した。

【 0 4 6 0 】

1 L の馴化 C H O K 1 培地からの適当な収量は下記の通りである：

(1) C R 0 1 1 s c F v : 1 . 0 m g

(2) C R 0 1 1 × 抗 C D 3 (L 4 - L 2 - L 4 リンカーセット) b i - s c F v : 0 . 5 m g

(3) C R 0 1 1 × 抗 C D 3 (L 4 - L 4 - L 4 リンカーセット) b i - s c F v : 1 . 5 m g

精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列は、エドマン分解により当業者に公知の方法を用いて決定した。最初の 5 アミノ酸の配列はいずれの場合 (C R 0 1 1 V_L タンパク質の成熟 N 末端) も E I V M T であり、シグナルペプチドによる正確なプロセシングが起こって、予想された配列と大きさの可溶性分泌産物が得られたことを示す。

10

【 0 4 6 1 】

3 種類の C R 0 1 1 改変産物の D N A とアミノ酸配列を以下に示す。

C R 0 1 1 s c F v - (V_L - L 4 - V_H) フラグの配列番号。ヒトカップ軽鎖のシグナルペプチドは K a b a t 等 (4 5 C L L - C L) に記載されたように用いた。C 末端に含まれる F L A G タグが存在した。K o z a k 配列 C C A C C は 5 ' P C R プライマーに含まれた。

【 0 4 6 2 】

【 化 1 0 2 】

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAAT
AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCA
GGGCCAGTCAGAGTGTGACAACAACCTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCTTC
CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
GGACCTGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTAAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
CGTCCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
AGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACCTACTT
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGATTATAAGGACGATGAT
GACAAATAGTAA (配列番号 354)

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLL
IYGASTRATGIPARFSGSGSGETFTLTISSLQSEDFAVYYCQYNNWPPWTFGQGTKVEIKLSADDAK
KDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLE
WIGYIYYSGSTYSNPSLKSRTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGLV
TVSSASDYKDDDDK (配列番号 : 355)

C R 0 1 1 × 抗 C D 3 (L 4 - L 2 - L 4 リンカーセット) b i - s c F v - の配列番号。ヒトカップ軽鎖のシグナルペプチドは K a b a t 等 (4 5 C L L - C L) に記載されたように用いた。C 末端に含まれる F L A G タグが存在した。

40

【 0 4 6 3 】

【化103】

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCAACCGGTGAAAT
 AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA
 GGGCCAGTCAGAGTGTGACAACAACCTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
 GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGT
 CTGGGACAGAGTTCACTCTACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
 AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACTTTC
 CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
 GGACCTGCAAGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGCTGAAGCCTTACAGACCCTGTCC
 CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
 CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
 CGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
 AGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGATATCAA
 CTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTT
 CTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGA
 ATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAAGTTCAAGGACAAGG
 CCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGA
 GGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCC
 AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAA
 AGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCA
 ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTT
 ACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAA
 AGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACA
 TCAGCAGCATGGAGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAAGTCCAACAGTGGAGTAGTAAACCCGCT
 CACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTAGCGATTATAAGGACGATGATGACAAA
 TAGTAA (配列番号 356)

10

20

MEAPAQLLFLLLLWLPDPTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLL
 IYGASTRATGIPARFSGSGSFTFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGGQTKVEIKLSADDAK
 KDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLE
 WIGYIYYSGSTYSNPSLKRVTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGLV
 TVSSGGGSDIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRQY
 TNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGLTTLVSSLSAD
 DAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
 RWIYDTSKVASGVPPYRFSGSGSSTYSYSLTISSMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKASDYK
 DDDDK (配列番号 357)

30

CR011 × 抗CD3 (L4 - L4 - L4 リンカーセット) bis - cFv - の配列番
 号。CR002 のシグナルペプチドを用いた。C末端に含まれるFLAGタグが存在した
 。

【0464】

40

【化104】

ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAAT
 AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCA
 GGGCCAGTCAGAGTGTGACAACAACCTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
 GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
 CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
 AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCTTC
 CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
 GGACCTGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTACAGACCCTGTCC
 CTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
 CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
 CGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
 AGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCATTATCAGCGGATGACGCCAAGAAA
 GACGCAGCCAAAAAGGACGATGCAAAGAAGGATGACGCAAAGAAAGATTTAGATATCAAACCTG
 CAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGACTTCTG
 GCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAAACAGAGCCCTGGACAGGGTCTGGAATG
 GATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCA
 CATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAG
 GCACCACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAAGA
 TGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCAATC
 ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAAGTCAACATGACCTGCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAAGTTACA
 TGAAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGT
 GGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAAATCA
 GCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAC
 GTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGATTATAAGGACGATGATGACAAATAGCTCGAG
 CGG (配列番号 358)

10

METPAQLLFLLLLWLPDITGBIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDDNLLVWYQQKPGQAPRLLIY
 GASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGGGTKVEIKLSADDAKKDA
 AKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYI
 YYSGSTYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGLTIVTSSLS
 ADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDLIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPG
 QGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYW
 GQGTTLTIVSSLSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDLIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYM
 NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGTSYSLTSSMEABDAATYYCQQWSSNPLTFGAG
 TKLELKDYKDDDDK (配列番号 359)

30

4. 3種類のCR011改変抗体のELISAによる試験、フローサイトメトリーおよび細胞毒性の決定

ELISA: CR011改変抗体の精製組換えGPNMB(2μg/mL)への結合を、一晚4で被覆されたプレートを用いて測定した。次に、プレートをブロックし、洗浄した。CR011改変抗体の多様な希釈物をウエルに加えた。プレートを1時間インキュベートし、洗浄した。HRP結合体化抗FLAG M2 mAb(Sigma, St. Louis, MO)をウエルに1時間加え、洗浄し、反応物を、TMB基質試薬を製造業者(Pharmingen, San Jose, CA)に記載されたように展開した。

40

【0465】

CR011 scFvとCR011×抗CD3(L4-L2-L4リンカーセット)bi-scFvのGPNMBへの結合は図18に示されるように最初にELISAで確認した。プレートに、HisとV5をタグとして付加したヒトGPNMBタンパク質を塗布した。塗布されたプレートを、CR011×抗CD3 bi-scFvを含む上清か、また

50

は精製CR011 scFvモノマーを含む上清のいずれかとともにインキュベートした。組換えmAb（モノマーとダイマーの両方）の結合は、抗FLAG-HRP結合mAb M2（Sigma）を用いて検出した。図18からわかるように、記載の両抗GPNMB抗体種は組換えGPNMBタンパク質に結合し、改変抗GPNMB抗体の特異性と結合活性が、この例に記載された方法を用いて保存されたことを示している。

【0466】

フローサイトメトリー：CR011改変抗体の天然のタンパク質への結合はFACSにより分析した。簡単に説明すると、ヒトT細胞とSK-Mel-5細胞をCR011 scFvかCR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFv（5 μg/試料/100 μl）のいずれかとともにインキュベートし、その後マウス抗FLAG mAb（Sigma）とPE結合体化ヤギ抗マウスIgF(ab')₂（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA）による染色を行った。1万の結果を集めて、FACSCalibur装置（Becton Dickinson、Mountain View、CA）を用いて分析した。

10

【0467】

細胞表面に発現した天然のGPNMBタンパク質へのCR011 scFvとCR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFv産物の結合を確かめるために、GPNMBを自然に発現するSK-Mel-5細胞を用いた。bi-scFvのヒトCD3分子への結合を確認するために、精製ヒトT細胞を使用した。陽性コントロールとして、天然PE結合体化抗CD3-PEおよびCR011 mAbを使用した。CR011 scFvの結合を、抗FLAG mAb M2を用いて検出し、続いてPE結合体化抗マウスIgGによる染色を行なう一方、CR011 mAb結合の検出のために、抗ヒトIgG-PEを用いた。T細胞に結合したコントロール抗CD3 mAbおよびSK-Mel-5腫瘍細胞に結合したコントロール抗GPNMB mAbを用いた。CR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFvのみがT細胞を染色した；予想されたようにCR011 scFvモノマーはCD3陽性T細胞に結合しなかった（図19を参照）。CR011 scFvモノマーかCR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFvのいずれかによるSK-Mel-5細胞への結合は低いレベルで存在した（表19）。

20

【0468】

細胞毒性：CR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFvがヒトTリンパ球に関連ヒト腫瘍細胞を殺すように再指令する能力はフローサイトメトリーにより測定した。腫瘍細胞をPKH2緑色発光リンカーキット（Sigma）で標識し、洗浄した。精製T細胞は、精製bi-scFvの存在下または不存在下で、PKH2標識腫瘍細胞とともにO/N培養した。GPNMB陽性腫瘍細胞の死をヨウ化プロピジウム（PI）の取り込みにより測定した。

30

【0469】

CR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFv産物がGPNMB陽性細胞のT細胞仲介死滅を高める能力を評価するために、細胞毒性試験を実施した。精製T細胞を、多様な量の精製CR011 scFvとCR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFv産物の存在下で、PKH2標識SK-Mel-5（GPNMB陽性）腫瘍細胞とともにO/N培養した。

40

【0470】

結論：

CR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFvは、Tリンパ球によるSK-Mel-5腫瘍細胞の死滅を有意に高めた（図20）。対照的に、単一特異的抗GPNMB svFvの付加はSK-Mel-5腫瘍の死滅を高めなかった。さらに、腫瘍細胞を、CR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-scFvとともに、Tリンパ球なしに培養した場合、細胞毒性は観察されなかった（図20）。これらのデータはCR011×抗CD3（L4-L2-L4リンカーセット）bi-

50

s c F v が、T細胞とS K - M e l - 5細胞との間に十分な橋渡しを提供して、細胞死を誘導すること、およびこの改変C R 0 0 1二重特異性抗体の両成分に生物活性があることを示す。したがって、本発明のC R 0 1 1 x 抗C D 3 (L 4 - L 2 - L 4 リンカーセット) b i - s c F v 改変抗体を、黒色腫、および存在するG P N M BとT細胞の上方制御されたレベルが存在する場合の他の癌等の疾患を治療する治療薬として用いてよい。

【0471】

発光やクロム放出アッセイ等の細胞毒性分析の他の方法を用いて、腫瘍を治療する際のC R 0 1 1 x 抗C D 3 (L 4 - L 2 - L 4 リンカーセット) b i - s c F v の有用性を示すことができる。他のリンカーを用いて、上記のC R 0 1 1 x 抗C D 3 (リンカーセット L 4 - L 4 - L 4) 分子におけるように2つのs c F v モノマー成分を連結することもよい。

10

【0472】

(実施例 2 9 : C R 0 1 1 - v c M M A E の最適化生産プロセス)

C R 0 1 1 A E は、プロテアーゼ切断性リンカーにより毒素オーリスタチンEに結合体化させた抗G P N M B (C G 5 6 9 7 2) 完全ヒト抗体C R 0 1 1 からなる抗体 - 医薬結合体である。抗体に対する毒素の比率は約4 . 0であるが、3 . 5 ~ 4 . 2の範囲であってよい。C R 0 1 1 抗体はI g G 2であるが、遊離のチオールを反応部位として用いて、1個の抗体分子あたり12個までの毒素分子を付加することができる。

【0473】

マレイミドコアプロリル - バリン - シトルリン - モノメチル - オーリスタチンE (v c M M A E) の構造を図21に示す。

20

【0474】

結合体化：V C M M A E が付着したC R 0 1 1 m A b からなる医薬 - 基質を作るプロセス。結合体化プロセスの概略を図22に要約する。

【0475】

簡単に説明すれば、C R 0 1 1 完全ヒト抗体の結合体化プロセスは、1) ダイアフィルトレーションによる緩衝液の交換とスクロースの除去、2) ジスルヒド還元、3) v c M M A E への結合体化、そして最後に、4) ダイアフィルトレーションによる結合体化C R 0 1 1 - v c M M A E の精製という4工程からなる。工程全体にわたって幾つかのアッセイ、すなわち、エルマンのアッセイおよびタンパク質濃度の決定等の工程内アッセイが存在する。プロセスの終わりに、医薬物質、すなわち結合体は、抗体に対する医薬の比率、遊離医薬の含量およびタンパク質濃度に関して分析する。

30

【0476】

原体抗体のダイアフィルトレーション：リン酸緩衝液p H 7 - 10%スクロースに最初に処方した原体抗体は緩衝液を結合体化緩衝液(ホウ酸塩、p H 9 . 0 - N a C l) になるまでダイアフィルトレーションによって10ダイア体積にわたって交換した。ダイアフィルトレーションの終わりに、C R 0 1 1 をおよそ5 . 5 m g / m L まで希釈し、1 . 2 および0 . 2 2 μ m からなる2フィルターのセットによりろ過した。スクロースは還元に干渉するので緩衝液の交換は必要である。さらに、高いp H はC R 0 1 1 の溶解性を高める。

40

【0477】

C R 0 1 1 還元 - 概論：C R 0 1 1 はI g G 2 アイソタイプ産物として作られ、ヒンジ部分に6ジスルヒド結合を含む。これらのジスルヒドは温和な条件下で還元されて12システイン残基を生じる。したがって、1抗体あたり最大12個のv c M M A E 医薬分子を付加することができる。しかし、このプロセスに関して、その目的は平均4個のv c M M A E 分子を有する結合体を作ることにあるので、原体抗体は部分的に還元されるだけである。その理由は二通りある。第一は、M M A E に関連する潜在的な全身毒性を減少させることにより治療濃度を広げるためである。第二に、疎水性医薬により付与される非常に低い溶解性のために、低い凝集で完全に充填された結合体を作るとは困難であり、ときには不可能であるためである。

50

【0478】

プロセス：トリス - (カルボキシエチル) - ホスフィンまたはTCPEPを、90RPMに設定した攪拌器を装備したジャケット付き反応器中でCR011に対する4:1のモル比(TCEP:mAb)で、およそ5.5mg/mLの濃度で加えた。反応を1mMEDTAの存在下、3時間、37で進めた。最後に、エルマンのアッセイを用いて遊離チオール量を決定した。典型的に、それは1抗体あたり4.2チオールであった。次に、反応器を4に冷却した。

【0479】

CR011結合体化 - 概説：TCPEPは還元中、完全に消費されなかった。残ったTCPEPはvcMMAEと反応することができた。しかし、この偽の副反応は、結合体化反応と比較して遅いものであり、過剰のvcMMAEを加えることにより軽減することができる。DTTと比較してTCPEPの利点は、残った還元剤の除去を必要としないことである。

10

【0480】

プロセス：vcMMAEをDMSOに溶解し、20%モル過剰で還元CR011mAbに加えた。反応物を1時間進めた。DMSOの最終濃度は4%(v/v)である。DMSOはこのプロセスで2つの目的を演じた。それは医薬を可溶化するために必要とされ、また結合体を可溶化することにも役立つ。結合体化の最後に、N-アセチルシステインを加えて未反応の医薬をクエンチした。

【0481】

CR011 - vcMMAE精製：反応器の温度を室温とした。40%のスクロース保存溶液を用いて最終スクロース濃度を10%(w/v)に調節した後、300mMヒスチジンHCl(pH5.0)緩衝液を用いて最終的にpH6.0とするpH調節を行なった。次に、10ダイア体積を用いて、20mMのヒスチジンpH6.0 - 10%スクロース(w/v)緩衝液へのダイアフィルトレーションにより、結合体を精製した。ダイアフィルトレーションの終わりに、結合体をおよそ7mg/mLまで濃縮し、1.2、0.45および最終的に0.22μmのフィルターからなる3フィルターのセットによりろ過した。

20

【0482】

CR011 - vcMMAE形成：結合体を、Tween-20を0.02%の最終濃度まで加え、処方緩衝液(20mMヒスチジン(pH6.0)、10%スクロース、0.02%Tween-20)を用いて6mg/mL(±10%)に希釈することにより処方した。次に、結合体を、2ロット以上が作られる場合、プールするまで(ステージングタイムとしても知られる)、4で保存した。プール後、最終的な濃度を5.0mg/mL(±5%)に調節し、医薬物質を冷凍保存した。

30

1. 前結合体化UF/DF：スクロースの除去

UF/DF中のスクロースの除去速度をエルマンアッセイによりモニターし、かつ1Abあたりの最大SH比を達成するために必要とされるダイア体積を予想するために、実験を行なった。

【0483】

CR011還元を妨げないレベルまでスクロースを除去するために、少なくとも6ダイア体積を実施することが望ましいことがわかった。構造安定性を保証するために、少なくとも10ダイア体積をプロセス中に利用しなければならない。

40

2. 結合体化反応における凝集に対するDMSO比率の効果

結合体化反応において、(1)凝集および(2)医薬：Abモル比(すなわち、結合体化の完全性)に対するDMSOの効果を決断するために実験を実施した。

【0484】

12%DMSOとの反応における凝集体の比率は15%DMSO、4.4%および3.0%のそれぞれにおけるよりも低いことがわかった。10%スクロースが処方緩衝液に含まれる場合、処方(pH9.0)緩衝液は(pH7.0)緩衝液に比較して凝集や収率に対して効果を持たなかった。10%、8%、6%および4%(v/v)DMSO反応物に

50

おける凝集体の比率はそれぞれ 2.7、1.7、1.0 および 0.5% であった。このことは、CR011 と CR011AE は、高い比率の DMSO が存在する場合に凝集化を非常に受けやすかったことを示唆する。

【0485】

すべての 4 種類の結合体化反応は、すべての 4 反応が完了したことを示唆する 4.0 医薬 / Ab の最終モル比をもたらした。結合体化反応における DMSO 比率の安全域は 4 ~ 6% である。これは 1% 以下の凝集レベルを生じると予想された。

5. vcMMAE に対する CR011 の結合体化中の副反応の研究

実験を行なって、(1) 不完全な結合体化と低医薬負荷をもたらす、マレイミド - 医薬を未反応副産物に変換する副反応の程度と速度論を調べ、(2) 副反応に影響を与える因子を決定し、(3) 古い vcMMAE ロット (SGD1006-0-04) が新しいロット (SGD1006-0-06) と比較して反応性が異なったかどうかを決定した。

【0486】

vcMMAE を 30 μ M の最終濃度で含む反応物 (100 μ l) を、(vcMMAE に対して) 2 倍モル過剰の TCCEP の存在下または不存在下のいずれかでホウ酸 (pH 9.0) 緩衝液中でインキュベートした。反応物を 0、2、7 または 15 分の時点で過剰な NAcCys によりクエンチした。コントロールは、15 分の時点でクエンチしたリン酸 (pH 7.0) 緩衝液中の vcMMAE からなった。それらのクロマトグラムを図 23 に示す。

【0487】

医薬添加の 15 分後の pH 7 リン酸緩衝液と 0 分後の pH 9.0 ホウ酸緩衝液中で、(rt = 9.0 時間) を有する単一 Cys クエンチ生成物が形成される (A と B を比較されたい)。ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) において、未反応副産物が時間依存的に形成される (rt = 9.2 分) (B、C、D および E)。 (CR011 結合体化条件におけるように) ホウ酸緩衝液中および TCCEP の存在下で、未反応性生成物の形成が触媒されて、わずか 2 分間のインキュベーション後にマレイミドのスクシンイミドへの > 90% 変換がもたらされた (F ~ I)。古い vcMMAE ロット (SGD-1006-0-06) と新しいロット (SGD-1006-0-04) の両方が、高い pH と TCCEP に対して類似する反応性ならびに類似の反応論を示した。

【0488】

図 24 は、未反応性生成物のスクシンイミジル - VCMAE としての LC-MS 同定を示す (rt = 9.2 分、m/z = 1318)。図 25 は TCCEP の存在下または不存在下でのスクシンイミドの形成の相対的な速度論を示す。

【0489】

結論：

副生成物は、pH 7.4 (PBS) の代わりに pH 9 で実施された結合体化の結果である。副生成物の形成は TCCEP の存在下で大きく増強させられる。主要な安定副生成物は LC-MS によりスクシンイミジル - vcMMAE と同定された。少数で安定性の低い副生成物は依然として同定されていない。vcMMAE の両ロットは類似した挙動を示した。

6. vcMMAE に対する CR011 の結合体化中の副反応の克服

大過剰の医薬を結合体化に提供することにより副反応が克服できるかどうかを調べるために実験を実施した。

【0490】

副反応を抑制する幾つかの方法が提案された：(1) 低い pH (例えば、9.0 の代わりに 8.5) での結合体化の実施 (CR011 の減少した溶解性による高いリスク)、(2) UF/DF による過剰な TCCEP の除去 (実用的ではない)、(3) 前もって加えられた過剰な VCMAE の上昇 (実用的)。

【0491】

前もって緩衝液を 50 mM ホウ酸 - 50 mM NaCl に交換した 100 mg の CR0

10

20

30

40

50

11をTCEPで還元して1Abあたり4.35遊離チオールを生成した。反応物を二等分した。最初の半分の50mgでは、1チオールあたり1医薬の比率に基づいて10%過剰のVCMAEを加えた。二番目の半分では、20%過剰を用いた。10mMヒスチジンpH6/10%スクロース溶液へと交換するUF/DFにより結合体を精製した。その結果を表60に要約する。

【0492】

表60. 1チオールあたりの1医薬の比率に基づき多様な過剰量のVCMAEを用いたCR011-VCMAE結合体の調製。Abに対する医薬の比率はRP HPLCにより決定した。

【0493】

【表60】

	VCMAEの過剰%	
	10	20
1AbあたりのSH	4.35	4.35
(反応における) Abに対する医薬の比率	3.9	4.1
(最終生成物における) Abに対する医薬の比率	3.7	4.0

結論

20%過剰に対する10%過剰のVCMAEの使用を100mg結合体化において比較した。さらに過剰のVCMAEは予測された値にさらに近いAbに対する医薬の比を与えたために、最適であると決定された。

【0494】

等価物

上述の説明および実施例は、抗体の一定の好ましい実施態様を詳細に示し、本発明の意図する最良の態様を説明する。しかし、上述のものが本文中にどのように詳細に説明されようと、ここに記載の抗体の製造方法および使用方法は多くの方法で実施され得るものであって、本発明は添付の請求の範囲とその等価物にしたがって理解されなければならない。前記の書かれた明細書は当業者がここに記載の明細書を実施することを可能とするには十分であると見なされる。

(配列表)

10

20

30

【数 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

SEQUENCE LISTING

<110> Curagen et. al. 10

<120> Antibodies Directed to GPNMB and Uses Thereof

<130> 21402-669-061 (Cura 969)

<150> US 60/632,023

<151> 2004-11-30

<150> US 60/733,779

<151> 2005-11-07

<160> 395

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 347

<212> DNA

<213> Homo sapiens 20

<400> 1

agggtgcagct gcaggagtcg ggcccaggac tggatgaagcc ttcggagacc ctgtccctca 60

cctgcactgt ctctggtgac tccatcagta attactactg gagctggatc cggcagcccc 120

caggggaaggy actggagtgg attgggtatt tctattacag tgggagcacc aactacaacc 180

cctccctcaa gactcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga 240

aactgagctc tgtgaccgct ggggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga gataggggct 300

gggctgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacagcc 347

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens 30

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 40

50 55 60

【数 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

10

Arg Asp Arg Gly Trp Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Ser Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

30

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

40

Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

【数3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

1 5 10 15

<210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Asp Arg Gly Trp Ala Asp Tyr
 1 5

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

<210> 10
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttttgt ctccagggga aagggccacc 60
 ctctcctgca gaaccagtca gattattagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ttcccaggct cctcatctat ggtggttcca gcagggccac tggcatocca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gctctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttattgtcag cagtatggta gctcgatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa acga 324

<210> 11
 <211> 108

【数4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

20

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

40

<210> 14
<211> 15

【数5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

20

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
1 5

30

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

40

【数6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 19
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agttttaatt actactggag ctggatccgc 120
caccacccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
tcccaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccttgacgc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300
tataactgga actactttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagcc 360

10

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 20
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
20 25 30
Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

20

30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21

40

【数7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

10

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 23

Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

30

<210> 25
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

【数 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 26

Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 28
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggto tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagttc 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggctccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaacga 327

<210> 29
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 29

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Asn
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

【数9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

10

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

20

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Asn Leu Val
 1 5 10

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 32

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

40

<210> 34
 <211> 32
 <212> PRT

【数 1 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

3

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr
1				5					10					15	

10

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Trp	Pro	Pro	Trp	Thr
1			5						10

20

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1			5						10	

<210> 37

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

```

atcaccttga aggagtctgg tctacgctg gtgaaaccca cacagaccct cacgctgacc      60
tgcacottct ctgggttctc actcagcgct ggtggagtgg gtgtgggctg gatccgtcag      120
ccccaggaa aggccttggg gtggcttcca ctcatttatt ggaatgatga taagcgctac      180
agcccatctc tgaggagcag gctcaccatc accaaggaca cctcoaaaaa ccagggtggc      240
cttacaatta ccaacatgga cctgtggac acagccacat attattgtgc acacagtcac      300
tatgattacg attgggggag ttactttgac tactggggcc aggaaccct ggtcacctgc      360
tcctcagcc                                     369

```

30

<210> 38

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

40

【数 1 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15

10

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Gly Gly
20 25 30

Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

Arg Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

20

Ala His Ser His Tyr Asp Tyr Asp Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 39
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15

30

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
20

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Phe Ser Leu Ser Ala Gly Gly Val Gly Val Gly
1 5 10

40

<210> 41
<211> 14

【数 1 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

10

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 43

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25 30

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 44

Ser His Tyr Asp Tyr Asp Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 46
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens

40

【数 1 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

```

<400> 46
gatatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcttg gatagtgatg atggaaacac ctatttggac 120
tggtaacctgc agaagccagg acagtcctca cagctcctga tctatacgcct ttcctatcgg 180
gcctctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaac 240
atcagcaggg tggaggctga ggatgttga gtttattact gcattgcaacg tatagagttt 300
cctatcacct tggccaagg gacacgactg gagattaaac ga 342

```

10

```

<210> 47
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 47
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

```

20

30

```

<210> 48
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48

```

40

【数 1 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

10

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15

Asp

20

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51

30

Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

40

<210> 53

【数 1 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr
1 5

10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 55
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgctaatt actactggac ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
tgcaaccocgt ccctcaagag tcgagttatc atatcagtag acaegtctaa gaaccagttc 240
tcocctgaagc tgagctctgt gactgcccgc gacacggccg tgtattactg tggagagggg 300
tataactgga actactttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctcctcagcc 360

20

<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Asn Pro Ser
50 55 60

30

40

【数 1 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

10

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 57
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
 20

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala Asn Tyr Tyr Trp Thr
 1 5 10

30

<210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 60

【数 17】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

10

<210> 61
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 62

Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

30

<210> 64
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 gatatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agcaacttag cctggtacca ggagagacct 120
 ggcaggctc ccagactcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtot 240
 gaagatcttg cagtttatta ctgtcagcag tataataagt ggcctccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat cgaacgaact 330

40

【数 1 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 65
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 65

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

20

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg
100 105

<210> 66
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 66

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

40

【数 1 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 68

Trp Tyr Gln Glu Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

20

<210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 71

Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg
1 5 10

40

<210> 73
<211> 378

【数 2 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
cagctgggtgg agtctggggg aggcgtggtc cagcctggga ggtcctgag actctcctgt 60
gcagcctctg gattcgctt cagtagctat ggcctgcact gggtcgcca ggctccaggc 120
aaggggctgg agtgggtggc agttatatca tatgatggaa ataataaata ctatgcagac 180
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatctgcaa 240
atgaacagcc tgagagctga ggacacggct gtgtattact gtgcgagaga tctagtggtt 300
cggggaatta ggggtacta ctactacttc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcacctct cctcagcc 378

10

<210> 74
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 74

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1 5 10 15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met
20 25 30

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val
35 40 45

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

30

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Asp Leu Val Val Arg Gly Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

40

<210> 75
<211> 23
<212> PRT

【数 2 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1 5 10 15

10

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

20

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30

Gly

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

40

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

【数 2 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

20 25 30

<210> 80
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 Asp Leu Val Val Arg Gly Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

<210> 82
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
 atctoctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctccctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggctct acaaactccg 300
 atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacga 339

<210> 83
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

10

20

30

40

【数 2 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

10

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

20

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

30

<210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

40

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

【数 2 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 87
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

20

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 91
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 91

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggteccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggacgtaa taaatactat 180

40

【数 2 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac ggggctgtgt attactgtgc gagagatccc 300
 tttgactatg gtgactcctt ctttgactac tggggccagg gcaccctggg caccgtctcc 360
 tcagcc 366

10

<210> 92
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

20

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

30

Ala Arg Asp Pro Phe Asp Tyr Gly Asp Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 93
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

40

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

【数 2 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

	20	25	
<210>	94		10
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	94		
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Ile His			
1	5		10
<210>	95		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	95		
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala			
1	5	10	20
<210>	96		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	96		
Val Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
1	5	10	15
Gly			
<210>	97		30
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	97		
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln			
1	5	10	15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
	20	25	30
<210>	98		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		40
<400>	98		

【数 2 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Asp Pro Phe Asp Tyr Gly Asp Ser Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

10

<210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 ctgactcagt ctccatcctc cctgtctgca tctgtaagag acagagtcac catcacttgc 60
 eggcgagtc aggacattag caattattta gcctgggtatc agcagaaaacc agggaaaagtt 120
 cctaactctcc tgatctatgc tgcatecact ttgcaatcag ggggcccatc tcggttcagt 180
 ggcagtgat ctgggacaga ttctactctc accatcagca gcctgcagcc tgaagatggt 240
 gcaacttatt actgtcaaaa gtataacagt gcccegetca ctttcggcgg agggaccaag 300
 gtgggatca aacga 315

20

<210> 101
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101

30

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
 1 5 10 15

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp
 20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
 35 40 45

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
 65 70 75 80

40

【数 2 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly
 85 90 95

10

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 102
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
 1 5 10 15

Thr Ile Thr Cys
 20

20

<210> 103
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 104

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Ala Ser Thr Leu Gln
 1 5

<210> 106
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

【数 2 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 106

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

10

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

20

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 109

<211> 366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 109

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgccaggct 120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtatta gtggtagtat cacacactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgga 300
gcagcagctg gtacggatgc ttttgatata tggggccacg ggacaaaggt caccgtctct 360
tcagcc 366

30

<210> 110

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

40

【数 3 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ile Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

His Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 111
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Thr
1 5 10

<210> 113
<211> 14
<212> PRT

10

20

30

40

【数 3 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<213> Homo sapiens

<400> 113

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

10

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Tyr Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ile Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Asp Gly Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

30

<210> 117

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Trp Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

40

<210> 118

【数 3 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 gagatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctatctgtgt ctccagggga cagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gaatggttagc agcaacttgg cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctttggt gcaccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccaccagcag cctacagctc 240
 gaagatattg cagtttatta ctgtcagcag taccattact ggcccacttt cggccctggg 300
 accaaagtgg atatcaaacg a 321

10

<210> 119
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 119
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Tyr Trp Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

30

<210> 120
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 120
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

【数 3 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

1	5	10	15	
Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys				10
	20			
<210> 121				
<211> 11				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 121				
Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Asn Leu Ala				
1	5	10		
<210> 122				
<211> 15				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 122				
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Phe				
1	5	10	15	
<210> 123				
<211> 7				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 123				
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr				
1	5			
<210> 124				
<211> 32				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 124				
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr				
1	5	10	15	
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys				
	20	25	30	
<210> 125				
<211> 8				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 125				

【数 3 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gln Gln Tyr His Tyr Trp Pro Thr
1 5

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 127
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 127
cagctggtgc agtctggggc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc 60
aaggctctctg gatacacctt caccggcttc tatatgcact gggtgcgaca gacccttggg 120
caagggccttg agtggatggg atggatcaac cctaacagtg gtggcacata ttatgtacag 180
aagtttcagg gcagggtcac catgaccagg gacacgtcca tcagcacagt ctacatggag 240
ctgagcaggt tgagatctga cgacacggcc gtatattact gtgcgagaga tgggtatagc 300
agtggagagg actggttcga cccctggggc cagggaaacc tggtcacagt ctcctcagcc 360

<210> 128
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
1 5 10 15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Tyr Met
20 25 30

His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
35 40 45

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Val Gln Lys Phe Gln Gly
50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr Met Glu
65 70 75 80

10

20

30

40

【数 3 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

10

Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Glu Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 129
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 129

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15

20

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20

<210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 130

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Tyr Met His
 1 5 10

<210> 131
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 131

Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Val Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

40

【数 3 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly

<210> 133
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133

10

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 134

20

Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Glu Asp Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 135

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

30

<210> 136
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtggtg gaaagacctt tttgtattgg 120
 tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtctt caaccggctc 180
 tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acaccttcg 300
 ctcactttcg gggaggggac caaggtggag atcaaacga 339

40

<210> 137

【数 3 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

10

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

20

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 138
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 138

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 139
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 139

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

【数 3 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

1	5	10	15	
<210>	140			10
<211>	15			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	140			
Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr				
1	5	10	15	
<210>	141			
<211>	7			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	141			
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser				20
1	5			
<210>	142			
<211>	32			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	142			
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr				
1	5	10	15	
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys				
	20	25	30	
<210>	143			30
<211>	9			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	143			
Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr				
1	5			
<210>	144			
<211>	11			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	144			
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg				40
1	5	10		

【数 3 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 145
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<400> 145
cagggtgcagc tggagcagtc ggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggc cctgagattc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggtggagtg ggtctcattc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaggac 300
tgggtgggag ctacctttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagcc 360

<210> 146
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 146
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Phe Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asp Trp Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

30

40

<210> 147
<211> 25

【数 4 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Phe Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn
1 5 10

20

<210> 149
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 150
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Phe Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30

Gly

<210> 151
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

40

【数 4 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 152

10

Glu Asp Trp Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 153
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 153

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

20

<210> 154
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 154
 gacattcagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgtc gggcgagtca gggcattagg aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagttc ctaagctcct gatctatgct gcttcogctt tgaaattagg ggtcccatct 180
 cgggttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaaag tataacagtg ccccgatcac cttegggcaa 300
 gggacacgac tggacattaa acga 324

30

<210> 155
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 155

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

40

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

【数 4 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Lys Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 10
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 156
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens 20

<400> 156

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 157 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 158
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 158

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens 40

【数 4 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 159

Ala Ala Ser Ala Leu Lys Leu
1 5

10

<210> 160
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 160

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 161

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 162

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg
1 5 10

30

<210> 163
<211> 396
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 163
caggtgcagc tggagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagaa cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctgggtgg ctccatcagc agtgggtggtt atttctggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggalt gggtagatct attacagtgg gaacacctac 180
tacaaccctg ccctcaagag tegagttacc atatcagttg acaagtetaa gaaccagttc 240
tccctgaaac tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagac 300
tattactatg atactagtgg tttttcctac cgttacgact ggtactacgg tatggacgtc 360

40

【数 4 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

tggggccaag ggaccacggt caccgctctcc tcagcc

396

<210> 164
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 164

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

20

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Arg Tyr
100 105 110

Asp Trp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

30

Val Ser Ser Ala
130

<210> 165
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 165

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

40

【数 4 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 166
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 166

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Trp Ser
1 5 10

<210> 167
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 167

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

20

<210> 168
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 168

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 169
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 169

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

30

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 170
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 170

Asp Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Arg Tyr Asp Trp Tyr
1 5 10 15

40

Tyr Gly Met Asp Val
20

【数 4 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 171
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 171

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 172
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 172
gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaaatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatactt acccgcgctt cggccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaag a 321

20

<210> 173
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 173

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

30

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

40

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Ala
85 90 95

【数 4 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 10

<210> 174
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 174

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 175

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 176
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 176

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15 30

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn
1 5

<210> 178
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens 40
<400> 178

【数 4 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

10

<210> 179
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 179

Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Ala
 1 5

<210> 180
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 180

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 181
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 181
 cagctggtgc agtctggagc agaagtgaaa aagcccgggg agtctctgaa gatctcctgt 60
 cagggttctg gatacatctt taccaactac tggatcggct gggtcgcca gatgccggg 120
 aaaggcctgg agtggatggg ggtcatctat cctgatgact ctgataccag atacagccc 180
 tccttccaag gccaggtcac catctcagcc gacaagtcca tcagcaccgc ctacctgcag 240
 tggagcagcc tgaaggcctc ggacaccgcc atatattact gtgcgagaca aaaatggcta 300
 caacaccctc ttgactactg gggccaggga acctgtgtca ccgtctctc agcc 354

30

<210> 182
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 182

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
 1 5 10 15

40

Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Trp Ile

【数 5 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

1 5 10

<210> 186
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 186

Val Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 187
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 187

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 188
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 188

Gln Lys Trp Leu Gln His Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 189
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10

<210> 190
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 190

【数 5 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

gaaattgtgt tgacgcagtc accaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
 ctctcatgca gggccagtc gagtgtagc agcagatact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggt cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcaetc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacga 327

10

<210> 191
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 191

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

20

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

30

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 192
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 192

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

40

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys
 20

【数 5 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 193
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 193
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 194
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 194
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

20

<210> 195
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 195
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 196
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 196
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 20 25 30

<210> 197
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 197
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
 1 5

40

【数 5 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 198

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 199
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 199
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagatttc 300
tttggttcgg ggagtctcct ctactttgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 360
tcctcagcc 369

20

<210> 200
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 200

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

30

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

40

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

【数 5 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ala Arg Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

10

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 201
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 201

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

20

<210> 202
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 202

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 203
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 203

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 204
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 204

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Asp

40

【数 5 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 205
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 205

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 206
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 206

Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 207
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 207

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 208
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

30

<400> 208
gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctctctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgggtg gaaagaccta tttgtattgg 120
tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
tctggagtgc cagatagggt cagtgccagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acaccttccg 300
ctcactttcg ggggaggac caaggtggag atcaaacga 339

<210> 209
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 5 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 209

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

10

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

20

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 210
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 210

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 211
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 211

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

40

【数 5 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 212
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 212

Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 213

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

20

<210> 214
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 214

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 215

Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 216
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 216

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

40

<210> 217
<211> 366

【数 5 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 217
cagggtgcagc tggagcagtc ggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt cggccaggct 120
ccaggcaagg ggtctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg atccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatgag 300
gaatactaet atgtttcggg gcttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcagcc 365

10

<210> 218
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 218
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Glu Glu Tyr Tyr Tyr Val Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

30

<210> 219
<211> 25
<212> PRT

40

【数 5 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<213> Homo sapiens

<400> 219

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 220

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly Met His
1 5 10

20

<210> 221

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 222

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

30

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 223

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

40

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

【数 6 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

	20	25	30												
<210>	224			10											
<211>	12														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	224														
Asp	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Gly	Leu	Asp	Tyr				
1			5						10						
<210>	225														
<211>	12														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	225														
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala				
1			5						10			20			
<210>	226														
<211>	315														
<212>	DNA														
<213>	Homo sapiens														
<400>	226														
ctgactcagt	ctocacctc	cctgtctgca	tctgtaagag	acagagtcac	catcacttgc	60									
cgggcgagtc	aggacattag	caattattta	gcctgggtatc	agcagaaaacc	agggaaagtt	120									
cctaactctcc	tgatctatgc	tgcatccact	ttgcaatcag	gggtcccato	tcggttcagt	180									
ggcagtggat	ctgggacaga	tttactctc	accatcagca	gcctgcagcc	tgaagatggt	240									
gcaacttatt	actgtcaaaa	gtataacagt	gccccgctca	ctttcggcgg	agggaccaag	300									
gtggagatca	aacga					315									
<210>	227														
<211>	105														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	227														
Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Arg	Asp	Arg	Val
1			5						10					15	
Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp
			20					25					30		
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala
			35				40						45		

【数 6 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

10

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
 65 70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 228
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 228

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
 1 5 10 15

Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 229
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 229

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

30

<210> 230
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 230

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 231
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 231

【数 6 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ala Ala Ser Thr Leu Gln
1 5

10

<210> 232
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 232

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 233

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 234

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

30

<210> 235
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 235
cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgacac ccacacagac cctcacgctg 60
acctgdacct tctctgggtt ctcactcagc actggtggaa tgggtgtggg ctggatccgt 120
cagccccag gaaaggccct ggactggctt acactcattt attggaatga tgataagcac 180
tacagcccat ctctgaagag caggcttacc atcaccaagg acacotcaa aaaccaggtg 240
gtccttagaa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cttattactg tgcacacctg 300
cattacgata ttttgactgg ttttaacttt gactactggg gccagggaa cctggtcacc 360
gtctctcag cc 372

40

【数 6 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 236
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 236

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Thr Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Asp
35 40 45

Trp Leu Thr Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

20

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Arg Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Leu His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Phe Asn Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

30

<210> 237
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 237

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Thr Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
20 25

<210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 6 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 238

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

10

<210> 239
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 239

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Asp Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 240
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 240

Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 241
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 241

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Arg
1 5 10 15

30

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25 30

<210> 242
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 242

Leu His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Phe Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 243
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 6 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 243

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

10

<210> 244
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 244
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcttg gatagtgatg atggaacac ctatttgac 120
tggtaacctgc agaagccagg gcagtctcca cagctcctga tctatacgct ttcctatcgg 180
gcctctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa 240
atcagcaggg tggaggctga ggatggttga gtttattact gcattgcaacg tatagagttt 300
ccgctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaac ga 342

20

<210> 245
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 245

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

30

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

40

Lys Arg

【数 6 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

10

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 251
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 251

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 252
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 252

20

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 253
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa is E or Q

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa is T or N

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa is A, F or G

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa is N or G

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa is Y or F

40

【数 6 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa is T or S 10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa is Q or H

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa is S or N

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa is C, S, or Y

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (65)..(65)
 <223> Xaa is I or T 20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa is K or T

<400> 253

Xaa Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Xaa Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15

Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Xaa 30

Trp Ile Arg Xaa His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr Tyr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 50 55 60

Xaa Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90

<210> 254
 <211> 12

【数 6 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is A, F, or G

10

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is N or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is T or S

20

<400> 254

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Xaa
1 5 10

<210> 255
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or N

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is C, S, or Y

<400> 255

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr Tyr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 256
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 7 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa is Y or F

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa is A or T

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa is N or Y

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa is A or V

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (64)..(64)
 <223> Xaa is D or G

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa is A or V

<400> 256

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Xaa Tyr Met
 20 25 30

30

His Trp Val Arg Gln Xaa Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 35 40 45

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Phe Gln Xaa
 50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Xaa Tyr Met Glu
 65 70 75 80

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

40

<210> 257
 <211> 10
 <212> PRT

【数 7 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Y or F

10

<400> 257

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Xaa	Tyr	Met	His
1				5					10

<210> 258

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is N or Y

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is A or V

<220>

<221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is D or G

<400> 258

Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Xaa	Tyr	Xaa	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

30

Xaa

<210> 259

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Y or D

40

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

【数 7 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<223> Xaa is Y or F

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Y or F

10

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Y or L

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Y or L

<400> 259

Xaa Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Xaa

1

5

20

<210> 260

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is K or T

<220>

<221> VARIANT

<222> (30)..(30)

<223> Xaa is T or A

<220>

<221> VARIANT

<222> (31)..(31)

<223> Xaa is S or G

30

<220>

<221> VARIANT

<222> (33)..(33)

<223> Xaa is M or V

<220>

<221> VARIANT

<222> (47)..(47)

<223> Xaa is D or E

<220>

<221> VARIANT

<222> (50)..(50)

<223> Xaa is A or T

40

<220>

<221> VARIANT

【数 7 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<222> (59)..(59)
<223> Xaa is R or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (65)..(65)
<223> Xaa is K or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (82)..(82)
<223> Xaa is T or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (83)..(83)
<223> Xaa is M or I

<400> 260

Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Xaa Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Xaa Gly
20 25 30

Xaa Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Xaa Trp
35 40 45

Leu Xaa Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Xaa Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

Xaa Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Xaa Xaa Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His

<210> 261
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is T or A

10

20

30

40

【数 7 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa is S or G

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa is M or V

<400> 261

Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Xaa Gly Xaa Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 262
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa is R or H

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa is K or R

<400> 262

Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Xaa Tyr Ser Pro Ser Leu Xaa Ser
 1 5 10 15

30

<210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa is Y or H

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is Y or F

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)

【数 7 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<223> Xaa is Y or N

<400> 263

Xaa Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Xaa Xaa
1 5

10

<210> 264

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is V or D

<400> 264

Tyr Asp Tyr Xaa Trp Gly Ser
1 5

20

<210> 265

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is V or E

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is E or Q

30

<220>

<221> VARIANT

<222> (30)..(30)

<223> Xaa is S or N

<220>

<221> VARIANT

<222> (31)..(31)

<223> Xaa is S or N

<220>

<221> VARIANT

<222> (34)..(34)

<223> Xaa is M or I

40

<220>

<221> VARIANT

<222> (53)..(53)

【数 7 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<223> Xaa is Y or F

<220>

<221> VARIANT

<222> (56)..(56)

<223> Xaa is S or R

10

<220>

<221> VARIANT

<222> (91)..(91)

<223> Xaa is T or A

<220>

<221> VARIANT

<222> (98)..(98)

<223> Xaa is R or K

<400> 265

Gln Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr
20 25 30

Gly Xaa His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Xaa Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

30

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Xaa

<210> 266

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is S or N

40

【数 7 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

10

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is M or I

<400> 266

Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Gly Xaa His
1 5 10

<210> 267
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or R

<400> 267

Val Ile Trp Xaa Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 268
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or L

<400> 269

40

Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Xaa
1 5

【数 7 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 269
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is Y or S

<400> 269

Asp Tyr Gly Asp Xaa
 1 5

<210> 270
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa is D or S

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa is S or Y

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa is S or T

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa is S or I

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa is T or I

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa is T or I

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa is Y or H

40

【数 7 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
<221> VARIANT
<222> (70)..(70)
<223> Xaa is I or M

10

<400> 270 .

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr
20 25 30

Xaa Met Xaa Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Xaa Ser Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20

Lys Gly Arg Phe Thr Xaa Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 271
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is D or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is S or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is S or T

40

【数 8 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 271

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa Met Xaa
1 5 10

10

<210> 272
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is T or I

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is T or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Y or H

<400> 272

Tyr Ile Ser Xaa Ser Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is I or G

40

<400> 273

【数 8 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Xaa Xaa Ala Ala Ala Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

10

<210> 274
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is V or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is E or Q

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)..(20)
<223> Xaa is F or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (50)..(50)
<223> Xaa is S or F

<400> 274

Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

30

Ser Leu Arg Xaa Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Xaa Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

40

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

【数 8 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

85	90	95	
Ala Arg			10
<pre> <210> 275 <211> 17 <212> PRT <213> Homo sapiens <220> <221> VARIANT <222> (1)..(1) <223> Xaa is S or F <400> 275 Xaa Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys 1 5 10 15 </pre>			
Gly			20
<pre> <210> 276 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens <220> <221> VARIANT <222> (1)..(1) <223> Xaa is G or D <220> <221> VARIANT <222> (2)..(2) <223> Xaa is I or W <400> 276 Xaa Xaa Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr 1 5 </pre>			
			30
<pre> <210> 277 <211> 96 <212> PRT <213> Homo sapiens <220> <221> VARIANT <222> (26)..(26) <223> Xaa is T or A </pre>			
			40

【数 8 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
<221> VARIANT
<222> (54)..(54)
<223> Xaa is S or N

10

<400> 277

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1 5 10 15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Gly Met
20 25 30

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val
35 40 45

Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
85 90 95

20

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is T or A

<400> 278

Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 279
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<220>
<221> VARIANT

【数 8 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or N

<400> 279

10

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is I or D

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is T or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is M or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is V or I

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is I or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is I or G

<400> 280

Xaa Xaa Xaa Val Arg Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 281
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 8 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa is G or D

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa is S or N

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa is I or F

<400> 281

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

20

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Xaa Ser Ile Ser Xaa Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Xaa Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

30

Arg

<210> 282
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is G or D

40

<220>
 <221> VARIANT

【数 8 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

10

<400> 282

Gly Xaa Ser Ile Ser Xaa Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 283
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is I or F

20

<400> 283

Tyr Xaa Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is S or D

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is S or R

<400> 284

Xaa Xaa Gly Trp Asp Tyr
1 5

<210> 285
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (21)..(21)
<223> Xaa is K or Q

40

【数 8 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa is S or I 10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa is S or N

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa is I or V

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa is G or D

<220>
 <221> VARIANT 20
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa is M or I

<400> 285

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
 1 5 10 15

Lys Ile Ser Cys Xaa Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Trp Ile
 20 25 30

Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa
 35 40 45

Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
 50 55 60

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

<210> 286
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 40

<220>

【数 8 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is S or I

10

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

<400> 286

Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 287
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is I or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is G or D

<400> 287

Xaa Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

30

<210> 288
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is R or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is L or H

40

【数 8 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 288

Xaa Trp Leu Gln Xaa Phe Asp Tyr
1 5

10

<210> 289

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Lys Arg Phe His Asp Val Leu Gly Asn Glu Arg Pro Ser Ala Tyr Met
1 5 10 15

Arg Glu His Asn Gln Leu Asn Gly Trp Ser Ser Asp Glu Asn Asp Trp
20 25 30

20

Asn Glu Lys Leu Tyr Pro Val Trp Lys Arg Gly Asp Met Arg Trp Lys
35 40 45

Asn Ser Trp Lys Gly Gly Arg Val Gln Ala Val Leu Thr Ser Asp Ser
50 55 60

Pro Ala Leu Val Gly Ser Asn Ile Thr Phe Ala Val Asn Leu Ile Phe
65 70 75 80

Pro Arg Cys Gln Lys Glu Asp Ala Asn Gly Asn Ile Val Tyr Glu Lys
85 90 95

Asn Cys Arg Asn Glu Ala Gly Leu Ser Ala Asp Pro Tyr Val Tyr Asn
100 105 110

30

Trp Thr Ala Trp Ser Glu Asp Ser Asp Gly Glu Asn Gly Thr Gly Gln
115 120 125

Ser His His Asn Val Phe Pro Asp Gly Lys Pro Phe Pro His His Pro
130 135 140

Gly Trp Arg Arg Trp Asn Phe Ile Tyr Val Phe His Thr Leu Gly Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Gln Lys Leu Gly Arg Cys Ser Val Arg Val Ser Val Asn Thr
165 170 175

40

Ala Asn Val Thr Leu Gly Pro Gln Leu Met Glu Val Thr Val Tyr Arg
180 185 190

【数 9 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Arg His Gly Arg Ala Tyr Val Pro Ile Ala Gln Val Lys Asp Val Tyr
195 200 205

10

Val Val Thr Asp Gln Ile Pro Val Phe Val Thr Met Phe Gln Lys Asn
210 215 220

Asp Arg Asn Ser Ser Asp Glu Thr Phe Leu Lys Asp Leu Pro Ile Met
225 230 235 240

Phe Asp Val Leu Ile His Asp Pro Ser His Phe Leu Asn Tyr Ser Thr
245 250 255

Ile Asn Tyr Lys Trp Ser Phe Gly Asp Asn Thr Gly Leu Phe Val Ser
260 265 270

Thr Asn His Thr Val Asn His Thr Tyr Val Leu Asn Gly Thr Phe Ser
275 280 285

20

Leu Asn Leu Thr Val Lys Ala Ala Ala Pro Gly Pro Cys Pro Pro Pro
290 295 300

Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Leu Ala Thr Thr
305 310 315 320

Leu Lys Ser Tyr Asp Ser Asn Thr Pro Gly Pro Ala Gly Asp Asn Pro
325 330 335

Leu Glu Leu Ser Arg Ile Pro Asp Glu Asn Cys Gln Ile Asn Arg Tyr
340 345 350

30

Gly His Phe Gln Ala Thr Ile Thr Ile Val Glu Gly Ile Leu Glu Val
355 360 365

Asn Ile Ile Gln Met Thr Asp Val Leu Met Pro Val Pro Trp Pro Glu
370 375 380

Ser Ser Leu Ile Asp Phe Val Val Thr Cys Gln Gly Ser Ile Pro Thr
385 390 395 400

Glu Val Cys Thr Ile Ile Ser Asp Pro Thr Cys Glu Ile Thr Gln Asn
405 410 415

Thr Val Cys Ser Pro Val Asp Val Asp Glu Met Cys Leu Leu Thr Val
420 425 430

40

【数 9 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Arg Arg Thr Phe Asn Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Val Asn Leu Thr Leu
 435 440 445

10

Gly Asp Asp Thr Ser Leu Ala Leu Thr Ser Thr Leu Ile Ser Val Pro
 450 455 460

Asp Arg Asp Pro Ala Ser
 465 470

<210> 290
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 290
 caccatggac tggcacctgg aggatc

26

20

<210> 291
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 291
 caccatggac tggacctgga gacatc

26

<210> 292
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 292
 caccatggac tggacctgga gggtc

25

<210> 293
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 293
 caccatggac tggatttga ggatc

25

40

【数 9 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 294			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> chemically synthesized primer			
<400> 294			
caccatggac acactttgct cacac		25	
<210> 295			
<211> 26			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> chemically synthesized primer			
<400> 295			
caccatggaa gttggggctg agctgg		26	20
<210> 296			
<211> 26			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> chemically synthesized primer			
<400> 296			
caccatggag ttgtggactg agctgg		26	
<210> 297			
<211> 26			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			30
<220>			
<223> chemically synthesized primer			
<400> 297			
caccatggag tttgggctgt agctgg		26	
<210> 298			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> chemically synthesized primer			
<400> 298			
caccatggaa ctggggctcc gctgg		25	40
<210> 299			

【数 9 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> chemically synthesized primer		
<400> 299		
caccatggag ttggggctgt gctgg	25	
<210> 300		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 300		
caccatggag ttttggctga gctgg	25	20
<210> 301		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 301		
caccatgacg gagtttgggc tgagc	25	
<210> 302		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> chemically synthesized primer		
<400> 302		
caccatgaaa gcacctgtgg ttcttc	26	
<210> 303		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 303		
caccatgaaa catctgtggt tcttc	25	40
<210> 304		
<211> 25		

【 数 9 4 】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer 10

<400> 304
caccatgggg tcaaccgcca tcctc 25

<210> 305
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 305
caccatgtct gtctccttcc tcctcttc 28

<210> 306 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 306
atgggggtccc aggttcacct c 21

<210> 307
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer 30

<400> 307
atggtgccaat cacaactcat tg 22

<210> 308
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 308
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30 40

```

【数 9 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

10

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 309
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 309
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc 300
 tttggttcgg ggagtctcct ctactttgac tactggggcc agggaacctt ggtcaccgtc 360
 tcctcagcc 369

30

<210> 310
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 310

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

40

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

【数 9 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

50	55	60	
Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
			10
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
	115	120	
<210> 311			
<211> 25			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			20
<400> 311			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser			
	20	25	
<210> 312			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 312			30
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His			
1	5	10	
<210> 313			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 313			
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			
1	5	10	
<210> 314			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			40

【数 9 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 314

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

10

Asp

<210> 315

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 315

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

20

<210> 316

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 316

Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 317

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 317

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 318

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 318

gatattgtga tgaccagac tccaactctct ctgtcogtea ccoctggaca gcgggctcc 60

atctcctgca agtctagtea ggcctcctg catagtggg gaaagaceta tttgtattgg 120

tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcagga cagatttcac actgaaaatc 240

40

【数 9 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

```

agccgggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaagtat acaccttccg      300
ctcacttttcg gcgaggggac caaggtggag atcaaacga                                339

```

10

```

<210> 319
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 319

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

```

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
                20           25           30

```

```

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
          35           40           45

```

20

```

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

```

```

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
          85           90           95

```

```

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100           105           110

```

Arg

30

```

<210> 320
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 320

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

```

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
                20

```

40

```

<210> 321
<211> 16

```

【数 9 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 321

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

10

<210> 322
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 322

Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 323
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 323

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

20

<210> 324
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 324

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

30

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 325
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 325

Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 326
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

【数 1 0 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 326

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

10

<210> 327

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized primer

<400> 327

gaattcagag ttaaacccttg ag

22

<210> 328

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> chemically synthesized primer

<400> 328

caggaatctg atctgttacc ac

22

<210> 329

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized primer

<400> 329

ctgaccctac aagatgcaa gag

23

30

<210> 330

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized primer

<400> 330

atcatgcatt gcaacattta ttgatggag

29

<210> 331

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

【数 1 0 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<223> chemically synthesized primer		
<400> 331		
ttggcagatt gtctgtagcc	20	10
<210> 332		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 332		
aggcattgtg catgctgctt	20	
<210> 333		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 333		
tattgaaagt gccgagatcc	20	
<210> 334		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 334		
tgcaaggacc acagccatc	19	30
<210> 335		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> chemically synthesized primer		
<400> 335		
tcaatggaac cttcagcctt a	21	
<210> 336		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> chemically synthesized primer		

【数 1 0 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 336 gaaggggtgg gttttgaag	19	
		10
<210> 337 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> chemically synthesized primer		
<400> 337 ctcactgtga aagctgcagc accag	25	
<210> 338 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> chemically synthesized primer		20
<400> 338 tcaatggaac cttcagcctt a	21	
<210> 339 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> chemically synthesized primer		
<400> 339 gaaggggtgg gttttgaag	19	
		30
<210> 340 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> chemically synthesized primer		
<400> 340 ctcactgtga aagctgcagc accag	25	
<210> 341 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> chemically synthesized		40

【数 1 0 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 341
 tgatcagtaa ggatttcacc tctgtttga 30

<210> 342
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<400> 342
 accttgatcat gtaccatcaa taaagtaccc 30

<210> 343
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 343
 Ala Thr Thr Leu Lys Ser Tyr Asp Ser Asn Thr Pro 20
 1 5 10

<210> 344
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<400> 344
 Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala 30
 1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
 20 25

<210> 345
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 345
 tctcttctc ctgtactct ggctccaga taccaccggt gaaatagtga tgaacgagtc 60

<210> 346
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

【数 1 0 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <223> chemically synthesized primer

 <400> 346
 ccggaattct tactatttgt catcatcgtc cttataatcg cttagctgagg agacggg 57 10

<210> 347
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

 <400> 347
 acgcgtcgac ccaccatgga agcccagcg cagcttctct tctctctgct actctggctc 60

<210> 348
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> chemically synthesized primer

 <400> 348
 tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccggg gaaatagtga tgacgcagtc 60

<210> 349
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

 <400> 349
 ccggaattct tactatttgt catcatcgtc cttataatcg cttagctttca gctccag 57 30

<210> 350
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

 <400> 350
 acgcgtcgac ccaccatgga agcccagcg cagcttctct tctctctgct actctggctc 60

<210> 351
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

【数 1 0 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 351
 actctggctc ccagatacca ccggagaaat agtgatgacg cagtctccag ccacc 55 10

<210> 352
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 352
 ccgctcgagc tatttgteat catcgtectt ataatctttc agctccagct t 51

<210> 353
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> chemically synthesized primer

<400> 353
 tcttcgagc caccatggaa accccagcgc agcttctctt cctctcgcta ctctggctcc 60
 cagataccac cgga 74

<210> 354
 <211> 852
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> chemically synthesized primer 30

<400> 354
 atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctctgca gggccagtca gagtggtgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattccacca gggccactgg tatcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagctc 300
 gaagatcttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggctccgtg gacgttggc 360
 caagggacca aggtggaaat caaactttcc ggggacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag 420
 aaagatgacg ctaagaaagâ cgatgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtcg 480
 ggcccaggac tggatgaagcc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctggtggc 540 40
 tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc acccccagc gaagggcctg 600

【数 1 0 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

gagtggattg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaaccogtc cctcaagagt 660
 cgagttacca tatkagtaga cacgtctaag aaccagttct cctgacgct gagctctgtg 720
 actgcccggg acacggccgt gtattactgt gcgagagggt ataactggaa ctactttgac 780
 tactggggcc agggaacct ggtcaccgtc tcctcagcta gcgattataa ggacgatgat 840
 gacaaatagt aa 852

10

<210> 355
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 355

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

20

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

30

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
 130 135 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

40

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
 165 170 175

【数 1 0 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
180 185 190

10

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
195 200 205

Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
210 215 220

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
225 230 235 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
245 250 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

20

Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
275 280

<210> 356
<211> 1617
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 356
atggaagccc cagcgcagct tctcttctct ctgctaactt ggctcccaga taccaccggt 60
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggte tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagtct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgtg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaat caaactttcc gccgacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag 420
aaagatgacg ctaagaaaga cgatgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtgc 480
ggcccaggac tggatgaagc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctgggtggc 540
tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc accaccagg gaagggcctg 600
gagtggattg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaacccgct cctcaagagt 660

30

40

【数 1 0 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

cgagttacca tatcagtaga cacgtctaag aaccagttct ccctgacgct gagctctgtg 720
actgccgcgg acacggccgt gtattactgt gcgagagggg ataactggaa ctactttgac 780
tactggggcc agggaacctt ggtcacccgc tcctcaggag gtgggtggatc cgatatcaaa 840
ctgcagcagt caggggctga actggcaaga cctggggcct cagtgaagat gtcttgaag 900
actttctggct acacctttac taggtacacg atgcactggg taaaacagag gcctggacag 960
ggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtgggt ataactaatta caatcagaag 1020
ttcaaggaca aggccacatt gactacagac aaatcctcca gcacagccta catgcaactg 1080
agcagcctga catctgagga ctctgcagtc tattactgtg caagatatta tgatgatcat 1140
tactgccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcact ttccgaggac 1200
gatgcaaaaa aggatgctgc gaagaaagat gacgctaaga aagacgatgc taaaaaggac 1260
ctggacattc agctgacca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 1320
accatgacct gcagagccag ttcaagtgta agttacatga actggtaacca gcagaagtca 1380
ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaag tggcttcttg agtcccttat 1440
cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct 1500
gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcgggtgct 1560
gggaccaagc tggagctgaa agctagcgtat tataaggacg atgatgacaa atagtaa 1617

10

20

<210> 357
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

30

<400> 357

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

40

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

【数 1 0 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
 130 135 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 180 185 190

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 195 200 205

Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 210 215 220

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
 225 230 235 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
 245 250 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 275 280 285

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr
 290 295 300

Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
 305 310 315 320

10

20

30

40

【数 1 1 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn
325 330 335

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser
340 345 350

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
355 360 365

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp
370 375 380

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp
385 390 395 400

Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp
405 410 415

Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
420 425 430

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
435 440 445

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
450 455 460

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr
465 470 475 480

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
485 490 495

Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
500 505 510

Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ala
515 520 525

Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
530 535

<210> 358
<211> 1677
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

【数 1 1 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<220>
 <223> chemically synthesized

<400> 358

atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggtcccaga taccacegga	60	10
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	120	
ctctcctgca gggccagtc gagtggtgac aacaacttag tctggtagca gcagaaacct	180	
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcateccaca gggccactgg tatcccagcc	240	
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccacagtag tctgcagctc	300	
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggctccgtg gacgttcggc	360	
caagggacca aggtggaat caaactttcc gcggacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag	420	
aaagatgacg ctaagaaaga cgtgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtgc	480	
ggcccaggac tgggtgaagcc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctgggtggc	540	20
tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc accaccagg gaaggcctg	600	
gagtggttg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaaccctc cctcaagagt	660	
cgagttacca tatcagtaga cactctaaag aaccagttct ccctgacgct gagctctgtg	720	
actgccgagg acacggccgt gtattactgt gogagagggg ataactggaa ctactttgac	780	
tactggggcc agggaacctt ggtcacctgc tctctcattat cagcggatga cgcacaagaaa	840	
gacgcagcca aaaaggacga tgcaaaagag gatgacgcaa agaaagattt agatatcaaa	900	
ctgcagcagc caggggctga actggcaaga cctggggcct cagtgaagat gtcctgcaag	960	
actttctggc acacctttac taggtacacg atgcactggg taaaacagag gcctggacag	1020	
gggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtgggt ataactaatta caatcagaag	1080	30
ttcaaggaca aggcacatt gactacagac aaatcctcca gcacagccta catgcaactg	1140	
agcagcctga catctgagga ctctgcagtc tattactgtg caagatatta tgatgatcat	1200	
tactgccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcact ttccgcggac	1260	
gatgcgaaaa aggatgctgc gaagaaagat gacgctaaga aagacgatgc taaaaaggac	1320	
ctggacattc agctgaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc	1380	
accatgacct gcagagccag ttcaagtgtg agttacatga actggtacca gcagaagtca	1440	
ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaag tggttctctg agtcccttat	1500	
cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct	1560	
gaagatgctg ccaacttatta ctgccaaacg tggagtagta acccgtcac gttcgggtgt	1620	40
gggaccaagc tggagctgaa agattataag gacgatgatg acaaatagct cgagcgg	1677	

【数 1 1 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 359
<211> 555
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 359

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

20

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

30

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
130 135 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
165 170 175

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
180 185 190

40

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
195 200 205

【数 1 1 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
210 215 220

10

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
225 230 235 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
245 250 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
275 280 285

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser
290 295 300

20

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
305 310 315 320

Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
325 330 335

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
340 345 350

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
355 360 365

30

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
370 375 380

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
385 390 395 400

Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
405 410 415

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
420 425 430

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
435 440 445

40

【数 1 1 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
450 455 460

10

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
465 470 475 480

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
485 490 495

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
500 505 510

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
515 520 525

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
530 535 540

20

Glu Leu Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
545 550 555

<210> 360
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 360

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

40

Cys Ala His Arg

【数 1 1 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

100

<210> 361
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 361

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 362
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 362

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

40

【数 1 1 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

10

Ala Arg

<210> 363
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 363

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30

Ala Lys

<210> 364
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 364

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

40

【数 1 1 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 365
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 365

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 366
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

20

30

40

【数 1 1 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 366

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

20

Arg

<210> 367

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 367

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

30

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

40

【数 1 1 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ala Arg

<210> 368
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 368

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60

20

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
 100

<210> 369
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 369

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

40

【数 1 2 0】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 370
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 370

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro
85 90 95

<210> 371
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 371

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

10

20

30

40

【数 1 2 1】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

10

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 372
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 372

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

20

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

30

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 373
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 373

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

40

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

【数 1 2 2】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			10
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser			
	85	90	95
Ile Gln Leu Pro			
	100		
<210> 374			
<211> 95			
<212> PRT			20
<213> Homo sapiens			
<400> 374			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp			
	20	25	30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			30
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro			
	85	90	95
<210> 375			
<211> 17			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 375			
ggtataactg gaacgac			17
<210> 376			
<211> 20			40

【数 1 2 3】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 376		
ggtatagtgaggctactac	20	10
<210> 377		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 377		
gtattactatggttcgggga gttattataa c	31	
<210> 378		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 378		
gtattatgat tacgtttggg ggagttatcg ttatacc	37	20
<210> 379		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 379		
gtattactat gatagtagtg gttattacta c	31	
<210> 380		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 380		
gtattacgat attttgactg gttattataa c	31	30
<210> 381		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 381		
tgactacggg gactac	16	
<210> 382		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 382		
gtagagatgg ctacaattac	20	40

【数 1 2 4】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<210> 383
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 10

<400> 383
 gggatatagca gcagctggta c 21

<210> 384
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 384
 gggatatagca gtggctggta c 21

<210> 385
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 20

<400> 385
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 386
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 386
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 387 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 387
 Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 388
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 388 40
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15

【数 1 2 5】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Thr Val Ser Ser
20

10

<210> 389
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 389

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 390
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 390

20

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 391
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 391

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 392
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 392

30

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 393
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 393

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

40

<210> 394

【数 1 2 6】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 394

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220

10

20

30

40

【数 1 2 7】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 395
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

20

30

40

【数 1 2 8】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

<400> 395

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

20

Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

30

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

40

【数 1 2 9】

WO 2006/071441

PCT/US2005/043482

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

10

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

20

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

30

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

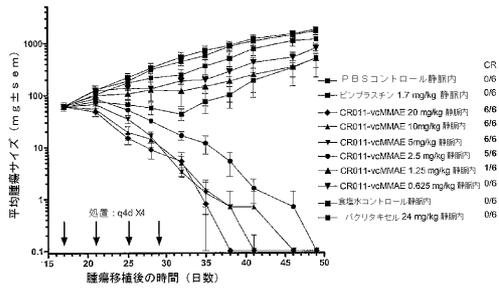
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

40

【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2

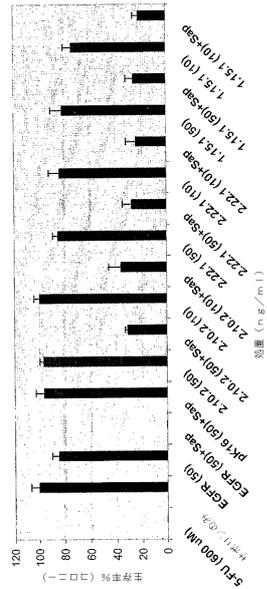


Figure 2

【 図 3 】

Figure 3

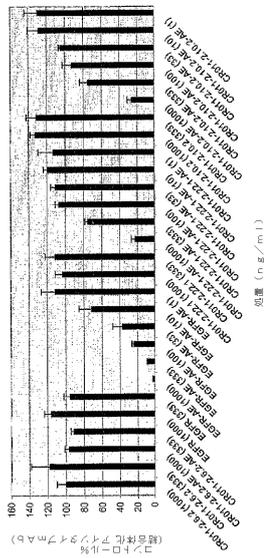
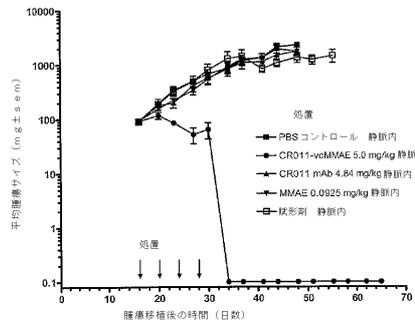


Figure 3

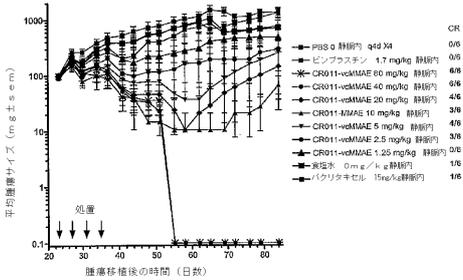
【 図 4 】

Figure 4



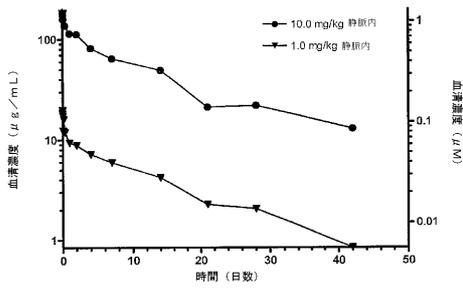
【 図 5 】

Figure 5



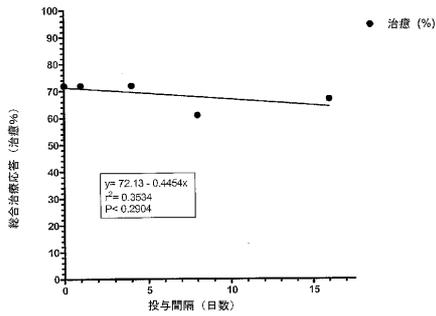
【図 6】

Figure 6



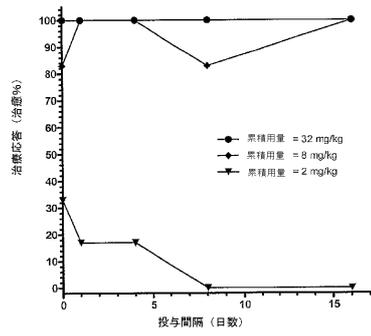
【図 7】

Figure 7



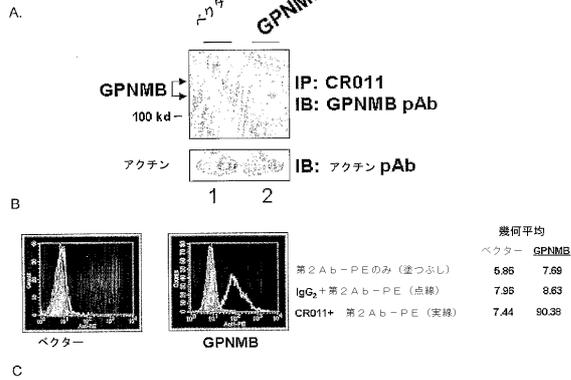
【図 8】

Figure 8



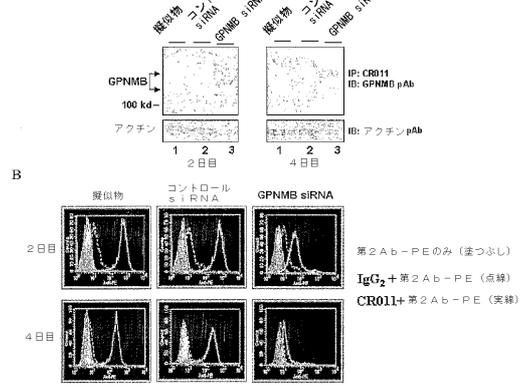
【図 9】

Figure 9

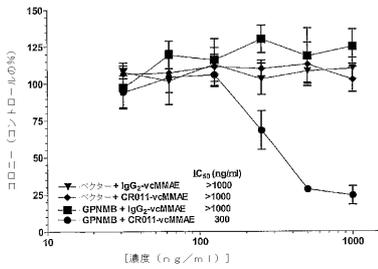


【図 10】

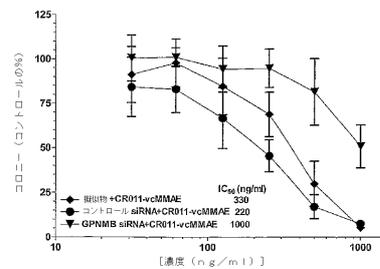
Figure 10



C



C



【 図 1 1 】

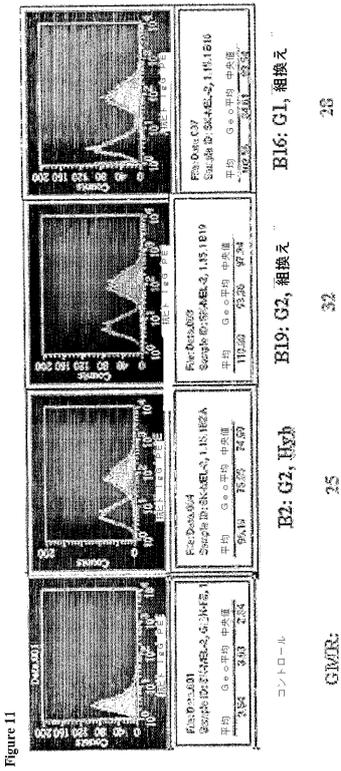
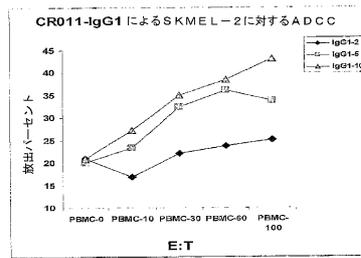


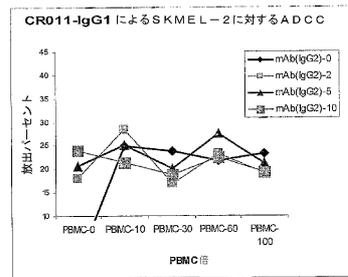
Figure 11

【 図 1 2 】

Figure 12 A.



B.

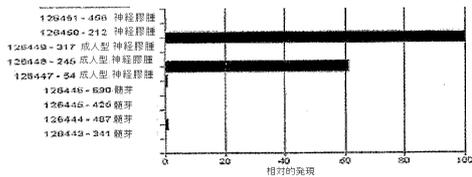


【 図 1 3 - 1 】

Figure 13 A.

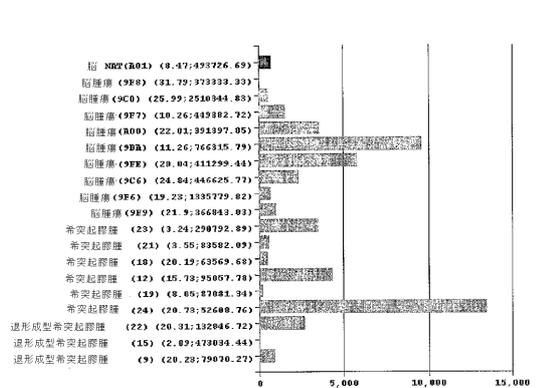
9402_2R_03 CNS	57.11	10.34%
9410_2R_03 CNS / 神経膠腫	54.55	17.9%
9411_2R_03 CNS / 神経膠芽腫	53.22	5%
9412_2R_03 神経膠芽腫	35.79	1.9%
9479_2R_11 転移性神経芽細胞腫	31.78	0%
9471_2R_03 CNS / 神経膠芽腫	59.55	1.7%
神経膠芽腫 / 星細胞腫 U37-MC	22.96	12.3%
神経膠芽腫 / 星細胞腫 U-138-MC	23.85	9.9%
星細胞腫 SW1783	29.63	2%
転移性神経芽細胞腫 SK-N-SH	27.93	6%
星細胞腫 SP-229	22.1	24.4%
星細胞腫 SKNS-73	25.33	3.6%
神経膠腫 NITE-19	26.48	1.6%
神経膠腫 U251	25.44	3.3%
神経膠腫 SP-229	24.01	9.9%

B.



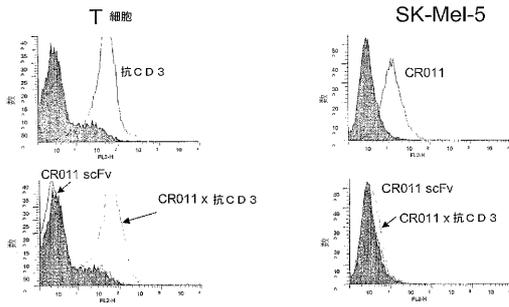
【 図 1 3 - 2 】

Figure 13 C.



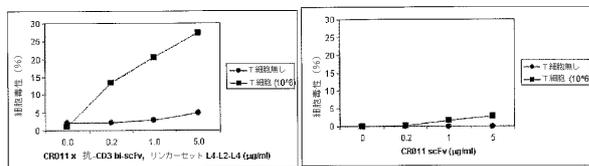
【 図 19 】

Figure 19



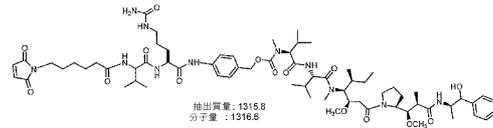
【 図 20 】

Figure 20



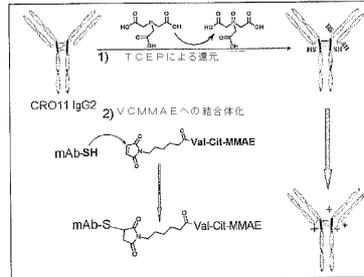
【 図 21 】

Figure 21



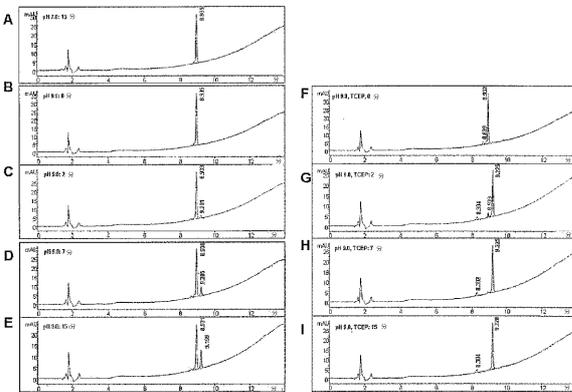
【 図 22 】

Figure 22



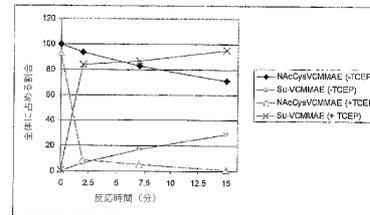
【 図 23 】

Figure 23



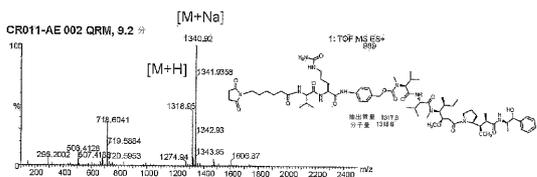
【 図 25 】

Figure 25



【 図 24 】

Figure 24



【配列表】

0006334496000001.app

フロントページの続き

- (51) Int. Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 G 0 1 N 33/53 V
 G 0 1 N 33/53 Y
- (72)発明者 フェン シャオ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 7 , ユニオン シティ , レッド シーダー レーン 1 3 5
- (72)発明者 シャオ - チ チア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 3 4 , ロサンゼルス , エス . ビバリー ドライブ 2 2 6 2
- (72)発明者 メイナ リャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 9 , フレモント , ミッション リッジ コート 1 1 1
- (72)発明者 オリト フォード
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4 , フォスター シティ , ケイマン レーン 7 1 2
- (72)発明者 スコット クラカンブ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 8 , フレモント , ショパン テラス 1 1 6 0 ナンバー 3 0 1
- (72)発明者 チェ カム ファイ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 1 , クリントン , ハード ブリッジ ロード 7 アpartment ナンバー 1
- (72)発明者 ビンセント エー . ボラック
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 3 3 5 - 1 7 1 4 , ゲールズ フェリー , ヴィネガーヒル ロード 5 5
- (72)発明者 ルカ ラステリ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 7 , ギルフォード , ペパーブッシュ レーン 5 2
- (72)発明者 ジョン ハーマン
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 1 2 , ボセル , 1 9 2 エヌディー ストリート エス . イー . 2 2 0 1 ナンバーシー 4
- (72)発明者 ヘンリ リシェンステン
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 7 , ギルフォード , グリーンブライヤー ドライブ 8 8
- (72)発明者 マイケル イー . ジェファーズ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 0 5 , ブランフォード , フラックス ミル ハロウ 1 4
- (72)発明者 ウィリアム ジェイ . ラロシェレ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 4 3 , マディソン , デボンシャー レーン 1 5
- (72)発明者 グルシャン アラ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 7 2 , ノースフォード , サニーサイド ドライブ 4 0
- (72)発明者 ピーター メゼス
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 3 7 1 , オールド ライム , クラークス レーン 7
- (72)発明者 アンドレイ シャポバル
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 4 , タウソン , ベルサイユ サークル 1 3 5 アpartment ピー
- (72)発明者 キュロス カルカリア

- アメリカ合衆国 コネチカット 06405, ブランフォード, ランフィアーズ コウブ ロード 23
- (72)発明者 マイケル トーゴフ
アメリカ合衆国 コネチカット 06457, ミドルタウン, ウエスト ワインド テラス 45
- (72)発明者 ファン ダバグニノ
アメリカ合衆国 コネチカット 06443, マディソン, ワーパス ロード 185

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 KUAN CHIEN-TSUN, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, #5607, 2003, Vol.44, P.1116-1117
Cancer Metastasis Reviews. 1999, Vol.18, No.4, p.421-425
Biomolecular Engineering. 2001, Vol.18, No.2, p.31-40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq
PubMed

专利名称(译)	针对GPNMB的抗体及其应用		
公开(公告)号	JP6334496B2	公开(公告)日	2018-05-30
申请号	JP2015214189	申请日	2015-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	塞尔德克斯医疗公司 安进框架蒙特公司		
申请(专利权)人(译)	细胞指数Therapeutics公司 弗里蒙特安进公司		
当前申请(专利权)人(译)	细胞指数Therapeutics公司 弗里蒙特安进公司		
[标]发明人	フェンシャオ シャオチチア メイナリャン オリトフォード スコットクラカンブ チェカムファイ ビンセントエーポラック ルカラステリ ジョンハーマン ヘンリリシエンステン マイケルイージェファーズ ウィリアムジェイラロシエレ グルシャンアラ ピーターメゼス アンドレイシャポバル キュロスカルカリア マイケルトーゴフ ファンダバグニノ		
发明人	フェン シャオ シャオ-チ チア メイナ リャン オリト フォード スコット クラカンブ チェ カム ファイ ビンセント エー. ポラック ルカ ラステリ ジョン ハーマン ヘンリ リシエンステン マイケル イー. ジェファーズ ウィリアム ジェイ. ラロシエレ グルシャン アラ ピーター メゼス アンドレイ シャポバル キュロス カルカリア マイケル トーゴフ ファン ダバグニノ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53		

CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6849 A61K47/6851 A61K2039/505 A61K2039/545 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/2809 C07K16/30 C07K16/3053 C07K16/3061 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/62 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/77 C07K2317/94 C07K2317/565
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A A61K39/395.T A61K39/395.N A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.V G01N33/53.Y A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.L A61P25/00 A61P43/00.105 A61P43/00.121 C07K16/46 C12N1/21 C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/00 C12P21/08
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024 /GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065 /BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZB072 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/CC24 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085 /GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74
優先権	60/632023 2004-11-30 US 60/733779 2005-11-07 US
其他公开文献	JP2016026210A
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了特异性结合GPNMB的完全人单克隆抗体及其用途。摘要：重链和轻链免疫球蛋白分子，特别是包含对应于跨越框架区和/或互补决定区(CDR)的连续重链和轻链序列的序列的氨基酸序列并编码它们提供核苷酸序列。本发明还提供了包含抗GPNMB抗体的免疫缀合物和使用这种免疫缀合物的方法。此外，本发明提供了包含抗GPNMB抗体组分和抗CD3组分的双特异性抗体以及使用这种双特异性抗体的方法。[选图]图1

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6334496号 (P6334496)
(45) 発行日 平成30年5月30日(2018.5.30)	(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)	
(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
(21) 出願番号 特願2015-214189 (P2015-214189)	(73) 特許権者 510122326	
(22) 出願日 平成27年10月30日(2015.10.30)	セルゲックス セラピューティクス イン	
(62) 分割の表示 特願2013-214392 (P2013-214392)の分割	コーボレイテッド	
原出願日 平成17年11月30日(2005.11.30)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02	
(65) 公開番号 特開2016-26210 (P2016-26210A)	494-2725、ニューダム、フォー	
(43) 公開日 平成28年2月12日(2016.2.12)	ス アベニュー 119	
審査請求日 平成27年10月30日(2015.10.30)	(73) 特許権者 507175061	
(31) 優先権主張番号 60/632,023	アムジェン フレモント、 インコーポレ	
(32) 優先日 平成16年11月30日(2004.11.30)	イテッド	
(33) 優先権主張国 米国(US)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 945	
(31) 優先権主張番号 60/733,779	55、 フレモント、 カイザー ドライ	
(32) 優先日 平成17年11月7日(2005.11.7)	ブ 6701	
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100107489	
	弁理士 大塚 竹志	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 GPNMBに対する抗体およびその使用		