(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-63812
(P2016-63812A)
(43)公開日　平成28年4月28日(2016.4.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B063
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
C12N 5/09	(2010.01)	C12N	5/09		4C076

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 274 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-208374 (P2015-208374)
(22)出願日　平成27年10月22日 (2015.10.22)
(62)分割の表示　特願2012-503679 (P2012-503679)の分割
原出願日　平成22年3月31日 (2010.3.31)
(31)優先権主張番号　61/211,695
(32)優先日　平成21年4月1日 (2009.4.1)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/266,972
(32)優先日　平成21年12月4日 (2009.12.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/166,217
(32)優先日　平成21年4月2日 (2009.4.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　１
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　エルキンズ，　クリスティ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　メープル　アベニュー　５２４
(72)発明者　ポルソン，　アンドリュー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１３１，　サンフランシスコ，　バークレー　ウェイ　２８１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＦｃＲＨ５抗体および免疫接合体および使用方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】哺乳類における造血系腫瘍の治療に有用な抗ＦｃＲＨ５抗体の提供。
【解決手段】（ａ）以下を含む抗ＦｃＲＨ５抗体：（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡを含むＨＶＲ－Ｌ１（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴを含むＨＶＲ－Ｌ２（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴを含むＨＶＲ－Ｌ３（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳを含むＨＶＲ－Ｈ１（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲを含むＨＶＲ－Ｈ２又は（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹを含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列；並びに（ｂ）少なくとも１つの変異体ＨＶＲであって、上記配列の少なくとも１つの残基の修飾を含む、変異体ＨＶＲ。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）以下を含む抗ＦｃＲＨ５抗体：
（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号２６）を含むＨＶＲ－Ｌ１
（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴ（配列番号２７）を含むＨＶＲ－Ｌ２
（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴ（配列番号２８）を含むＨＶＲ－Ｌ３
（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳ（配列番号３５）を含むＨＶＲ－Ｈ１
（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲ（配列番号３６）を含むＨＶＲ－Ｈ２
（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹ（配列番号３７）を含むＨＶＲ－Ｈ３
からなる群から選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列；ならびに
（ｂ）少なくとも１つの変異体ＨＶＲであって、、配列番号２６、２７、２８、３５、３６または３７で示される配列の少なくとも１つの残基の修飾を含む、変異体ＨＶＲ。
【請求項２】
前記フレームワーク配列の少なくとも一部がヒト共通フレームワーク配列である請求項１記載の抗体。
【請求項３】
前記修飾が置換、挿入または欠失である請求項１記載の抗体。
【請求項４】
配列番号３６の配列を有するＨＶＲ－Ｈ２を含む請求項１記載の抗体。
【請求項５】
ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミ抗体の一価親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項６】
ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の一価親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項７】
ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の一価親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項８】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるようなその二価型で、軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミ抗体の親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項９】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるようなその二価型で、軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１０】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むその二価型のネズミまたはキメラ抗体の親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。

【請求項１１】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．４ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１２】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．４ｎＭ±．０４である請求項１１記載のヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１３】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．２ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１４】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．２ｎＭ±．０２である請求項１３記載のヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１５】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．５ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１６】
ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．５ｎＭ±０．１である請求項１５記載のヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項１７】
結合親和力がＫｄ値として表される請求項５～１６のいずれかに記載に抗体。
【請求項１８】
結合親和力がＢｉａｃｏｒｅまたはラジオイムノアッセイにより測定される請求項５～１６のいずれかに記載の抗体。
【請求項１９】
ヒトκ亜群１共通フレームワーク配列を含む請求項１記載の抗体。
【請求項２０】
重鎖ヒト亜群ＩＩＩ共通フレームワーク配列を含む請求項１記載の抗体。
【請求項２１】
細胞傷害性物質と接合された場合に、ヒト化抗体が腫瘍細胞増殖を防止するヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体。
【請求項２２】
ヒト化抗体およびキメラ抗体がともに一価または二価である前記全請求項に記載の抗体。
【請求項２３】
ヒト化抗体およびキメラ抗体がともにＦｃ領域に連結される単一Ｆａｂ領域を含む前記全請求項に記載の抗体。
【請求項２４】
図１１で示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列（配列番号３５～３７）を含む重鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項２５】
可変ドメインが、図１１で示されるＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣ（配列番号３１～３４）を含む請求項２４記載の抗体。
【請求項２６】
抗体が図１１で示されるＣＨ１および／またはＦｃ配列（配列番号３８および／または３９）を含む請求項２４または２５記載の抗体。
【請求項２７】
図１１で示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列（配列番号２６～２８）を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項２８】
可変ドメインが、図１１で示されるＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび

／またはＦＲ４－ＬＣ（配列番号２２～２５）を含む請求項２７記載の抗体。
【請求項２９】
抗体が図１１で示されるＣＬ１配列（配列番号２９）を含む請求項２７または２８記載の抗体。
【請求項３０】
図１０で示される配列（配列番号２１）を含むポリペプチド。
【請求項３１】
図９で示される配列（配列番号１９）を含むポリペプチド。
【請求項３２】
（ａ）請求項２４～２６のいずれかに記載の重鎖可変ドメインおよび請求項２７～２９のいずれかに記載の軽鎖可変ドメインを含む抗体を発現する細胞を培養するプロセス；ならびに
（ｂ）前記培養細胞から抗体を単離するプロセス
により製造される抗体。
【請求項３３】
請求項２４～２６のいずれかに記載の重鎖可変ドメインおよび請求項２７～２９のいずれかに記載の軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項３４】
抗体が一価であり、Ｆｃ領域を含む請求項３３記載の抗体。
【請求項３５】
配列番号１９から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項３６】
配列番号２１から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項３７】
配列番号３１、３２、３３および３４から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項３８】
配列番号２２、２３、２４および２５から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項３９】
配列番号３１、３２、３３および３４から選択されるアミノ酸と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項４０】
配列番号２２、２３、２４および２５から選択されるアミノ酸と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む請求項１記載の抗体。
【請求項４１】
配列番号２１から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む請求項３５記載の抗体。
【請求項４２】
配列番号１９から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む請求項３６記載の抗体。
【請求項４３】
ＦｃＲＨ５に結合する抗体であって、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項４４】
ＦｃＲＨ５に結合する抗体であって、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％

の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項４５】
ＦｃＲＨ５に結合する抗体であって、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項４６】
請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
【請求項４７】
請求項４６記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項４８】
請求項４７記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項４９】
抗ＦｃＲＨ５抗体の製造方法であって、（ａ）前記抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適した条件下で真核生物細胞およびＣＨＯ細胞を含む群から選択される宿主細胞を培養すること；ならびに（ｂ）前記抗体を単離することを包含する方法。
【請求項５０】
配列番号２１として示されるアミノ酸配列；または前記アミノ酸配列に基づいた共通配列または変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体に関するエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する抗体。
【請求項５１】
配列番号１９として示されるアミノ酸配列；または前記アミノ酸配列をに基づいた共通配列または変異体配列を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体に関するエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する請求項５０記載の抗体。
【請求項５２】
ＦｃＲＨ５が細胞の表面で発現される請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体。
【請求項５３】
細胞がＢ細胞である請求項５２記載の抗体。
【請求項５４】
Ｂ細胞がＢ細胞増殖性障害に関連する請求項５３記載の抗体。
【請求項５５】
Ｂ細胞増殖性障害が癌である請求項５４記載の抗体。
【請求項５６】
Ｂ細胞増殖性障害が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される請求項５５記載の抗体。
【請求項５７】
モノクローナル抗体である請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体。
【請求項５８】
Ｆａｂ、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖまたは$(Fab')_2$断片である請求項５７記載の抗体。
【請求項５９】
ヒト化されている請求項５７記載の抗体。
【請求項６０】
配列番号２１の重鎖可変ドメインおよび配列番号１９の軽鎖可変ドメインを含む抗体と同一のエピトープに結合する請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体。
【請求項６１】

細胞傷害性物質と共有結合される請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体を含む免疫接合体。
【請求項６２】
細胞傷害性物質が、毒素、化学療法薬、薬剤部分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される請求項６１記載の免疫接合体。
【請求項６３】
式Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）$_p$（式中：（ａ）Ａｂは請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体であり；（ｂ）Ｌはリンカーであり；（ｃ）Ｄは薬剤部分である）を有する請求項６２記載の免疫接合体。
【請求項６４】
Ｌが、６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、４－（２－ピリジルジチオ）酪酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＰＤＢ）およびＮ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）から選択される請求項６３記載の免疫接合体。
【請求項６５】
Ｄが、マイタンシノイド、アウリスタチンおよびドロスタチンからなる群から選択される請求項６３記載の免疫接合体。
【請求項６６】
請求項６３記載の免疫接合体および製薬上許容可能な担体を含む薬学的組成物。
【請求項６７】
ＦｃＲＨ５を発現する細胞の増殖の抑制方法であって、前記細胞を請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体と接触させ、それにより前記細胞の増殖の阻害を生じることを包含する方法。
【請求項６８】
前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項６７記載の方法。
【請求項６９】
前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項６７記載の方法。
【請求項７０】
癌を有する対象の治療方法であって、有効量の請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体を対象に投与することを包含する方法。
【請求項７１】
癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される請求項７０記載の方法。
【請求項７２】
前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項７０記載の方法。
【請求項７３】
前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項７０記載の方法。
【請求項７４】
対象における増殖性障害の治療方法であって、有効量の請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体を対象に投与することを包含する方法。
【請求項７５】
前記増殖性障害が癌である請求項７４記載の方法。
【請求項７６】
前記癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性Ｎ

ＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される請求項７５記載の方法。

【請求項７７】

前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項７４記載の方法。

【請求項７８】

前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項７４記載の方法。

【請求項７９】

前記細胞の増殖が、少なくとも部分的に、ＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている細胞の増殖の抑制方法であって、前記細胞を有効量の請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体と接触させ、それにより前記細胞の増殖を抑制することを包含する方法。

【請求項８０】

前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項７９記載の方法。

【請求項８１】

前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項７９記載の方法。

【請求項８２】

哺乳類において腫瘍を治療的に処置する方法であって、前記腫瘍の増殖が、少なくとも部分的に、ＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている方法であり、前記細胞を有効量の請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体と接触させることを包含する方法。

【請求項８３】

前記腫瘍が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫と関連する請求項８２記載の方法。

【請求項８４】

前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項８２記載の方法。

【請求項８５】

前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項８２記載の方法。

【請求項８６】

免疫接合体のＦｃＲＨ５への結合を許容する条件下で請求項６４記載の免疫接合体に細胞を曝露することを包含するＢ細胞増殖の抑制方法。

【請求項８７】

Ｂ細胞増殖が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される請求項８６記載の方法。

【請求項８８】

Ｂ細胞が異種移植片である請求項８６記載の方法。

【請求項８９】

曝露がin vitroで行なわれる請求項８６記載の方法。

【請求項９０】

曝露がin vivoで行なわれる請求項８６記載の方法。

【請求項９１】

ＦｃＲＨ５を含有することが推測される生物学的試料中のＦｃＲＨ５の存在の確定方法であって、前記試料を請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体に曝露すること、ならびに前記抗体と前記試料中のＦｃＲＨ５との結合を確定することを包含し、ここで、前記抗体の前記試料中のＦｃＲＨ５への結合が前記試料中の前記タンパク質の存在を示す方法。

【請求項９２】
生物学的試料が、Ｂ細胞増殖性障害を有することが疑われる患者からである請求項９１記載の方法。
【請求項９３】
Ｂ細胞増殖性障害が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される請求項９２記載の方法。
【請求項９４】
請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体を、ＦｃＲＨ５を発現する細胞に結合させる方法であって、前記細胞を請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体に接触させることを含む方法。
【請求項９５】
前記抗体が細胞傷害性物質と接合される請求項９４記載の方法。
【請求項９６】
前記抗体が増殖阻害剤と接合される請求項９４記載の方法。
【請求項９７】
１つ以上の遊離システインアミノ酸を含むシステイン操作された抗体であって、親抗体の１つ以上のアミノ酸残基を遊離システイン残基で置き換えること包含するプロセスにより調製されるシステイン操作された抗体（ここで、親抗体は請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体である）。
【請求項９８】
１つ以上の遊離システインアミノ酸が、０．６～１．０の範囲のチオ反応性値を有する請求項９７記載の抗体。
【請求項９９】
チオ反応性試薬に関して親抗体より反応性である請求項９７記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１００】
当該プロセスがさらに、システイン操作された抗体をチオール反応性試薬と反応させることによりシステイン操作された抗体のチオール反応性を確定することを包含する請求項９７記載のシステイン操作された抗体であって、チオール反応性試薬に関して親抗体より反応性であるシステイン操作された抗体。
【請求項１０１】
１つ以上の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖中に位置する請求項９７記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０２】
細胞傷害性物質と共有結合されるシステイン操作された抗体を含む免疫接合体である請求項９７記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０３】
細胞傷害性物質が、毒素、化学療法薬、薬剤部分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される請求項１０２記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０４】
抗体が、捕捉標識、検出標識または固体支持体に共有結合される請求項９７記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０５】
抗体がビオチン捕捉標識に共有結合される請求項１０４記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０６】
抗体が蛍光染料検出標識に共有結合される請求項１０４記載のシステイン操作された抗

体。
【請求項１０７】
蛍光染料が、フルオレセイン型、ローダミン型、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびその類似体から選択される請求項１０６記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０８】
抗体が、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔおよび^{213}Ｂｉから選択される放射性核種検出標識に共有結合される請求項１０４記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１０９】
キレートリガンドにより検出標識に共有結合される請求項１０４記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１１０】
キレートリガンドが、ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡから選択される請求項１０９記載のシステイン操作された抗体。
【請求項１１１】
アルブミン結合ペプチドを含む請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体。
【請求項１１２】
アルブミン結合ペプチドが配列番号２４６～２５０から選択される請求項１１１記載の抗体。
【請求項１１３】
請求項１、３３、４１、１６４または１６５記載の抗体である親抗体中の、カバット番号付け規約による軽鎖の１つ以上の位置およびカバット番号付け規約による重鎖の１つ以上の位置、ならびにＥＵ番号付け規約による重鎖の１つ以上の位置に１つ以上の遊離システインアミノ酸を含むシステイン操作された抗体。
【請求項１１４】
モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体から選択される請求項１１３記載の抗体。
【請求項１１５】
抗体断片である請求項１１３記載の抗体。
【請求項１１６】
抗体断片がＦａｂ断片である請求項１１５記載の抗体。
【請求項１１７】
キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体から選択される請求項１１３記載の抗体。
【請求項１１８】
細菌中で産生される請求項１１３記載の抗体。
【請求項１１９】
ＣＨＯ細胞中で産生される請求項１１３記載の抗体。
【請求項１２０】
ＦｃＲＨ５タンパク質を含有することが推測される試料中の前記タンパク質の存在を確定する方法であって、前記試料を請求項１０９記載の抗体に曝露すること、そして前記試料中の前記ＦｃＲＨ５タンパク質との前記抗体の結合を確定することを包含する方法であって、ここで、抗体と前記タンパク質との結合が前記試料中の前記タンパク質の存在を示す方法。
【請求項１２１】
前記試料が、前記ＦｃＲＨ５タンパク質を発現することが推測される細胞を含む請求項１２０記載の方法。
【請求項１２２】

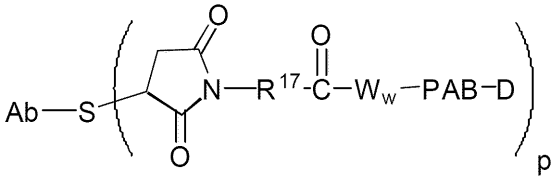
前記細胞がＢ細胞である請求項１２０記載の方法。
【請求項１２３】
抗体が、蛍光染料、放射性同位体、ビオチンまたは金属錯化リガンドから選択される標識に共有結合される請求項１２０記載の方法。
【請求項１２４】
請求項１１３記載の抗ＦｃＲＨ５抗体、および製薬上許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的処方物。
【請求項１２５】
アウリスタチンまたはマイタンシノイド薬剤部分に共有結合されて、それにより抗体薬剤接合体が形成される請求項１１３記載の抗体。
【請求項１２６】
抗体（Ａｂ）、およびアウリスタチンまたはマイタンシノイド薬剤部分（Ｄ）を含む請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体であって、システイン操作された抗体が１つ以上の遊離システインアミノ酸を介して、リンカー部分（Ｌ）によりＤに結合され；当該化合物が式Ｉ：

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

（式中、ｐは１、２、３または４である）
を有する抗体－薬剤接合体。
【請求項１２７】
ｐが２である請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１２８】
Ｌが次式を有する請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物であり：

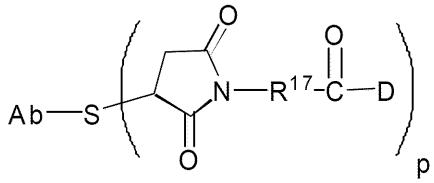
$$A_a-W_w-Y_y-,$$

式中、Ａは、システイン操作された抗体（Ａｂ）のシステインチオールと共有結合されるストレッチャー単位であり；
ａは、０または１であり；
Ｗは、各々独立して、アミノ酸単位であり；
ｗは、０～１２の範囲の整数であり；
Ｙは、薬剤部分と共有結合されるスペーサー単位であり；そして
ｙは、０、１または２である、
抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１２９】
次式を有する請求項１２８記載の抗体－薬剤接合体化合物であり：

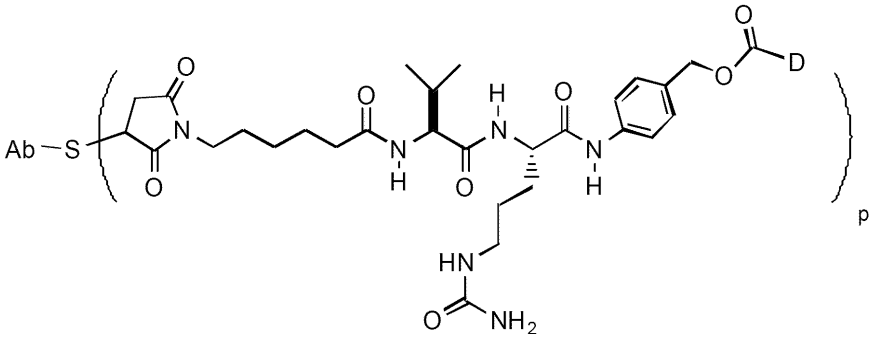


式中、ＰＡＢは、パラ－アミノベンジルカルバモイルであり、そしてＲ^{17}は、$(CH_2)_r$、C_3－C_8カルボシクリル、O-$(CH_2)_r$、アリーレン、$(CH_2)_r$-アリーレン、-アリーレン-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-（C_3－C_8カルボシクリル）、（C_3－C_8カルボシクリル）-$(CH_2)_r$、C_3－C_8ヘテロシクリル、$(CH_2)_r$-（C_3－C_8ヘテロシクリル）、-（C_3－C_8ヘテロシクリル）-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-および-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2)_r$-から選択される二価ラジカルであって、ここで、Ｒ^{b}は、Ｈ、C_1－C_6アルキル、フェニルまたはベンジルであり；

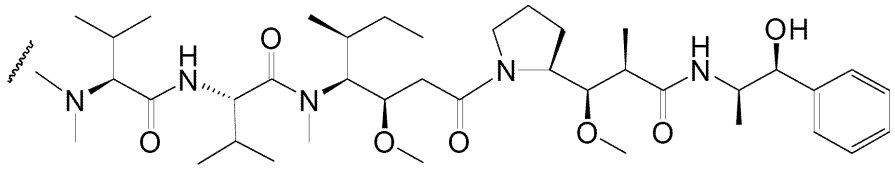
ｒは、独立して、１～１０の範囲の整数である、
抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１３０】
W_wがバリン－シトルリンである請求項１２８記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１３１】
R^{17}が$(CH_2)_5$または$(CH_2)_2$である請求項１２８記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１３２】
次式を有する請求項１２８記載の抗体－薬剤接合体化合物：



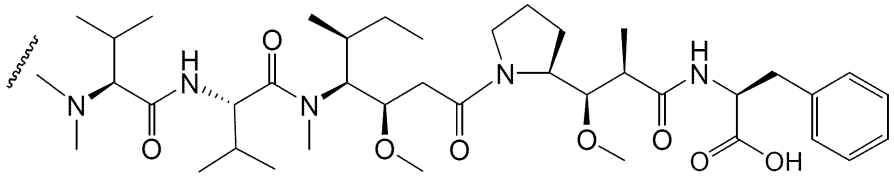
【請求項１３３】
R^{17}が$(CH_2)_5$または$(CH_2)_2$である請求項１３２記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１３４】
次式を有する請求項１２８記載の抗体－薬剤接合体化合物：



【請求項１３５】
ＬがＳＭＣＣ、ＳＰＰ、ＳＰＤＢまたはＢＭＰＥＯである請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１３６】
Ｄが、以下の構造を有するＭＭＡＥである請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物：

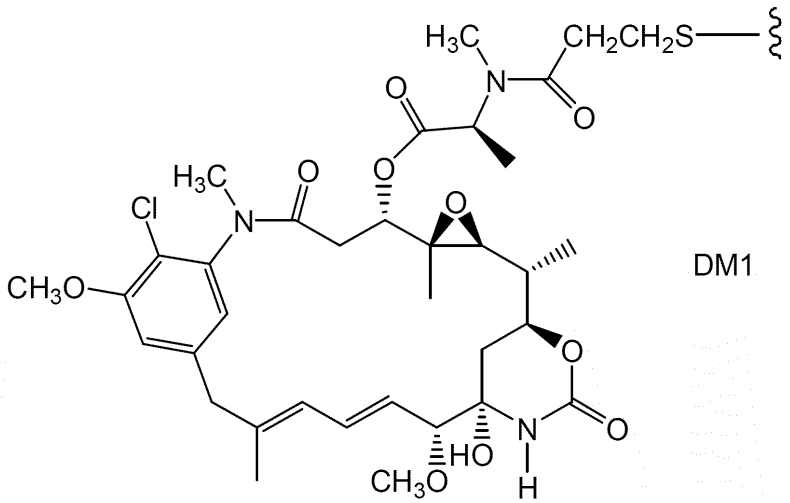


（式中、波線はリンカーＬとの結合部位を示す）。
【請求項１３７】
Ｄが、以下の構造を有するＭＭＡＦである請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物：

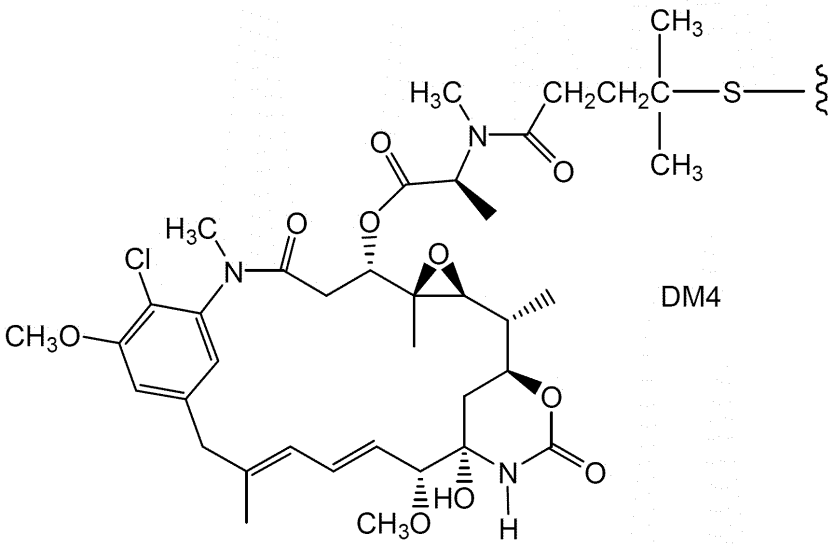


（式中、波線はリンカーＬとの結合部位を示す）。

【請求項１３８】
Ｄが、以下の構造を有するＤＭ１またはＤＭ４である請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体化合物：

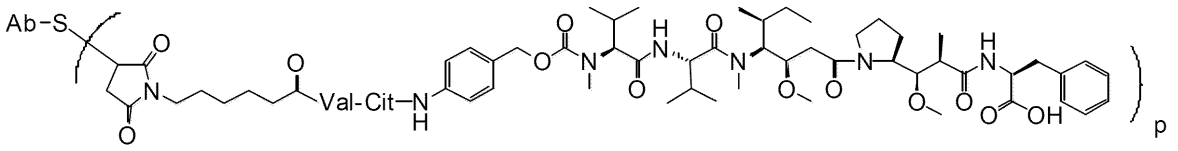


DM1

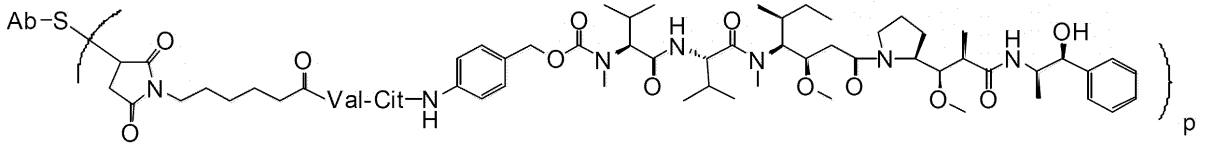


DM4

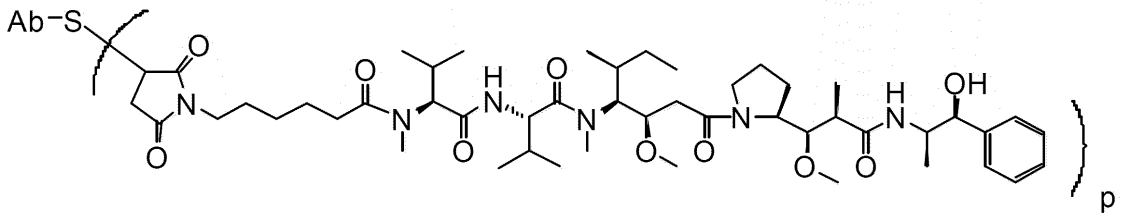
（式中、波線はリンカーＬとの結合部位を示す）。
【請求項１３９】
抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および抗体断片から選択される請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１４０】
抗体断片がＦａｂ断片である請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体化合物。
【請求項１４１】
以下の構造式から選択される抗体－薬剤接合体化合物であって：



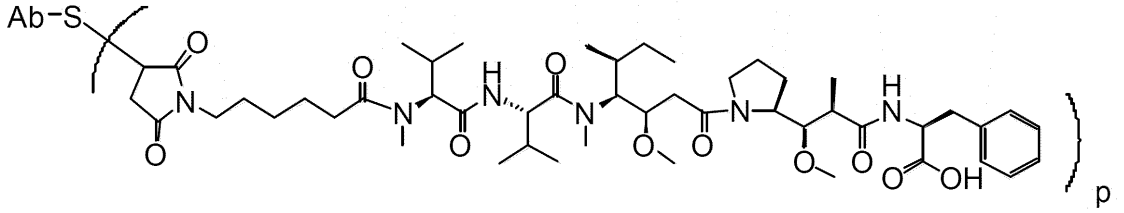
Ａｂ-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ



Ａｂ-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ



Ａｂ-ＭＣ-ＭＭＡＥ



Ａｂ-ＭＣ-ＭＭＡＦ

式中、Ｖａｌはバリンであり；Ｃｉｔはシトルリンであり；ｐは１、２、３または４であり；Ａｂは請求項１１３記載の抗体である、
抗体－薬剤接合体化合物。

【請求項１４２】

アウリスタチンがＭＭＡＥまたはＭＭＡＦである請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体。

【請求項１４３】

ＬがＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢまたはＭＣである請求項１２６記載の抗体－薬剤接合体。

【請求項１４４】

（ａ）請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体化合物に細胞を曝露することと；
（ｂ）抗体－薬剤接合体化合物の細胞への結合の程度を確定すること
を包含するＢ細胞を検出するための検定。

【請求項１４５】

請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体化合物を用いて細胞培地中の哺乳類癌性Ｂ細胞を処置し、それにより癌性Ｂ細胞の増殖が抑制されることを包含する細胞増殖の抑制方法。
【請求項１４６】
請求項１２５記載の抗体－薬剤接合体化合物、および製薬上許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的処方物。
【請求項１４７】
請求項１４６記載の薬学的処方物を患者に投与することを包含する癌の治療方法。
【請求項１４８】
癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される請求項１４７記載の方法。
【請求項１４９】
患者が、抗体－薬剤接合体化合物と組合せて細胞傷害性物質を投与される請求項１４７記載の方法。
【請求項１５０】
請求項１４６記載の薬学的処方物；
容器；および
ＦｃＲＨ５ポリペプチドの過剰発現により特徴づけられる癌を治療するために当該化合物が用いられることを示す包装挿入物またはラベル
を包含する製品。
【請求項１５１】
癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される請求項１５０記載の製品。
【請求項１５２】
請求項１１３記載の抗ＦｃＲＨ５抗体（Ａｂ）、およびアウリスタチンまたはマイタンシノイド薬剤部分（Ｄ）を含む抗体－薬剤接合体であって、抗体が１つ以上の操作されたシステインアミノ酸を介して、リンカー部分（Ｌ）によりＤに結合され；当該化合物が式Ｉ：

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

（式中、ｐは１、２、３または４である）
を有する抗体－薬剤接合体の製造方法であって、
（ａ）抗体の操作されたシステイン基をリンカー試薬と反応させて抗体－リンカー中間体Ａｂ－Ｌを形成することと；
（ｂ）Ａｂ－Ｌを活性化薬剤部分Ｄと反応させて、それにより抗体－薬剤接合体が形成されるステップ
を包含するか、あるいは
（ｃ）薬剤部分の求核性基をリンカー試薬と反応させて、薬剤－リンカー中間体Ｄ－Ｌを形成することと；
（ｄ）Ｄ－Ｌを抗体の操作されたシステイン基と反応させて、それにより抗体－薬剤接合体を形成するステップ
を包含する方法。
【請求項１５３】
チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞中で抗体を発現するステップをさらに包含する請求項１５２記載の方法。
【請求項１５４】

還元剤で発現抗体を処理するステップをさらに包含する請求項１５２記載の方法。
【請求項１５５】
還元剤がＴＣＥＰおよびＤＴＴから選択される請求項１５４記載の方法。
【請求項１５６】
還元剤で処理後に、酸化剤で発現抗体を処理するステップをさらに包含する請求項１５４記載の方法。
【請求項１５７】
酸化剤が、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸および空気から選択される請求項１５６記載の方法。
【請求項１５８】
配列番号４２のいずれか一つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む請求項１１３記載の抗体。
【請求項１５９】
配列番号４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖配列、および配列番号４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６０】
配列番号４４のいずれか一つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６１】
配列番号４３のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖配列、および配列番号４４のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖配列を含む請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６２】
請求項１、３３、４１、１６４または１６５のいずれかに記載の抗体を含む組成物。
【請求項１６３】
担体を含む請求項１６２記載の組成物。
【請求項１６４】
ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、配列番号２０から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号１８から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項１６５】
ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、配列番号１３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号１１から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体。
【請求項１６６】
システインが軽鎖の位置２０５にある請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６７】
システインが重鎖の位置１１４にある請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６８】
システインが重鎖の位置４００にある請求項１１３記載の抗体。
【請求項１６９】
Ｂ細胞が形質細胞障害に関連する請求項５３記載の抗体。
【請求項１７０】
形質細胞障害が癌である請求項１６９記載の抗体。
【請求項１７１】
形質細胞障害が、意義未確定のモノクローナル高ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）、高分子グロブリン血症、重鎖疾患、全身性軽鎖アミロイドーシス（ＡＬ）、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫、多発性孤立性形質細胞腫、形質細胞白血病、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病から選択される請求項１７０

記載の抗体。
【請求項１７２】
前記細胞を有効量の別の治療薬と接触させることをさらに包含する請求項６７記載の方法。
【請求項１７３】
有効量の別の治療薬を対象に投与することをさらに包含する請求項７０記載の方法。
【請求項１７４】
有効量の別の治療薬を対象に投与することをさらに包含する請求項７４記載の方法。
【請求項１７５】
前記細胞を有効量の別の治療薬と接触させることをさらに包含する請求項７９記載の方法。
【請求項１７６】
前記細胞を有効量の別の治療薬と接触させることをさらに包含する請求項８２記載の方法。
【請求項１７７】
前記細胞を有効量の別の治療薬に曝露することをさらに包含する請求項８６記載の方法。
【請求項１７８】
有効量の別の治療薬を患者に投与することをさらに包含する請求項１４７記載の方法。
【請求項１７９】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７２記載の方法。
【請求項１８０】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１７９記載の方法。
【請求項１８１】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７３記載の方法。
【請求項１８２】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１８１記載の方法。
【請求項１８３】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７４記載の方法。

【請求項１８４】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１８３記載の方法。
【請求項１８５】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７５記載の方法。
【請求項１８６】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１８５記載の方法。
【請求項１８７】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７６記載の方法。
【請求項１８８】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１８７記載の方法。
【請求項１８９】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７７記載の方法。
【請求項１９０】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニソン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１８９記載の方法。
【請求項１９１】
治療薬が、抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、抗血管新生剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞傷害性放射線療法、コルチコス

テロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤からなる群から選択される請求項１７８記載の方法。
【請求項１９２】
治療薬が、ベルケード、レブリミド、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、エルロチニブ、ベカシズマブ、ビンクリスチン、イマチニブ、ソラフェニブ、ラパチニブまたはトラスツズマブ、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキセート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、メルファラン、プレドニゾン、デキサメタゾンまたはドセタキセルからなる群から選択される請求項１９１記載の方法。
【請求項１９３】
二重特異性抗体である請求項３３記載の抗体。
【請求項１９４】
ＣＤ３に特異的に結合する請求項１９３記載の抗体。
【請求項１９５】
空洞への隆起（protuberance-into-cavity）抗体である請求項１９４記載の抗体。
【請求項１９６】
非グリコシル化される請求項１９５記載の抗体。
【請求項１９７】
大腸菌宿主細胞中で産生される請求項１９６記載の抗体。
【請求項１９８】
１つ以上のＦｃエフェクター機能を欠く請求項１９６記載の抗体。
【請求項１９９】
ＡＤＣＣ活性を欠く請求項１９８記載の抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（配列表の参照）
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出され、その記載内容が参照により本明細書中で援用される配列表を含む。２０１０年２月１０日に作成された当該ＡＳＣＩＩコピーは、ＰＲ５１１４２．ｔｘｔという名称が付され、サイズは８５，２８１バイトである。
【０００２】
本発明は、哺乳類における造血系腫瘍の治療に有用な物質の組成物に、ならびにそのための物質の組成物の使用方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
悪性腫瘍（癌）は、心疾患に次いで米国における第２位の死因である（Boring et al., CA Cancel J. Clin. 43: 7(1993)）。癌は、正常組織に由来する異常または新生物性細胞の数の増大を特徴としており、それらの細胞は増殖して腫瘍塊、これらの新生物性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、ならびに悪性細胞の生成を生じ、これらは、結局は、血液またはリンパ系を介して、局所リンパ節に、そして転移と呼ばれる過程を通して遠位部位に広がる。癌状態では、細胞は、正常細胞が増殖しない条件下で増殖する。癌は、それ自体、異なる程度の侵襲性および攻撃性により特徴付けられる広範な種々の形態で症状発現する。
【０００４】
血液の細胞要素、例えばリンパ球、白血球、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞が生成されるプロセスである造血中に生成される細胞に関与する癌は、造血系癌と呼ばれる。血液およびリンパ組織中に見出され得る、そして免疫応答のために重要であるリンパ球は、リンパ球の２つの主なクラス、すなわちＢリンパ球（Ｂ細胞）およびＴリンパ球（Ｔ細胞）に分類され、これらはそれぞれ、体液性および細胞媒介性免疫を媒介する。

【０００５】
Ｂ細胞は、骨髄内で成熟し、骨髄を出て、それらの細胞表面で抗原結合抗体を発現する。ナイーブＢ細胞が、最初に、その膜結合抗体が特異的である抗原に遭遇すると、細胞は迅速に分裂し始めて、その子孫はメモリーＢ細胞およびエフェクター細胞（「形質細胞」と呼ばれる）に分化する。メモリーＢ細胞は、より長い寿命を有し、元の親細胞と同一の特異性で膜結合抗体を発現し続ける。形質細胞は、膜結合抗体を産生しないが、その代わりに、分泌され得る形態の抗体を産生する。分泌抗体は、体液性免疫の主要エフェクター分子である。
【０００６】
Ｔ細胞は、未熟Ｔ細胞の増殖および分化のための環境を提供する胸腺内で成熟する。Ｔ細胞成熟中、Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体を産生する遺伝子再編成、ならびに成熟Ｔ細胞の細胞表面表現型を決定するのを手助けする正および負の選択を受ける。成熟Ｔ細胞の特徴的細胞表面マーカーは、ＣＤ３：Ｔ細胞受容体複合体ならびに補助受容体ＣＤ４またはＣＤ８のうちの１つである。
【０００７】
癌療法のための有効な細胞性標的を発見しようと試みて、研究者等は、１つ以上の正常非癌性細胞（単数または複数）と比較して、１つ以上の特定型（単数または複数）の癌細胞の表面で特異的に発現される膜貫通または他の膜関連ポリペプチドを特定しようと努めてきた。しばしば、このような膜関連ポリペプチドは、非癌性細胞の表面と比較して、癌細胞の表面で豊富に発現される。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチドの特定は、抗体ベースの療法による破壊のために癌細胞を特異的に標的にする能力を生み出した。この点で、抗体ベースの療法が、ある種の癌の治療に非常に有効であることが見出された、ということが注目される。例えば、ヘルセプチン（登録商標）およびリツキサン（登録商標）（ともに、Genentech Inc., South San Francisco, Californiaにより製造される）は、それぞれ乳癌および非ホジキンリンパ腫を治療するのに首尾よく用いられている抗体である。さらに具体的には、ヘルセプチン（登録商標）は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体２（ＨＥＲ２）癌原遺伝子の細胞外ドメインと選択的に結合する組換えＤＮＡ由来ヒト化モノクローナル抗体である。ＨＥＲ２タンパク質過剰発現は、原発性乳癌の２５～３０％で観察される。リツキサン（登録商標）は、正常および悪性Ｂリンパ球の表面に見出されるＣＤ２０抗原に対して向けられる遺伝子操作キメラネズミ／ヒトモノクローナル抗体である。これらの抗体はともに、ＣＨＯ細胞中で組換え的に産生される。
【０００８】
癌療法のための有効な細胞性標的を発見するための他の試みでは、研究者等は、（１）１つ以上の特定型（単数または複数）の非癌性正常細胞（単数または複数）と比較して、１つ以上の特定型（単数または複数）の癌細胞（単数または複数）により特異的に産生される非膜関連ポリペプチド、（２）１つ以上の正常非癌性細胞（単数または複数）のものより有意に高い発現レベルで癌細胞により産生されるポリペプチド、あるいは（３）癌性および非癌性状態（例えば、正常前立腺および前立腺腫瘍組織）の両方における単一（または非常に限定された数の異なる）組織型（単数または複数）にのみ、その発現が特異的に限定されるポリペプチドを特定しようと努めてきた。このようなポリペプチドは、依然として細胞内に位置するか、あるいは癌細胞により分泌され得る。さらに、このようなポリペプチドは、癌細胞それ自体によらずに、むしろ、癌細胞に及ぼす増強または増殖強化作用を有するポリペプチドを産生しおよび／または分泌する細胞により発現され得る。このような分泌ポリペプチドは、しばしば、正常細胞を上回る増殖利点を癌細胞に提供するタンパク質であり、例としては、血管新生因子、細胞接着因子、増殖因子等が挙げられる。このような非膜関連ポリペプチドのアンタゴニストの特定は、このような癌の治療のための有効な治療薬として役立つと予期される。さらに、このようなポリペプチドの発現パターンの特定は、哺乳類における特定の癌の診断に有用である。
【０００９】
哺乳類癌療法における上記の確認された進歩にもかかわらず、それぞれ、哺乳類におけ

る腫瘍の存在を検出し得る付加的治療薬に対する、ならびに新生物細胞増殖を有効に抑制することに対する多大な必要性が存在する。したがって、癌性および非癌性状態の両方における単一（または非常に限定された数の異なる）組織型（単数または複数）、造血組織にのみ、その発現が特異的に限定される細胞膜関連、分泌または細胞内ポリペプチドであるポリペプチドを特定すること、そしてそれらのポリペプチドおよびそれらのコード核酸を用いて哺乳類における造血系癌の療法的処置および／または検出に有用な物質の組成物を産生することが、本発明の一目的である。

【００１０】

染色体１ｑ２１の異常は、Ｂ細胞悪性疾患、例えばＢ細胞リンパ腫および骨髄腫に共通であるが、これらの異常により標的化される遺伝子は大部分は不明である。帯域１ｑ２１～ｑ２３に関連した染色体異常は、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫および多発性骨髄腫の両方における最も頻度の高い遺伝子病変の１つである。非ホジキンリンパ腫亜型の間では、転座および重複を含めた１ｑ２１～ｑ２３での転座切断点は、しばしば、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫における濾胞性およびび漫性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＣＬ）における、ならびにバーキットリンパ腫における単一染色体異常として、報告されている。骨髄腫細胞株におけるｔ（１：１４）（ｑ２１：ｑ３２）染色体転座の切断点をクローニングすることにより、免疫グロブリン・スーパーファミリー受容体転座関連（ＩＲＴＡ）１およびＩＲＴＡ２と呼ばれる２つの遺伝子が特定された。ＩＲＴＡ２は、ＢＸＭＡＳｉ（Nakayama et al., Biochm. Biophys. Res. Commun. 285: 830-7, 2001）およびＦｃＲＨ５（Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9772-7, 2001）として特定された配列と同一である。ＩＲＴＡ１およびＩＲＴＡ２はともに、関連遺伝子の一ファミリーＩＲＴＡの成員である。

【００１１】

ＦｃＲＨ５（またはＩＲＴＡ２）は、Ｆｃ受容体ファミリーと相同性を有する細胞表面受容体である。それは普通は成熟Ｂ細胞中で発現され、そしてＦｃＲＨ４（ＩＲＴＡ１）とは異なる末梢リンパ器官中の分布を示す。ＩＲＴＡ１は辺縁帯Ｂ細胞中で発現され、一方、ＩＲＴＡ２は胚中心細胞中および免疫芽細胞中でも発現される。ＩＲＴＡ２発現は、多発性骨髄腫、ならびに１ｑ２１異常を伴うバーキットリンパ腫細胞株において脱調節される（Miller et al., Blood 99: 2662-2669, 2002参照）。Ｂ細胞悪性疾患における１ｑ２１構造再編成の高頻度の関与は、ＩＲＴＡ１およびＩＲＴＡ２がこれらの疾患の病因に対して重要である、ということを示唆する（公開ＰＣＴ出願番号ＷＯ　０１／３８４９０；米国公開特許出願番号２００８０２９２６３２参照；これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）（Polson, et al. Int Immunol. 2006 Sep; 18(9): 1363-73も参照）。

【００１２】

ＦｃＲＨ５の発現を考えると、特に長期治療のために、患者に投与される際に、最小抗原性を有するかまたは全く有さないＦｃＲＨ５抗原に対する治療用抗体を産生することは有益である。本発明は、このまたは他の要求を満たす。本発明は、一般的治療用組成物の制限を克服し、ならびに以下の詳細な説明から明らかになる付加的な利点を与える抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００１３】

細胞傷害性物質または細胞増殖抑制剤、すなわち癌の治療において腫瘍細胞を殺害するかまたは抑制するための薬剤の局所送達のための、抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）、すなわち免疫接合体の使用（Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第４９７５２７８号）は、腫瘍への薬剤部分の標的化送達ならびにそこでの細胞内蓄積を可能にするが、この場合、これらの非接合化薬剤の全身投与は、正常細胞ならびに排除されようとしている腫瘍細胞に対する非許容可能レベルの毒性を生じ得る（Baldwin et al (1986) Lan

cet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506）。治療指数、すなわちＡＤＣの最大効率および最小毒性を改良するための努力は、ポリクローナル（Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87）およびモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の選択性ならびに薬剤連結および薬剤放出特性（Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549）に集中していた。抗体薬剤接合体に用いられる薬剤部分としては、細菌タンパク質毒素、例えばジフテリア毒素、植物タンパク質毒素、例えばリシン、小分子、例えばアウリスタチン、ゲルダナマイシン（Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791）、マイタシノイド（ＥＰ　１３９１２１３; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623）、カリケアマイシン（Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342）、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびビンデシン（Rowland et al (1986)、上記）が挙げられる。薬剤部分は、細胞傷害性および細胞増殖抑制メカニズム、例えばチューブリン結合、ＤＮＡ結合またはトポイソメラーゼ抑制に影響を及ぼし得る。いくつかの細胞傷害性薬剤は、大型抗体またはタンパク質受容体リガンドと接合されると、不活性であるかまたは低活性である傾向を有する。

【００１４】

アウリスタチンペプチド、アウリスタチンＥ（ＡＥ）およびモノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）、ドラスタチンの合成類似体（ＷＯ　０２／０８８１７２）は、薬剤部分として、（ｉ）キメラモノクローナル抗体ｃＢＲ９６（癌腫上のルイスＹに特異的）；（ｉｉ）血液学的悪性疾患上のＣＤ３０に特異的であるｃＡＣ１０（Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465; ＵＳ　２００４／００１８１９４）；（ｉｉｉ）抗ＣＤ２０抗体、例えばＣＤ２０発現癌および免疫障害の治療のためのリツキサン（ＷＯ　０４／０３２８２８）；（ｉｖ）結腸直腸癌の治療のための抗ＥｐｈＢ２Ｒ抗体２Ｈ９（Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781-788）；（ｖ）Ｅ－セレクチン抗体（Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387-6394）；（ｖｉ）トラツズマブ（ヘルセプチン（登録商標）、ＵＳ　２００５／０２３８６４９）、および（ｖｉｉ）抗ＣＤ抗体（ＷＯ　０３／０４３５８３）と接合されている。アウリスタチンＥの変異体は、米国特許第５７６７２３７号および米国特許第６１２４４３１号に開示されている。モノクローナル抗体と接合されるモノメチルアウリスタチンＥは、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004に開示されている。アウリスタチン類似体ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦは、種々の抗体と接合されている（ＵＳ　２００５／０２３８６４９）。

【００１５】

薬剤部分を抗体に結合する、すなわち、共有結合により連結する慣用的手段は、一般的に、分子の異種混合物をもたらし、ここで、薬剤部分は抗体上の多数の部位で結合される。例えば、細胞傷害性薬剤は、典型的には、抗体のしばしば非常に多いリシン残基を介して抗体に接合され、異種抗体－薬剤接合体混合物を生じさせている。反応条件に依存して、異種混合物は、典型的には、０～約８またはそれ以上の結合薬剤部分を有する抗体の分布を含む。さらに、特定の整数比の薬剤部分対抗体を有する接合体の各亜群内には、薬剤部分が抗体上の種々の部位で結合される、潜在的に異種の混合物が存在する。分析および調製方法は、接合反応に起因する異種混合物内の抗体－薬剤接合体種分子を分離し、特性化するためには不適切であり得る。抗体は、大型の、複雑な且つ構造的に多様な生体分子であり、しばしば、多数の反応性官能基を有する。リンカー試薬および薬剤－リンカー中間体とのそれらの反応性は、ｐＨ、濃度、塩濃度および補助溶媒のような因子に依ってい

る。さらに、反応条件を制御し、反応体および中間体を特性化することが難しいため、多段階接合プロセスは再現不可能であり得る。

【００１６】

プロトン化され、ｐＨ７近くで低求核性であるほとんどのアミンと違って、システインチオールは中性ｐＨで反応性である。遊離チオール（ＲＳＨ、スルフヒドリル）基は比較的反応性であるため、システイン残基を有するタンパク質は、しばしば、ジスルフィド結合オリゴマーとしてそれらの酸化型で存在するか、あるいは内部に架橋ジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般的に、遊離チオールを有さない（Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55）。抗体システインチオール基は、一般的に、求電子性接合試薬に対して、抗体アミンまたはヒドロキシル基よりも反応性、すなわち求核性である。システイン残基は、リガンドとの共有結合を形成するために、または新規の分子内ジスルフィド結合を形成するために、遺伝子操作技術によりタンパク質中に導入されている（Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484;ＵＳ　６２４８５６４）。しかしながら、システインアミノ酸へのタンパク質の種々のアミノ酸残基の突然変異によるシステインチオール基における操作は、特に、非対合（遊離Ｃｙｓ）残基あるいは反応または酸化に対して相対的に許容可能であるものの場合、潜在的には問題がある。タンパク質の濃縮溶液中では、大腸菌のペリプラズム中であれ、培養上清中であれ、あるいは部分的に完全に精製されたタンパク質中であれ、タンパク質表面の非対合Ｃｙｓ残基は対合し、酸化して、分子内ジスルフィドを、それゆえタンパク質二量体または多量体を形成し得る。ジスルフィド二量体形成は、新規のＣｙｓを、薬剤、リガンドまたは他の標識との接合に関して非反応性にさせる。さらに、タンパク質が新規に操作したＣｙｓおよび現存Ｃｙｓ残基間に分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成すると、両Ｃｙｓチオール基は活性部位の関与および相互作用のために利用可能でない。さらに、タンパク質は、ミスフォールディングまたは三次構造の損失により、不活性化されるかまたは非特異的にされ得る（Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9）。

【００１７】

システイン操作された抗体は、ＦＡＢ抗体断片（チオＦａｂ）として設計され、全長ＩｇＧモノクローナル（チオＭａｂ）抗体として発現されている（Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52;ＵＳ　２００７／００９２９４０；これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）。チオＦａｂおよびチオＭａｂ抗体は、チオ反応性リンカー試薬および薬剤－リンカー試薬を用いて新規導入システインチオールでリンカーにより接合されて、抗体薬剤接合体（チオＡＤＣ）を調製した。

【００１８】

本明細書中で引用される参考文献は、特許出願および出版物を含めて全て、これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１９】

本発明は、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその機能的断片、ならびに造血系腫瘍の治療におけるその使用方法に関する。

【００２０】

一態様において、本発明は、上記または下記のポリペプチドのいずれかと、好ましくは特異的に、結合する抗体を提供する。任意に、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖ断片、ダイアボディ、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、または抗ＦｃＲＨ５ポリペプチド抗体とそのそれぞれの抗原エピトープとの結合を競合的に抑制する抗体である。本発明の抗体は、

任意に、増殖阻害剤または細胞傷害性物質、例えば毒素、例えばアウリスタチン、マイタンシノイド、ドロスタチン誘導体、またはカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解酵素等と接合され得る。本発明の抗体は、任意に、ＣＨＯ細胞または細菌細胞中で産生され得、好ましくはそれらが結合する細胞の死を誘導する。検出目的のために、本発明の抗体は、検出可能的に標識され、固体支持体と結合され得る。

【００２１】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する抗体における一価親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としての抗体の親和力）または二価型の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧ断片としての抗体の親和力）が、図９（配列番号１９）および図１０（配列番号２１）に示されるような軽鎖および重鎖可変ドメインを含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、ネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてまたはＩｇＧ断片としてのネズミ抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてまたはＩｇＧ断片としてのキメラ抗体の親和力）のそれぞれ一価親和力またはその二価型の親和力と実質的に同一であるか、より低いかまたはより大きい、ヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００２２】

別の実施形態では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が、０．４ｎＭ、０．２ｎＭまたは０．５ｎＭである、ヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００２３】

一態様では、ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、以下からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５または６つのＨＶＲを含む抗体を提供する：

（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号２６）を含むＨＶＲ－Ｌ１

（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴ（配列番号２７）を含むＨＶＲ－Ｌ２

（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴ（配列番号２８）を含むＨＶＲ－Ｌ３

（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳ（配列番号３５）を含むＨＶＲ－Ｈ１

（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲ（配列番号３６）を含むＨＶＲ－Ｈ２

（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹ（配列番号３７）を含むＨＶＲ－Ｈ３。

他の一実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号３６の配列を有する。別の実施形態では、抗体は、ヒトκ亜群１共通フレームワーク配列を含む。他の一実施形態では、抗体は、重鎖ヒト亜群ＩＩＩ共通フレームワーク配列を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号１９から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号２１から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号１９から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【００２４】

他の一実施形態では、抗体は、配列番号２１から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号３１、３２、３３および３４から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。他の実施形態では、抗体は、配列番号２２、２３、２４および２５から選択される１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号３１、３２、３３および３４から選択されるアミノ酸と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。他の実施形態では、抗体は、配列番号２２、２３、２４および２５から選択されるアミノ酸と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する１、２、３または４つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【００２５】

一態様では、ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、少なくとも１つの変異体ＨＶＲ（ここで、変異体ＨＶＲ配列は、配列番号２６、２７、２８、３５、３６または３７で示される配列の少なくとも１つの残基の修飾を含む）を含む抗体が提供される。他の一実施形態では、修飾は、置換、挿入または欠失である。

【００２６】

別の実施形態では、フレームワーク配列の少なくとも一部は、ヒト共通フレームワーク配列である。

【００２７】

別の態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１９）および図１０（配列番号２１）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミ抗体の一価親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００２８】

一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１９）および図１０（配列番号２１）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の一価親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００２９】

他の一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の一価親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９，１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３０】

別の態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるようなその二価型で、軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミ抗体の親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３１】

一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるようなその二価型で、軽鎖および重鎖可変領域を含むネズミまたはキメラ抗体の親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３２】

一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変領域を含むその二価型のネズミまたはキメラ抗体の親和力より少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９，１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３３】

他の一実施形態では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．４ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。一実施形態では、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力は、０．４ｎＭ±．０４である。

【００３４】

他の一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．２ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。一実施形態では、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力は、０．２ｎＭ±．０２である。

【００３５】

他の一態様では、本発明は、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力が０．

５ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。一実施形態では、ヒトＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力は、０．５ｎＭ±０．１である。

【００３６】

全ての態様において、結合親和力はＫｄ値として表される。他の態様では、結合親和力は、Ｂｉａｃｏｒｅまたはラジオイムノアッセイにより測定される。

【００３７】

他の一態様では、本発明は、細胞傷害性物質と接合された際に、ヒト化抗体が腫瘍細胞増殖を防止するヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３８】

別の態様では、本発明は、細胞傷害性物質と接合された際に、ヒト化抗体が腫瘍細胞増殖を防止するヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【００３９】

一実施形態では、ヒト化抗体およびキメラ抗体はともに、一価または二価である。別の実施形態では、ヒト化抗体およびキメラ抗体はともに、Ｆｃ領域に連結される単一Ｆａｂ領域を含む。

【００４０】

別の態様では、本発明は、図１１で示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列（配列番号３５～３７）を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施形態では、可変ドメインは、図１１で示されるＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣ（配列番号３１～３４）を含む。別の実施形態では、抗体は、図１１で示されるＣＨ１および／またはＦｃ配列（配列番号３８および／または３９）を含む。

【００４１】

他の一態様では、本発明は、図１１で示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列（配列番号２６～２８）を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施形態では、可変ドメインは、図１１で示されるＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣ（配列番号２２～２５）を含む。別の実施形態では、抗体は、図１１で示されるＣＬ１配列（配列番号２９）を含む。

【００４２】

一態様では、本発明は、図１０で示される配列（配列番号２１）を含むポリペプチドを提供する。別の態様では、本発明は、図９で示される配列（配列番号１９）を含むポリペプチドを提供する。

【００４３】

別の態様では、本発明は、（ａ）本明細書中に記載される重鎖可変ドメインおよび本明細書中に記載される軽鎖可変ドメインを含む抗体を発現する細胞を培養するプロセス；ならびに（ｂ）上記培養細胞から抗体を単離するプロセスにより製造される抗体を提供する。

【００４４】

他の一態様では、本発明は、本明細書中に記載される重鎖可変ドメインおよび本明細書中に記載される軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施形態では、抗体は一価であり、Ｆｃ領域を含む。

【００４５】

一態様では、本発明は、本明細書中に記載される抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、本発明は、ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。別の実施形態では、本発明は、ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【００４６】

一態様では、本発明は、１つ以上の遊離システインアミノ酸および配列番号４１～４４から選択される配列を含むシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を包含する。システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合し得る。システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、親抗ＦｃＲＨ５抗体の１つ以上のアミノ酸残基を遊離シス

テインに取り替えることを包含するプロセスにより調製され得る。
【００４７】
一態様では、本発明は、１つ以上の遊離システインアミノ酸を含むシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体であって、ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合し、親抗ＦｃＲＨ５抗体の１つ以上のアミノ酸残基をシステインに置き換えることを包含するプロセスにより調製されるシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を包含するが、ここで、親抗体は、以下から選択される少なくとも１つのＨＶＲ配列を含む：
（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号２６）を含むＨＶＲ－Ｌ１
（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴ（配列番号２７）を含むＨＶＲ－Ｌ２
（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴ（配列番号２８）を含むＨＶＲ－Ｌ３
（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳ（配列番号３５）を含むＨＶＲ－Ｈ１
（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲ（配列番号３６）を含むＨＶＲ－Ｈ２
（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹ（配列番号３７）を含むＨＶＲ－Ｈ３。
【００４８】
システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、または抗ＦｃＲＨ５ポリペプチド抗体とそのそれぞれの抗原エピトープとの結合を競合的に抑制する抗体であり得る。本発明の抗体は、任意に、増殖阻害剤または細胞傷害性物質、例えば毒素、例えばアウリスタチン、マイタンシノイドと接合され得る。本発明の抗体は、任意に、ＣＨＯ細胞または細菌細胞中で産生され得、好ましくはそれらが結合する細胞の成長または増殖を抑制し、あるいは死を誘導する。診断の目的のために、本発明の抗体は、検出可能的に標識され、固体支持体と結合などされ得る。
【００４９】
一態様では、本発明は、本発明の抗体の製造方法を提供する。例えば、本発明は、ＦｃＲＨ５抗体（本明細書中で定義されるように、全長およびその断片を含む）の製造方法であって、上記抗体（またはその断片）をコードする本発明の組換えベクターを適切な宿主細胞中で発現すること、そして上記抗体を回収することを包含する方法を提供する。
【００５０】
別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する第一細胞と、ならびに細胞表面標的抗原を発現する第二細胞と結合し得る二重特異性抗体を提供する。一実施形態では、第二細胞はＴ細胞である。一実施形態では、細胞表面標的抗原はＣＤ３である。ある実施形態では、二重特異性抗体は、空洞への隆起（protruberance-into-cavity）抗体である。一実施形態では、二重特異性抗体は非グリコシル化される。一実施形態では、二重特異性抗体は、大腸菌宿主細胞中で産生される。一実施形態では、二重特異性抗体は、１つ以上のＦｃエフェクター機能を欠く。一実施形態では、二重特異性抗体はＡＤＣＣ活性を欠く。
【００５１】
一態様では、本発明は、本発明の抗体または本発明の抗体－薬剤接合体、および製薬上許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的処方物である。
【００５２】
一態様では、本発明は、容器；および容器内に含入される組成物を包含する製品であって、組成物が本発明の１つ以上のＦｃＲＨ５抗体を含む製品を提供する。
【００５３】
一態様では、本発明は、本発明の１つ以上のＦｃＲＨ５抗体を含む組成物を含む第一容器；および緩衝剤を含む第二容器を包含するキットを提供する。
【００５４】
一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明のＦｃＲＨ５抗体の使用を提供する。
【００５５】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明の製品の使用を提供する。

【００５６】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明のキットの使用を提供する。

【００５７】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞の増殖を抑制する方法であって、上記細胞を本発明の抗体と接触させ、それにより上記細胞の増殖の抑制を生じさせることを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【００５８】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳類を治療的に処置する方法であって、治療的有効量の本発明の抗体を上記哺乳類に投与し、それにより上記哺乳類を有効に処置することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【００５９】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５の発現増大と関連した細胞増殖性障害を治療するかまたは予防するための方法であって、このような処置を必要とする対象に有効量の本発明の抗体を投与し、それにより上記細胞増殖性障害を有効に治療するかまたは予防することを包含する方法を提供する。一実施形態では、上記増殖性障害は癌である。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【００６０】

一態様では、本発明は、少なくとも一部はＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている細胞の増殖の抑制方法であって、上記細胞を有効量の本発明の抗体と接触させて、それにより上記細胞の増殖を抑制することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【００６１】

一態様では、本発明は、哺乳類における腫瘍（腫瘍の増殖は、少なくとも一部はＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている）を治療的に処置する方法であって、上記細胞を有効量の本発明の抗体と接触させ、それにより上記腫瘍を有効に治療することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【００６２】

一態様では、本発明は、患者の治療方法であって、本明細書中に記載される免疫接合体、許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的処方物を患者に投与することを包含する方法を提供する。

【００６３】

一態様では、本発明は、Ｂ細胞増殖の抑制方法であって、免疫接合体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下で本発明の抗体を含む免疫複合体に細胞を曝露することを包含する方法を提供する。

【００６４】

本発明の方法は、さらに、付加的処置ステップを包含することができる。例えば一実施形態では、方法はさらに、標的化細胞および／または組織（例えば癌細胞）が放射線治療または化学療法薬に曝露されるステップを包含する。

【００６５】

一態様では、本発明は、有効量の抗ＦｃＲＨ５抗体を、有効量の別の治療薬（例えば、抗血管新生剤、別の抗体、化学療法薬、細胞傷害性物質、免疫抑制剤、プロドラッグ、サ

イトカイン、細胞傷害性放射線療法、コルチコステロイド、抗嘔吐薬、癌ワクチン、鎮痛薬または増殖阻害剤）と組合せて投与することを包含する方法を提供する。例えば、抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、抗癌薬または抗鎮痛薬と組合せて用いられて、種々の新生物性または非新生物性状態を処置する。特定例では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、ベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）、レブリミド（登録商標）（レナリドミド）、タモキシフェン、レトロゾール、エキセメスタン、アナストロゾール、イリノテカン、セツキシマブ、フルベストラント、ビノレルビン、ベバシズマブ、ビンクリスチン、シスプラチン、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル、ドキソルビシン、ボルテゾミブ、レナリドミド、デキサメタゾン、メルファリン、プレドニソン、ビンクリスチン、サリドマイドと組合せて用いられる。

【００６６】

治療されるべき特定の癌適応症によって、本発明の併用療法は、付加的治療薬、例えば化学療法薬、または付加的療法、例えば放射線療法または外科手術と組合され得る。多数の既知の化学療法薬が、本発明の併用療法で用いられ得る。好ましくは、特定の適応症の処置のための標準である化学療法薬が用いられる。組合せに用いられるべき各治療薬の投与量または頻度は、好ましくは、他の作用物質（単数または複数）を伴わずに用いられる場合の対応する作用物質の投与量または頻度と同じであるか、またはそれより低い。

【００６７】

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される抗ＦｃＲＨ５抗体（検出可能な標識を含む）のいずれかを提供する。

【００６８】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を含有すると推測される試料中のＦｃＲＨ５の存在を確定する方法であって、上記試料を本発明の抗体に曝露すること、ならびに上記抗体と上記試料中のＦｃＲＨ５との結合を確定すること（ここで、上記抗体と上記試料中のＦｃＲＨ５との結合は、上記試料中の上記タンパク質の存在を示す）を包含する方法を提供する。

【００６９】

一態様では、本発明は、Ｂ細胞のような細胞中の増大（ＦｃＲＨ５発現が提供される）と関連した細胞増殖性障害の診断方法であって、生物学的試料中の試験細胞を上記抗体のいずれかと接触させること；抗体とＦｃＲＨ５との結合を検出することにより試料中の試験細胞と結合される抗体のレベルを確定すること；そして対照試料中の細胞と結合される抗体のレベルを比較することを包含する方法を提供するが、ここで、結合される抗体のレベルは試験および対照試料中のＦｃＲＨ５発現細胞の数に対して正規化され、そして、対照試料と比較して高レベルの試験試料中の結合抗体は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞と関連する細胞増殖性障害の存在を示す。

【００７０】

一態様では、本発明は、血液または血清中の可溶性ＦｃＲＨ５の検出方法であって、Ｂ細胞増殖性障害を経験したと推測される哺乳類からの血液または血清の試験試料を、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体と接触させること、そして正常哺乳類からの血液または血清の対照試料に比して、試験試料中の可溶性ＦｃＲＨ５の増大を検出することを包含する方法を提供する。

【００７１】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞との本発明の抗体の結合方法であって、上記細胞を本発明の抗体と接触させることを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は、細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１軽鎖（ＤＮＡ）を示す。

【図２】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１軽鎖（アミノ酸）を示す。
【図３】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１重鎖（ＤＮＡ）を示す。
【図４】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１重鎖（アミノ酸）を示す。
【図５】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０Ａ８）軽鎖（ＤＮＡ）を示す。
【図６】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０Ａ８）軽鎖（アミノ酸）を示す。
【図７】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０Ａ８）重鎖（ＤＮＡ）を示す。
【図８】キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０Ａ８）重鎖（アミノ酸）を示す。
【図９】ヒト共通ＶＬカッパＩ（ｈｕＫＩ）ドメイン（配列番号６４）を有するネズミ１０Ａ８およびヒト化１０Ａ８ｖ１に関する可変軽鎖のアラインメントを示す。
【図１０】ヒト亜群共通ＶＨ（ｈｕＩＩＩ）ドメイン（配列番号６５）を有するネズミ１０Ａ８およびヒト化１０Ａ８ｖ１に関する可変重鎖のアラインメントを示す。
【図１１】本発明の抗体のアミノ酸配列を示す（Ｈｕ１０Ａ８ｖＩ）。
【図１２】本発明のチオ－Ｍａｂのシステイン操作されたポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。
【図１３】本発明のチオ－Ｍａｂのシステイン操作されたポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。
【図１４】ＦｃＲＨ５抗体の交差反応性を示す。
【図１５】ＦｃＲＨ５抗体の交差反応性を示す。
【図１６】ＦｃＲＨ５抗体の交差反応性を示す。
【図１７】ＦｃＲＨ５抗体のＦＡＣＳ分析を示す。
【図１８】ＦｃＲＨ５抗体滴定を示す。
【図１９】ＦｃＲＨ５抗体滴定を示す。
【図２０】本発明のチオ－ＭａｂのＦＡＣＳ分析を示す。
【図２１】本発明のチオ－ＭａｂのＦＡＣＳ分析を示す。
【図２２】本発明のチオ－ＭａｂのＦＡＣＳ分析を示す。
【図２３】本発明のチオ－ＭａｂのＦＡＣＳ分析を示す。
【図２４】本発明の接合抗体のＦＡＣＳ分析を示す。
【図２５】本発明の接合抗体のＦＡＣＳ分析を示す。
【図２６】平均腫瘍体積に及ぼす本発明の抗体の作用を示す。
【図２７】平均体重に及ぼす本発明の抗体の作用を示す。
【図２８】平均腫瘍体積に及ぼす本発明の抗体の作用を示す。
【図２９】平均体重に及ぼす本発明の抗体の作用を示す。
【図３０ａ】平均腫瘍体積に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【図３０ｂ】平均体重に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【図３１】単一化合物用量応答分析を示す。
【図３２】単一化合物用量応答分析を示す。
【図３３】ＰＲＯ８２０　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５８）を示す。ここで、配列番号５８は、「ＤＮＡ５６０４１－１４１６」（本明細書中では「ＦｃＲＨ５」とも呼ばれる）と本明細書中で呼ばれるクローンである。ヌクレオチド配列は、太字で示され、下線を付された開始および停止コドンを有するＦｃＲＨ５をコードする（米国特許第７４９１５２９号（Goddard等）参照）
【図３４】図３３で示される配列番号５９のコード配列由来のアミノ酸配列（配列番号５９）を示す（米国特許第７４９１５２９号（Goddard等）参照）。
【図３５Ａ】ＰＲＯ５２３８７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６０）を示す。ここで、配列番号６０は、「ＤＮＡ２５７８４５」（本明細書中では「ＦｃＲＨ５」とも呼ばれる）と本明細書中で呼ばれるクローンである。ヌクレオチド配列は、太字で示され、下線を付された開始および停止コドンを有するＦｃＲＨ５をコードする（米国公開特許出願番号２００６０２５１６６２（Chang等）参照）。
【図３５Ｂ】ＰＲＯ５２３８７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６０）を示す。ここで、配列番号６０は、「ＤＮＡ２５７８４５」（本明細書中では「ＦｃＲＨ５」とも

呼ばれる）と本明細書中で呼ばれるクローンである。ヌクレオチド配列は、太字で示され、下線を付された開始および停止コドンを有するＦｃＲＨ５をコードする（米国公開特許出願番号２００６０２５１６６２（Chang等）参照）。
【図３６】図３６Ａ～Ｂで示される配列番号６１のコード配列由来のアミノ酸配列（配列番号６１）を示す（米国公開特許出願番号２００６０２５１６６２（Chang等）参照）。
【図３７】ＰＲＯ３１４９９２　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６２）を示す。ここで、配列番号６２は、カニクイザルからの「ＤＮＡ６７６９６９」（本明細書中では「ＦｃＲＨ５」とも呼ばれる）と本明細書中で呼ばれるクローンである。
【図３８】図３７に示される配列番号６３のコード配列由来のアミノ酸配列（配列番号６３）を示す。
【図３９】マウスにおける平均腫瘍体積に及ぼす抗体免疫接合体および少なくとも１つの化学療法薬の併用投与の作用を示す。
【図４０】各投与量群における動物に関する体重変化パーセントを示す。
【図４１】マウスにおける平均腫瘍体積に及ぼす抗体免疫接合体および少なくとも１つの化学療法薬の併用投与の作用を示す。
【図４２】各投与量群における動物に関する体重変化パーセントを示す。
【図４３】マウスにおける平均腫瘍体積に及ぼす抗体免疫接合体および少なくとも１つの化学療法薬の併用投与の作用を示す。
【図４４】各投与量群における動物に関する体重変化パーセントを示す。
【図４５】平均腫瘍体積に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【図４６】平均体重に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【図４７】平均腫瘍体積に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【図４８】平均体重に及ぼす本発明の抗体接合体の作用を示す。
【発明を実施するための形態】
【００７３】
本発明は、哺乳類における造血系腫瘍の治療に有用な組成物を特定するための方法、組成物、キットおよび製品に、ならびにそのための物質の組成物の使用方法を提供する。
【００７４】
これらの方法、組成物、キッドおよび製品の詳細は、本明細書中で提供される。
【００７５】
Ｉ．一般技法
本発明の実行は、別記しない限り、当該技術分野内である分子生物学（例えば組換え技術）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の慣用的技法を用いる。このような技法は、文献中で、例えば“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989)；“Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984)；“Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987)；“Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.)；“Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987および定期的最新版)；“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994)；“A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988)；“Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001)で詳細に説明されている。
【００７６】
ＩＩ．定義
本明細書を説明するために、以下の定義が適用され、適切な場合はいつも、単数で用いられる語は複数も含み、その逆でもある。記述される任意の定義が参照により本明細書中で援用される任意の文書と矛盾する場合、以下で記述される定義が優先される。
【００７７】
「Ｂ細胞表面マーカー」または「Ｂ細胞表面抗原」は、本明細書中では、それと結合するアンタゴニスト、例えばＢ細胞表面抗原あるいは天然Ｂ細胞抗原とのリガンドの結合を拮抗し得る可溶型Ｂ細胞表面抗原に対する抗体（これらに限定されない）で標的化され得

るＢ細胞の表面で発現される抗原である。Ｂ細胞表面マーカーの例としては、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５およびＣＤ８６白血球表面マーカー(説明に関しては、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York参照)。他のＢ細胞表面マーカーとしては、ＲＰ１０５、ＦｃＲＨ２、Ｂ細胞　ＣＲ２、ＣＣＲ６、Ｐ２Ｘ５、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＣＸＣＲ５、ＦＣＥＲ２、ＢＲ３、ＢＡＦＦ、ＢＬｙＳ、Ｂｔｉｇ、ＮＡＧ１４、ＳＬＧＣ１６２７０、ＦｃＲＨ１、ＩＲＴＡ２、ＡＴＷＤ５７８、ＦｃＲＨ３、ＩＲＴＡ１、ＦｃＲＨ６、ＢＣＭＡおよび２３９２８７が挙げられる。特に興味深いＢ細胞表面マーカーは、哺乳類の他の非Ｂ細胞組織と比較してＢ細胞上で優先的に発現され、前駆体Ｂ細胞および成熟Ｂ細胞の両方で発現され得る。

【００７８】

「ＦｃＲＨ５」という用語は、本明細書中で用いる場合、別記しない限り、任意の脊椎動物供給源、例えば哺乳類、例えば霊長類（例えば、ヒト、カニクイザル（ｃｙｎｏ））ならびに齧歯類（例えば、マウスおよびラット）からの任意のネイティブＦｃＲＨ５を指す。ヒトＦｃＲＨ５は、本明細書中では、「ＴＡＨＯ１８」または「ＰＲＯ８５１４３」（配列番号２）とも呼ばれ、ヌクレオチド配列（配列番号１）（本明細書中では「ＤＮＡ３４０３９４」とも呼ばれる）によりコードされる。カニクイザルＦｃＲＨ５は、本明細書中では、「ｃｙｎｏＦｃＲＨ５」としても言及される。「ＦｃＲＨ５」という用語は、「全長」非加工処理ＦｃＲＨ５、ならびに細胞中でのプロセシングに起因する任意の型のＦｃＲＨ５を包含する。当該用語は、ＦｃＲＨ５の天然変異体、例えばスプライス変異体、対立遺伝子変異体およびアイソフォームも包含する。本明細書中に記載されるＦｃＲＨ５ポリペプチドは、種々の供給源、例えばヒト組織型から、または別の供給源から単離され得、あるいは組換えまたは合成方法から調製され得る。「ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド」は、天然物由来の対応するＦｃＲＨ５ポリペプチドと同一アミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このようなネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、天然物から単離され得、あるいは組換えまたは合成手段により生産され得る。「ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド」は、特定的に、天然切頭化または分泌型の特定ＦｃＲＨ５ポリペプチド（例えば細胞外ドメイン配列）、天然変異体型（例えば選択的スプライス化型）およびポリペプチドの天然対立遺伝子変異体を包含する。本発明のある実施形態では、本明細書中に開示されるネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、添付の図面中に示される全長アミノ酸配列を含む成熟または全長ネイティブ配列ポリペプチドである。開始および終止コドンは（示される場合には）、図中で太字で、下線を付して示される。添付の図面で「Ｎ」として示される核酸残基は、任意の核酸残基である。しかしながら、添付の図面で開示されるＦｃＲＨ５ポリペプチドは図中のアミノ酸位置１と本明細書中で呼ばれるメチオニン残基で開始すると示されているが、しかしそれは、図中のアミノ酸位置１から上流または下流に位置する他のメチオニン残基がＦｃＲＨ５ポリペプチドのための開始アミノ酸残基として用いられ得る、と想定され得るし、あり得ることである。

【００７９】

「ｍｕ１０Ａ８」または「ＭＡ１０Ａ８」または「ネズミＦｃＲＨ５（１０Ａ８）抗体」または「ネズミ抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）抗体」は、本明細書中では、ネズミ抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体に特定的に言及するために用いられ、ここで、ネズミ抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体は、配列番号１８の軽鎖可変ドメイン（図９）および配列番号２０の重鎖可変ドメイン（図１０）を含む。ネズミ抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体は、商業的供給元から購入され得る。

【００８０】

「ｃｈ１０Ａ８」または「ｃｈＭＡＦｃＲＨ５（１０Ａ８）」または「ｃｈＦｃＲＨ５（１０Ａ８））」または「キメラＭＡＦｃＲＨ５（１０Ａ８））抗体」は、本明細書中で

は、キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５抗体に特定的に言及するために用いられ、ここで、キメラ抗ＦｃＲＨ５抗体は配列番号１５の軽鎖（図６）を含む。配列番号１５の軽鎖は、さらに、図９に示される可変ドメイン、ならびにヒトＩｇＧ１の軽鎖定常ドメインを含む。キメラ抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８））抗体はさらに、配列番号１７の重鎖（図８）を含む。配列番号１７の重鎖はさらに、図１０に示される可変ドメインおよびヒトＩｇＧ１の重鎖定常ドメインを含む。

【００８１】

「ｃｈ７Ｄ１１」または「ｃｈＭＡＦｃＲＨ５（７Ｄ１１）」または「ｃｈＦｃＲＨ５（７Ｄ１１））」または「キメラＭＡＦｃＲＨ５（７Ｄ１１））抗体」は、本明細書中では、キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５抗体に特定的に言及するために用いられ、ここで、キメラ抗ＦｃＲＨ５抗体は配列番号１１の軽鎖（図２）を含み、これは、ヒトＩｇＧ１の軽鎖定常ドメインを含む。キメラ抗ＦｃＲＨ５（７Ｄ１１））抗体はさらに、配列番号１３の重鎖（図４）を含み、これは、ヒトＩｇＧ１の重鎖定常ドメインを含む。

【００８２】

「抗ｃｙｎｏＦｃＲＨ５」または「抗ｃｙｎｏ　ＦｃＲＨ５」は、本明細書中では、ｃｙｎｏ　ＦｃＲＨ５と結合する抗体に言及するために用いられる。

【００８３】

「１０Ａ８移植変」または「１０Ａ８移植「ヒト化」抗体」または「ｈｕ１０Ａ８移植変」は、本明細書中では、ネズミ１０Ａ８抗ＦｃＲＨ５抗体（ｍｕ１０Ａ８）からの超可変領域を、受容体ヒト共通ＶＬカッパ（ｈｕＫＩ）およびヒト亜群ＩＩＩ共通ＶＨ（ｈｕＩＩＩ）中に移植することにより生成される移植片に特定的に言及するために用いられる((Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992))（実施例１ならびに図９（配列番号１９）および１０（配列番号２１）参照）。「ｈｕ１０Ａ８」または「ｈｕ１０Ａ８ｖ１」は、ヒト化１０Ａ８抗体に特定的に言及するために用いられる。

【００８４】

アミノ酸残基／位置の「修飾」は、本明細書中で用いる場合、出発アミノ酸配列と比較した場合の一次アミノ酸配列の変化を指し、ここで、変化は、上記アミノ酸残基／位置に関連した配列変更に起因する。例えば典型的な修飾としては、別のアミノ酸残基による当該残基（または上記位置）の置換（例えば保存的または非保存的置換）、上記残基／位置に隣接する１つ以上の（一般的には５または３より少ない）アミノ酸の挿入、ならびに上記残基／位置の欠失が挙げられる。「アミノ酸置換」またはその変形は、異なるアミノ酸残基による既定（出発）アミノ酸配列中の現存アミノ酸残基の取替えを指す。一般的には、そして好ましくは、修飾は、出発（または「野生型」）アミノ酸配列を含むポリペプチドと比較して、変異体ポリペプチドの少なくとも１つの物理生物化学的活性における変更を生じる。例えば抗体の場合、変更される物理生物化学的活性は、結合親和性、結合能力および／または標的分子に及ぼす結合作用であり得る。

【００８５】

「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、具体的には、例えば単一抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、全長または無傷モノクローナル抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗ＦｃＲＨ５抗体組成物、ポリクローナル抗体、多価抗体、少なくとも２つの無傷抗体から形成される多重特異性抗体（それらが所望の生物学的活性を示す限り。例えば二重特異性抗体）、一本鎖抗ＦｃＲＨ５抗体、ならびに抗ＦｃＲＨ５抗体の断片（下記参照）、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖ断片、ダイアボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（それらが所望の生物学的または免疫学的活性を示す限り）を包含する。「免疫グロブリン」（Ｉｇ）という用語は、本明細書中では抗体と互換的に用いられる。抗体は、ヒト、ヒト化および／または親和性成熟抗体であり得る。

【００８６】

「抗ＦｃＲＨ５抗体」または「ＦｃＲＨ５と結合する抗体」という用語は、ＦｃＲＨ５を標的とする際に、診断および／または治療薬として抗体が有用であるよう十分な親和性

でＦｃＲＨ５を結合し得る抗体を指す。好ましくは、抗ＦｃＲＨ５抗体と非関連、非ＦｃＲＨ５タンパク質とが結合する程度は、例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）により測定して、抗体とＦｃＲＨ５との結合の約１０％未満である。ある実施形態では、ＦｃＲＨ５と結合する抗体は、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下または０．１ｎＭ以下の解離定数を有する。ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、異なる種からのＦｃＲＨ５間で保存されるＦｃＲＨ５のエピトープと結合する。

【００８７】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から特定され、分離され、および／または回収されたものである。その天然環境の夾雑物成分は、抗体に関する治療的使用を妨げる物質であり、例としては、酵素、ホルモンおよびその他のタンパク質様または非タンパク質様溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態では、抗体は、（１）ローリー法により測定して、９５重量％より高い抗体に、最も好ましくは９９重量％より以上に、（２）スピニングカップ配列決定装置の使用によりＮ末端または内部アミノ酸配列のうちの少なくとも１５残基を得るのに十分な程度に、あるいは（３）クーマシーブルー、好ましくは銀染色を用いて、還元または非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより均質になるまで精製される。抗体の天然環境の少なくとも１つの構成成分は存在しないため、単離抗体はin situで組換え細胞内の抗体を含む。しかしながら、普通は、単離抗体は少なくとも１つの精製工程により調製される。

【００８８】

基本４鎖抗体単位は、２つの同一軽（Ｌ）鎖および２つの同一重（Ｈ）鎖からなるヘテロ四量体糖タンパク質である（ＩｇＭ抗体は、５つの基本ヘテロ四量体単位に、Ｊ鎖と呼ばれる付加的ポリペプチドを伴って構成され、１０の抗原結合部位を含有するが、一方、分泌ＩｇＡ抗体は重合して、Ｊ鎖を伴う２～５つの基本４鎖単位を含む多価集合物を形成する）。ＩｇＧの場合、４鎖単位は、一般的に、約１５０，０００ダルトンである。各Ｌ鎖は、１つの共有ジスルフィド結合によりＨ鎖に連結されるが、一方、２つのＨ鎖は、Ｈ鎖アイソタイプによって、１つ以上のジスルフィド結合により互いに連結される。各ＨおよびＬ鎖は、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各Ｈ鎖は、Ｎ末端に、可変ドメイン（V_H）を、その後に、αおよびγ鎖の各々に関する３つの定常ドメイン（C_H）、ならびにμおよびεアイソタイプに関する４つのC_Hドメインを有する。各Ｌ鎖は、Ｎ末端に、可変ドメイン（V_L）を、その後に、その他端に定常ドメイン（C_L）を有する。V_LはV_Hと一列に並べられ、そしてC_Lは重鎖の第一定常ドメイン（C_H1）と一列に並べられる。特定のアミノ酸残基が、軽鎖および重鎖可変ドメイン間に界面を形成すると考えられる。V_HおよびV_Lの対合は、一緒になって単一抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造および特性に関しては、例えばBasic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。

【００８９】

任意の脊椎動物種からのＬ鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる２つの明らかに異なる型のうちの１つに割り当てられ得る。それらの重鎖の定常ドメイン（C_H）のアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。それぞれα、δ、ε、γおよびμと呼ばれる重鎖を有する、以下の５つのクラスの免疫グロブリンがある：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ。γおよびαクラスは、Ｃ配列および機能の比較的小さい差に基づいてさらにサブクラスに分けられ、例えばヒトは、以下のサブクラスを発現する：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２。

【００９０】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖の可変ドメインは、「ＶＨ」として言及され得る。軽鎖の可変ドメインは、「ＶＬ」として言及され得る。これらのドメインは、一般的に、抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含有する。

【００９１】
「可変」という用語は、可変ドメインのあるセグメントは抗体間の配列で大きく異なる、という事実を指す。Ｖドメインは抗原結合を媒介し、その特定抗原に対する特定抗体の特異性を限定する。しかしながら、変異性は、可変ドメインの１１０アミノ酸全長を通して等しく分布するわけではない。その代わりに、Ｖ領域は、各々９～１２アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極端な変異性を有するより短い領域により分離される１５～３０アミノ酸のフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる相対的に不変の範囲からなる。ネイティブ重鎖および軽鎖の可変ドメインは、主にβシート形状を採り、各々、βシート構造を結合し、いくつかの場合にはその一部を構成するループを形成する３つの超可変領域により連結される、４つのＦＲを含む。各鎖中の超可変領域は、ＦＲにより、他の鎖からの超可変領域とぴったり近接して一緒に保持されて、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)参照）。定常ドメインは、抗体と抗原との結合に直接的に関与しないが、しかし、抗体依存性細胞性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）に抗体が関わるといったような種々のエフェクター機能を示す。
【００９２】
「無傷」抗体は、抗原結合部位、ならびにC_Lおよび少なくとも重鎖定常ドメインC_H1、C_H2およびC_H3を含むものである。定常ドメインは、ネイティブ配列定常ドメイン（例えば、ヒトネイティブ配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異体であり得る。好ましくは、無傷抗体は、１つ以上のエフェクター機能を有する。
【００９３】
本明細書中の目的のための「裸の抗体」は、細胞傷害性部分または放射性標識と接合されない抗体である。
【００９４】
「抗体断片」は、無傷抗体の一部、好ましくは無傷抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$およびＦｖ断片；ダイアボディ；線状抗体(米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]参照)；一本鎖抗体分子；および多抗体断片から形成される重特異性抗体が挙げられる。一実施形態では、抗体断片は、無傷抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原に結合する能力を保持する。
【００９５】
抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片、および残留「Ｆｃ」断片（容易に結晶化する能力を反映する呼称）を産生する。Ｆａｂ断片は、Ｈ鎖の可変領域ドメインともに完全Ｌ鎖、ならびに１つの重鎖の第一定常ドメイン（C_H1）からなる。各Ｆａｂ断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、それは単一抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、単一大型$F(ab')_2$断片を生じるが、これは二価抗原結合活性を有する２つのジスルフィド連結Ｆａｂ断片にほぼ対応し、そして依然として抗原を架橋し得る。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域からの１つ以上のシステインを含めてC_H1ドメインのカルボキシ末端に付加的な少数の残基を有する点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基（単数または複数）が遊離チオール基を保有するＦａｂ’に関する本明細書中での呼称である。$F(ab')_2$抗体断片は、本来は、それらの間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的対合も知られている。
【００９６】
Ｆｃ断片は、ジスルフィドにより一緒に保持される両Ｈ鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ領域中の配列により決定され、この領域は、ある型の細胞上に見出されるＦｃ受容体（ＦｃＲ）により認識される部分でもある。
【００９７】
「Ｆｖ」は、完全抗原認識および結合部位を含有する最小抗体断片である。この断片は、堅い非共有的会合で、１つの重鎖および１つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる

。一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）種では、軽鎖および重鎖が２鎖Ｆｖ種の場合と類似の「二量体」構造で会合し得るよう、１つの重鎖および１つの軽鎖可変ドメインは、柔軟なペプチドにより共有結合され得る。これらの２つのドメインの畳み込みから、抗原結合のためのアミノ酸残基を寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する６つの超可変ループ（ＨおよびＬ鎖からの各々３つのループ）を生じる。しかしながら、単一可変ドメイン（または３つのＣＤＲの未を含むＦｖの半分）でさえ、全結合部位より低い親和性ではあるが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

【００９８】

「ｓＦｖ」または「ｓｃＦｖ」とも略される「一本鎖Ｆｖ」は、単一ポリペプチド鎖に連結されるＶ$_H$およびＶ$_L$抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、ｓＦｖポリペプチドはさらに、Ｖ$_H$およびＶ$_L$ドメイン間にポリペプチドリンカーを含み、これが抗原結合のための所望の構造をｓＦｖに形成させる。ｓＦｖ考察に関しては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995（下記）を参照されたい。

【００９９】

「ダイアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する抗体断片を指し、この断片は、同一ポリペプチド鎖(ＶＨ－ＶＬ)で軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と連結される重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。小抗体断片は、Ｖドメインの鎖間対合は達成されるが、鎖内対合は達成されず、二価断片、すなわち２つの抗原結合部位を有する断片を生じるよう、Ｖ$_H$およびＶ$_L$ドメイン間に短いリンカー（約５～１０残基）を用いてｓＦｖ断片（前段落参照）を構築することにより調製される。ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る。二重特異性ダイアボディは、２つの抗体のＶ$_H$およびＶ$_L$ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する２つの「交差」ｓＦｖ断片のヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えばＥＰ　４０４，０９７；ＷＯ　９３／１１１６１；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003);およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)にさらに詳細に記載されている。トリアボディおよびテトラボディも、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

【０１００】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書中で用いる場合、実質的に均質の抗体の一集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を含む抗体は、少量で存在し得るおそらくは天然の突然変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一抗原部位に対して向けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられる抗体を含むポリクローナル抗体調製物に対比して、各モノクローナル抗体は、抗体上の単一の決定基に向けられる。特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体の夾雑を伴わずに合成され得る点で有益である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定方法による抗体の産生を要すると意図されるべきでない。例えば、本発明に有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法により調製され得るし、あるいは細菌、真核生物動物または植物において組換えＤＮＡ法を用いて作製され得る（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号参照）。「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載された技法を用いて、ファージ抗体ライブラリーからも単離され得る。

【０１０１】

モノクローナル抗体は、本明細書中では、重鎖および／または軽鎖の一部が特定種に由来するかまたは特定抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同であるが、一方、鎖（単数または複数）の残り部分は、それらが所望の生物学的活性を示す限り、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、ならびにこのような抗体の断片中の対応する配列と同一であるかまたは相同である「キメラ」抗体を包含する（米国特許第４，８１６，５６７号；およびMorrison e

t al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)参照）。本明細書中の、対象とするキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば、旧世界サル、類人猿等）由来の可変ドメイン抗原結合配列、およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を包含する。

【０１０２】

「ヒト化」型の非ヒト（例えば齧歯類）抗体は、非ヒト抗体由来の最小配列を含有するキメラ抗体である。大体において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、非ヒト種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の超可変領域からの残基が置き換えられた、所望の抗体特異性、親和性および能力を有するヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中に、またはドナー抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するためになされる。概して、ヒト化抗体は、少なくとも１つの、典型的には２つの可変ドメインのうちの実質的にすべてを含み、この場合、超可変ループの全てまたは実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そしてＦＲの全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意に、（典型的にはヒト免疫グロブリンの）免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部も含む。さらなる詳細に関しては、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988);およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。以下の再検討論文およびそこに引用された参考文献も参照されたい：Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol., 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994)。

【０１０３】

「チオ」は、抗体に言及するために本明細書中で用いる場合、システイン操作された抗体を指すが、一方、「ｈｕ」は、抗体に言及するために本明細書中で用いる場合、ヒト化抗体を指す。

【０１０４】

「ヒト化抗体」は、ヒトにより産生される抗体のものに対応する朝配列を保有するものであり、および／または本明細書中に開示されるようなヒト抗体を作製するための技法のいずれかを用いて作製されたものである。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の種々の技法、例えばファージ表示ライブラリーを用いて産生され得る（Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)）。Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)；Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)に記載された方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原投与に応答してこのような抗体を産生するよう修飾されているが、その内在遺伝子座は無能力化されているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに、抗原を投与することにより調製され得る（ゼノマウス（商標）技術に関しては、例えば、米国特許第６，０７５，１８１号および第６，１５０，５８４号参照）。ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体に関しては、例えば、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)参照。

【０１０５】

「超可変領域」、「ＨＶＲ」または「ＨＶ」という用語は、本明細書中で用いる場合、配列中で超可変性であるか、および／または構造的に限定されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般的に、抗体は、以下の６つの超可変領域を含む：ＶＨ中に３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、およびＶＬ中に３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）。多数の超可変領域の区画決定が用いられ、本明細書中に包含されている。カバト相補性決定領域（ＣＤＲ）は配列変異性に基づいており、最も一般的に用いられるものである（Kabat et al., Se

quences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。コチアは、そうではなくて、構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。コチアＣＤＲ－Ｈ１ループの末端は、カバト番号付け規約を用いて番号付けされる場合、ループの長さによってＨ３２～Ｈ３４の間で変わる（これは、カバト番号付けスキームがＨ３５ＡおよびＨ３５Ｂで挿入物を配置するためである；３５Ａも３５Ｂも存在しない場合、ループは３２で終わる；３５Ａのみが存在する場合、ループは３３で終わる；３５Ａおよび３５Ｂがともに存在する場合、ループは３４で終わる）。ＡｂＭ超可変領域はカバトＣＤＲおよびコチア構造ループ間の中間物を表わし、そしてOxford MolecularのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアにより用いられる。「接触」超可変領域は、利用可能な複合結晶構造の分析に基づいている。これらの超可変領域の各々からの残基を、以下に示す。

ループ	カバト	AbM	コチア	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
	(カバト番号付け)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(コチア番号付け)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

【０１０６】

超可変領域は、以下のような「伸長された超可変領域」を含み得る：ＶＬ中の２４～３６または２４～３４（Ｌ１）、４６～５６または５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）、ならびにＶＨ中の２６～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～６５、４７～６５または４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２、９４－１０２または９５～１０２（Ｈ３）。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々に関して、Kabat et al.（上記）に従って番号付けされる。

【０１０７】

「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、本明細書中で定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【０１０８】

「カバトにおけるような可変ドメイン残基番号付け」または「カバトにおけるようなアミノ酸位置番号付け」という用語、ならびにその変形は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)における抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに関して用いられる番号付け体系を指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲの短縮またはその中への挿入に対応して、より少ないかまたは付加的なアミノ酸を含有し得る。例えば重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後に単一アミノ酸挿入物（カバトによると残基５２ａ）を、ならびに重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入残基（例えばカバトによると残基８２ａ、８２ｂおよび８２ｃ等）を含み得る。残基のカバト番号付けは、「標準」カバト番号付けされ

た配列との抗体の配列の相同性の領域でのアラインメントにより所定の抗体に関して決定され得る。

【０１０９】

カバト番号付けシステムは、可変ドメイン中の一残基に言及する際（大体、軽鎖の残基１～１０７および重鎖の残基１～１１３）、一般的に用いられる（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。「ＥＵ番号付けシステム」または「ＥＵインデックス」は、免疫グロブリン重鎖定常領域中の一残基に言及する際に、一般的に用いられる（例えばKabat et al.（上記）で報告）。「カバトにおけるようなＥＵインデックス」は、ヒトＩｇＧ１　ＥＵ抗体の残基番号付けを指す。本明細書中で別記しない限り、抗体の可変ドメイン中の残基数への言及は、カバト番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。本明細書中で別記しない限り、抗体の定常ドメイン中の残基数への言及は、ＥＵ番号付けシステムによる残基番号付けを意味する（ＥＵ番号付けに関しては、例えば米国特許仮出願６０／６４０，３２３号の図面を参照）。

【０１１０】

「親和性成熟」抗体は、それらの変更（単数または複数）を保有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性における改良を生じるその１つ以上のＨＶＲにおける１つ以上の変更を有するものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対するナノモル親和性を、またはピコモル親和性さえ有する。親和性成熟抗体は、当該技術分野で既知の手法により産生される。Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)は、ＶＨおよびＶＬドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載する。ＨＶＲおよび／またはフレームワーク残基の無作為突然変異誘発は、Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813 (1994)；Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)；Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；およびHawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)により記載されている。

【０１１１】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を抑制するかまたは低減するものである。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にまたは完全に抑制する。

【０１１２】

「アゴニスト抗体」は、本明細書中で用いる場合、対象とするポリペプチドの機能活性のうちの少なくとも１つを模倣する抗体である。

【０１１３】

「種依存性抗体」、例えば哺乳類抗ヒトＩｇＥ抗体は、第二哺乳類種からのその抗原の相当物に対してそれが有するより強い、第一哺乳類種からの抗原に対する結合親和性を有する抗体である。通常は、種依存性抗体は、ヒト抗原と「特異的に結合する」（すなわち、約1×10^{-7}Ｍ以下、好ましくは約1×10^{-8}以下、最も好ましくは約1×10^{-9}Ｍ以下の結合親和性（Ｋｄ）値を有する）が、しかしヒト抗原に対するその結合親和性の少なくとも約５０分の１、または少なくとも約５００分の１、または少なくとも約１０００分の１である第二非ヒト哺乳類種からの抗原の相当物に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上記のような抗体の種々の型のうちのいずれかのものであり得るが、しかし好ましくは、ヒト化またはヒト抗体である。

【０１１４】

「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合相手（例えば抗原）との間の非共有的相互作用の総和の強度を指す。別記しない限り、本明細書中で用いる場合、「結合親和性」は、結合対の成員（例えば抗体および抗原）間の１：１相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘの、その相手Ｙに対する親和性は、一般的に、解離定数（Ｋｄ）により表され得る。親和性は、本明細書中に記載されるものを含めて当該技術分野で既知の一般方法により、測定され得る。低親和性抗体は一般的に、抗減をゆっくり結合し、そして容易に解離する傾向があるが、一方、高親和性抗体は一般

的に、より速く抗原を結合し、そしてより長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法は当該技術分野で知られており、これらのいずれも、本発明の目的のために用いることができる。具体的な例となる実施形態は、以下で記載される。

【０１１５】

「あるいはより良好な」は、結合親和性に言及するために本明細書中で用いられる場合、分子とその結合相手との間のより強力な結合を指す。「あるいはより良好な」は、本明細書中で用いる場合、より小さい数値のＫｄにより表されるより強力な結合を指す。例えば、「．６ｎＭまたはより良好な」抗減に対する親和性を有する抗体では、抗原に対する抗体の親和性は、＜．６ｎＭ、すなわち、．５９ｎＭ、．５８ｎＭ、．５７ｎＭなどまたは．６ｎＭ未満の任意の値である。

【０１１６】

一実施形態では、本発明による「Ｋｄ」または「Ｋｄ値」は、非標識抗原の一連の滴定存在下で、Ｆａｂを最小濃度の（^{125}Ｉ）－標識抗減と平衡させ、次いで、抗Ｆａｂ抗体被覆プレートで結合抗原を捕捉することにより抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性を測定する以下の検定により記載されるように、当該抗体のＦａｂ版およびその抗原を用いて実施される放射能標識抗原結合検定（ＲＩＡ）により測定される（Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881）。検定のための条件を確立するために、微量滴定プレート（Dynex）を、５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中の５μｇ／ｍｌの捕捉抗Ｆａｂ抗体（Cappel Labs）で一晩被覆し、その後、ＰＢＳ中の２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミンで、室温（約２３℃）で２～４時間、遮断する。非吸着プレート（Nunc ＃２６９６２０）中で、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］－抗原を、当該Ｆａｂの連続希釈液と混合する（例えば、Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599における抗ＶＥＧＦ抗体の査定と一致）。次いで、当該Ｆａｂを一晩インキュベートする；しかしながら、平衡に到達したことを保証するために、インキュベーションはより長い期間（例えば６５時間）継続し得る。その後、室温でのインキュベーションのために、混合物を捕捉プレートに移す（例えば、１時間）。次に、溶液を除去し、プレートをＰＢＳ中の０．１％トゥイーン－２０で８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルのシンチラント（scintillant）（MicroScint-２０；Packard）を付加し、Topcountガンマ計数器（Packard）で１０分間、プレートを計数する。２０％以下の最大結合を生じる各Ｆａｂの濃度を、競合結合検定に用いるために選択する。

【０１１７】

別の実施形態によれば、ＫｄまたはＫｄ値は、約１０応答単位（ＲＵ）で固定化抗原ＣＭチップとともに２５ＣでＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いて、表面プラズモン共鳴検定を用いることにより測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ（ＣＭ５、BIAcore, Inc.）が、供給もとの使用説明書に従って、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）で活性化される。抗原は、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８で５μｇ／ｍｇ（～０．２μＭ）に希釈された後、５μｌ／分の流量で注入して、約１０応答単位（ＲＵ）の共役タンパク質を達成する。抗原の注入後、１Ｍエタノールアミンを注入して、非反応基を遮断する。動態測定のため、Ｆａｂの２倍連続希釈（０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）が、２５℃で約２５μｌ／分の流量で、０．０５％トゥイーン２０（ＰＢＳＴ）とともにＰＢＳ中で注入される。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、会合および解離センサーグラムを同時適合させることにより、単純な１対１ラングミュア結合モデル（BIAcore Evaluationソフトウェア、バージョン３．２）を用いて算定される。平衡解離定数（Ｋｄ）は、比k_{off}/k_{on}として算定される（例えばChen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881参照）。オンレートが上記の表面プラズモン共鳴検定により$10^{6}M^{-1}S^{-1}$を超える場合には、オンレートは、分光計、例えばストップフロー分光光度計（Aviv Instruments）または撹拌赤色キュベットを有する８０００系ＳＬＭ－アミノ分光光度計（ThermoSpectronic）で測定して、

増加する濃度の抗体の存在下で、２５℃で、ｐＨ７．２のＰＢＳ中の２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂの形態）の蛍光放射強度の増加または減少（励起＝２９５ｎｍ、放射＝３４０ｎｍ、１６ｎｍの帯域通過）を測定する消蛍光手法を用いて、決定することができる。

【０１１８】

本発明による「オンレート」または「会合の速度」または「会合速度」または「k_{on}」は、上記のＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いて、上記の同一表面プラズモン共鳴検定でも確定され得る。

【０１１９】

「実質的に類似の」または「実質的に同一の」という語句は、本明細書中で用いる場合、２つの数値（一般的に、本発明の抗体と関連したものと、参照／比較抗体と関連した他のもの）間の十分に高度の類似性で、上記の値（例えば、Ｋｄ値）により測定される生物学的特質の文脈で、その２つの値間の差が、生物学的および／または統計学的意義をほとんどまたは全く有さないと、当業者がみなすであろうものを意味する。上記２つの値の間の差は、参照／比較抗体に関する値の一関数として、好ましくは約５０％未満、好ましくは約４０％未満、好ましくは約３０％未満、好ましくは約２０％未満、好ましくは約１０％未満である。

【０１２０】

「実質的に低減される」または「実質的に異なる」という語句は、本明細書中で用いる場合、２つの数値（一般的に、本発明の抗体と関連したものと、参照／比較抗体と関連した他のもの）間の十分に高度の差で、上記の値（例えばＫｄ値、ＨＡＭＡ応答）により測定される生物学的特質の文脈で、その２つの値間の差が、統計学的意義を有すると、当業者がみなすであろうものを意味する。上記２つの値の間の差は、参照／比較抗体に関する値の一関数として、好ましくは約１０％より高く、好ましくは約２０％より高く、好ましくは約３０％より高く、好ましくは約４０％より高く、好ましくは約５０％より高い。

【０１２１】

「抗原」は、抗体が選択的に結合し得る既定の抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテンまたは他の天然または合成化合物であり得る。好ましくは、標的抗原はポリペプチドである。

【０１２２】

本明細書中の目的のための「受容体ヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク由来の、あるいはヒト共通フレームワーク由来のＶＬまたはＶＨフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒト共通フレームワーク「由来の」受容体ヒトフレームワークは、その同一アミノ酸配列を含み得るし、あるいは先在性アミノ酸配列変化を含有し得る。先在性アミノ酸変化が存在する場合、好ましくは、５以下、好ましくは４以下、または３以下の先在性アミノ酸変化が存在する。先在性アミノ酸変化がＶＨ中に存在する場合、好ましくはそれらの変化は、位置７１Ｈ、７３Ｈおよび７８Ｈのうちの３、２または１つだけである；例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、７１Ａ、７３Ｔおよび／または７８Ａであり得る。一実施形態では、ＶＬ受容体ヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒト共通フレームワーク配列と配列が同一である。

【０１２３】

「ヒト共通フレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨフレームワーク配列の選択において最も普通に出現するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列の亜群からである。一般的に、配列の亜群は、Kabatらにおけるような亜群である。一実施形態では、ＶＬに関しては、亜群は、Kabatらにおけるような亜群κＩである。一実施形態では、ＶＨに関しては、亜群は、Kabatらにおけるような亜群ＩＩＩである。

【０１２４】

「ＶＨ亜群ＩＩＩ共通フレームワーク」は、Kabatらの可変重鎖亜群ＩＩＩ中のアミノ

酸配列から得られる共通配列を含む。一実施形態では、ＶＨ亜群ＩＩＩ共通フレームワークアミノ酸配列は、以下の配列の各々の少なくとも一部または全部を含む：ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳ（配列番号４９）－Ｈ１－ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ（配列番号５０）－Ｈ２－ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ（配列番号５１）－Ｈ３－ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号５２）。

【０１２５】

「ＶＬ亜群Ｉ共通フレームワーク」は、Kabatらの可変軽鎖カッパ亜群Ｉ中のアミノ酸配列から得られる共通配列を含む。一実施形態では、ＶＬ亜群Ｉ共通フレームワークアミノ酸配列は、以下の配列の各々の少なくとも一部または全部を含む：ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ（配列番号４５）－Ｌ１－ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号４６）－Ｌ２－ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号４７）－Ｌ３－ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号４８）。

【０１２６】

「非修飾ヒトフレームワーク」は、受容体ヒトフレームワークと同一アミノ酸配列を有するヒトフレームワークであり、例えば、受容体ヒトフレームワーク中のヒト－非ヒトアミノ酸置換（単数または複数）を欠いている。

【０１２７】

本明細書中の目的のための「変更超可変領域」は、その中に１つ以上（例えば１～約１６）のアミノ酸置換を含む超可変領域である。

【０１２８】

本明細書中の目的のための「非修飾超可変領域」は、それが由来する非ヒト抗体と同一アミノ酸配列を有する超可変領域、すなわち、その中に１つ以上のアミノ酸置換を欠くものである。

【０１２９】

当該抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的に「結合する」抗体は、抗体が、抗原を発現する細胞または組織を標的とするに際して治療薬として有用であり、そして他のタンパク質と有意に交差反応しないよう、十分な親和性で抗原を結合するものである。このような実施形態では、抗体と「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）分析または放射免疫沈降法（ＲＩＡ）により確定して、抗体とその特定標的タンパク質との結合の約１０％未満である。抗体と標的分子との結合に関して、特定ポリペプチドまたは特定ポリペプチド標的上のエピトープ「の特異的結合」または、「と特異的に結合する」または「に対して特異的」であるという用語は、非特異的相互作用とは測定可能的に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般的に、結合活性を有さない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較して、一分子の結合を確定することにより測定され得る。例えば、特異的結合は、標的、例えば過剰量の非標識標的と類似する対照分子との競合により確定され得る。この場合、特異的結合は、標識標的とプローブとの結合が過剰量の非標識標的により競合的に抑制される場合に、示される。本明細書中で用いられるような特定ポリペプチドまたは特定ポリペプチド標的上のエピトープ「の特異的結合」または、「と特異的に結合する」または「に対して特異的」であるという用語は、例えば、少なくとも約10^{-1}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-5}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-6}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-7}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-8}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-9}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-10}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-11}Ｍ、代替的には少なくとも約10^{-12}Ｍまたはそれ以上の標的に対するＫｄを有する分子により示され得る。一実施形態では、「特異的結合」という用語は、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープと実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定ポリペプチド上のエピトープと一分子が結合する場合の結合を指す。

【０１３０】

「ＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現する腫瘍細胞の増殖を抑制する」抗体または「増殖抑制」抗体は、適切なＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現するかまたは過剰発現する癌細胞の測

定可能な増殖抑制を生じるものである。ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、癌細胞の表面で発現される膜貫通ポリペプチドであり得るし、あるいは癌細胞により産生され、分泌されるポリペプチドであり得る。好ましい増殖抑制抗ＦｃＲＨ５抗体は、適切な対照（対照は、典型的には、試験されている抗体で処置されない腫瘍細胞である）と比較した場合、２０％より大きく、好ましくは約２０％～約５０％、さらに好ましくは５０％より大きく（例えば約５０％～約１００％）、ＦｃＲＨ５発現腫瘍細胞の増殖を抑制する。一実施形態では、増殖抑制は、細胞培養中約０．１～３０μｇ／ｍｌまたは約０．５ｎＭ～２００ｎＭの抗体濃度で測定され得、ここで、増殖抑制は、抗体に腫瘍細胞を曝露後１～１０日目に確定される。in vivoでの腫瘍細胞の増殖抑制は、以下の実験実施例の項に記載されるような種々の方法で確定され得る。約１μｇ／体重１ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇでの抗ＦｃＲＨ５抗体の投与が、抗体の初回投与から約５日ないし３ヶ月以内、好ましくは約５～３０日以内に腫瘍サイズまたは腫瘍細胞増殖の低減を生じる場合、抗体はin vivoで増殖抑制性である。

【０１３１】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンＶの結合、ＤＮＡの断片化、細胞縮み、小胞体の拡張、細胞断片化および／または膜小胞（アポトーシス小体）の形成により確定されるようなプログラムされた細胞死を誘導するものである。細胞は、通常は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、細胞は、腫瘍細胞、例えば造血系細胞、例えばＢ細胞、Ｔ細胞、好塩基球、好酸球、好中球、単球、血小板または赤血球である。アポトーシスに関連した細胞事象を評価するために、種々の方法が利用可能である。例えば、ホスファチジルセリン（ＰＳ）転位は、アネキシン結合により測定され得る；ＤＮＡ断片化は、ＤＮＡ梯子形成により評価され得る；そしてＤＮＡ断片化を伴う核／クロマチン縮合は、低二倍体細胞中での任意の増加により評価され得る。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、アネキシン結合検定における非処置細胞に比して、アネキシン結合の、約２～５０倍、好ましくは約５～５０倍、最も好ましくは約１０～５０倍の誘導を生じるものである。

【０１３２】

「細胞死を誘導する」抗体は、生存細胞を非生存性にさせるものである。当該細胞は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現するものであり、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを特異的に発現するかまたは過剰発現する細胞型を有する。当該細胞は、特定細胞型の癌性または正常細胞であり得る。ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、癌細胞の表面で発現される膜貫通ポリペプチドであり得るし、あるいは癌細胞により産生され、分泌されるポリペプチドであり得る。当該細胞は、癌細胞、例えばＢ細胞またはＴ細胞であり得る。in vitroでの細胞死は、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で確定されて、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）により誘導される細胞死を区別し得る。したがって、細胞死に関する検定は、熱不活性化血清を用いて（すなわち、補体の非存在下で）、そして免疫エフェクター細胞の非存在下で実施され得る。抗体が細胞死を誘導し得るか否かを確定するために、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー（Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11 (1995)参照）または７ＡＡＤの取込みにより評価されるような膜完全性の損失が、非処置細胞と比較して、査定され得る。好ましい細胞死誘導抗体は、ＢＴ４７４細胞におけるＰＩ取込み検定においてＰＩ取込みを誘導するものである。

【０１３３】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のＦｃ領域（ネイティブ配列Ｆｃ領域またはアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域）に起因すると考えられる生物学的活性を指し、抗体アイソタイプに伴って変わる。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害性；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えばＢ細胞受容体）の下方調節；およびＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１３４】

「Ｆｃ領域」という用語は、本明細書中では、ネイティブ配列Ｆｃ領域および変異体Ｆ

ｃ領域を含む、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を意味するために用いられる。免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の境界は変わり得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、通常は、位置Ｃｙｓ２２６のアミノ酸残基から、またはＰｒｏ２３０から、そのカルボキシル末端への範囲であると定義される。Ｆｃ領域のＣ末端リシン（ＥＵ番号付けシステムによる残基４４７）は、例えば抗体の産生または精製中に、あるいは抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することにより、除去され得る。したがって、無傷抗体の組成物は、除去される全てのＫ４４７残基を伴う抗体集団、除去されるＫ４４７残基を有さない抗体集団、ならびにＫ４４７残基を伴うかまたは伴わない抗体の混合物を有する抗体集団を含み得る。

【０１３５】

「機能性Ｆｃ領域」は、ネイティブ配列Ｆｃ領域の「エフェクター機能」を保有する。「エフェクター機能」の例としては、Ｃ１ｑ結合；ＣＤＣ；Ｆｃ受容体結合；ＡＤＣＣ；食作用；細胞表面受容体（例えばＢ細胞受容体；ＢＣＲ）の下方調節等が挙げられる。このようなエフェクター機能は、一般的に、Ｆｃ領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組合されることを要し、例えば本明細書中の定義に開示されるような種々の検定を用いて査定され得る。

【０１３６】

「ネイティブ配列Ｆｃ領域」は、現実に見出されるＦｃ領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。ネイティブ配列ヒトＦｃ領域としては、ネイティブ配列ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域（非ＡおよびＡアロタイプ）；ネイティブ配列ヒトＩｇＧ　２Ｆｃ領域；ネイティブ配列ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域；およびネイティブ配列ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域、ならびにその天然変異体が挙げられる。

【０１３７】

「変異体Ｆｃ領域」は、少なくとも１つのアミノ酸修飾、好ましくは１つ以上のアミノ酸置換（単数または複数）によって、ネイティブ配列Ｆｃ領域のものと異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体Ｆｃ領域は、ネイティブ配列Ｆｃ領域と、または親ポリペプチドのＦｃ領域と比較して、少なくとも１つのアミノ酸置換、例えばネイティブ配列Ｆｃ領域における、または親ポリペプチドのＦｃ領域における、約１～約１０のアミノ酸置換、好ましくは約１～約５のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体Ｆｃ領域は、ネイティブ配列Ｆｃ領域と、および／または親ポリペプチドのＦｃ領域と、好ましくは少なくとも約８０％の相同性を、最も好ましくはそれと少なくとも約９０％の相同性を、さらに好ましくはそれと少なくとも約９５％の相同性を保有する。

【０１３８】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」または「ＡＤＣＣ」は、ある細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するＦｃ受容体（ＦｃＲ）上に結合される分泌Ｉｇがこれらの細胞傷害性エフェクター細胞を抗原保有標的細胞と特異的に結合させ、その後、細胞毒で標的細胞を殺害させる細胞傷害性の一形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装させ」、このような殺害のために絶対的に必要とされる。ＡＤＣＣを媒介するための第一細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現するが、一方、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞上でのＦｃＲ発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の４６４ページの表３に要約されている。当該分子のＡＤＣＣ活性を査定するために、米国特許第５，５００，３６２号または第５，８２１，３３７号に記載されているようなin vitroＡＤＣＣ検定が実施され得る。このような検定のための有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。代替的に、またはそれに加えて、当該分子のＡＤＣＣ活性は、例えばClynes et al. (USA) 95:652-656 (1998)に開示されたような動物モデルにおいて、in vivoで査定され得る。

【０１３９】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域と結合する受容体を表す。好ましいＦｃＲは、ネイティブ配列ヒトＦｃＲである。さらに、好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体

を結合するもの（γ受容体）であり、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩ亜群、例えば対立遺伝子変異体、ならびに代替的にはスプライス化型のこれらの受容体が挙げられる。ＦｃγＲＩＩ受容体としては、ＦｃγＲＩＩＡ（[活性化受容体]）およびＦｃγＲＩＩＢ（「抑制受容体」）が挙げられ、これらは、その細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＩＭ）を含有する（Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)のレビューMを参照）。ＦｃＲは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)；Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)；およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)で再検討されている。他のＦｃＲ、例えば将来的に特定されるべきものは、本明細書中の「ＦｃＲ」という用語に包含される。当該用語は、母親のＩｇＧが胎仔に移入するのに関与する新生児受容体ＦｃＲｎも包含する（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）。

【０１４０】

ヒトＦｃＲｎとのin vivoでの結合、ならびにヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清中寿命は、例えばヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウスまたはトランスフェクト化ヒト細胞株において、あるいは変異体Ｆｃ領域を有するポリペプチドが投与される霊長類において、検定され得る。ＷＯ　２０００／４２０７２（Presta）は、ＦｃＲとの結合を改良されるかまたは減少された抗体変異体を記載する（例えばShields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)も参照）。

【０１４１】

「ヒトエフェクター細胞」は、１つ以上のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を実施する白血球である。好ましくは、当該細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実施する。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞傷害性Ｔ細胞および好中球が挙げられる；ＰＢＭＣおよびＮＫ細胞が好ましい。エフェクター細胞は、ネイティブ供給源から、例えば血液から単離され得る。

【０１４２】

「補体依存性細胞傷害性」または「ＣＤＣ」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系（Ｃ１ｑ）の第一構成成分と、それらの同種の抗原と結合される（適切なサブクラスの）抗体との結合により開始される。補体活性化を査定するために、例えばGazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されたようなＣＤＣ検定が実施され得る。変更されたＦｃ領域アミノ酸配列を有するポリペプチド変異体（変異体Ｆｃ領域を有するポリペプチド）、ならびに増大されたまたは低減されたＣ１ｑ結合能力は、例えば米国特許第６，１９４，５５１　Ｂ１号およびＷＯ　１９９９／５１６４２に記載されている。例えば、Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)も参照されたい。

【０１４３】

「Ｆｃ領域包含抗体」という用語は、Ｆｃ領域を含む抗体を指す。Ｆｃ領域のＣ末端リシン（ＥＵ番号付けシステムによる残基４４７）は、例えば抗体の精製中に、あるいは抗体をコードする核酸を組換え操作することにより、除去され得る。したがって、本発明によるＦｃ領域を有する抗体を含む組成物は、Ｋ４４７を有する、除去される全てのＫ４４７残基を有する抗体、あるいはＫ４４７残基を有する抗体および有さない抗体の混合物を含み得る。

【０１４４】

ＦｃＲＨ５ポリペプチド「細胞外ドメイン」または「ＥＣＤ」は、膜貫通および細胞質ドメインを本質的に有さないＦｃＲＨ５ポリペプチドの一形態を指す。普通は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドＥＣＤは、１％未満のこのような膜貫通および／または細胞質ドメインを有し、好ましくは０．５％未満のこのようなドメインを有する。本発明のＦｃＲＨ５ポリペプチドに関して特定される任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を特定す

るための当該技術分野でのルーチンに用いられる判定基準に従って特定される、と理解される。膜貫通ドメインの正確な境界は、変化し得るが、ほとんど、本明細書中で最初に特定されたドメインのいずれかの末端の約５以下のアミノ酸だけ変わり得る。したがって、任意に、ＦｃＲＨ５ポリペプチドの細胞外ドメインは、実施例または明細書中で特定されるような膜貫通ドメイン／細胞外ドメイン境界のいずれかの側に約５またはそれより少ないアミノ酸を含有し得、このようなポリペプチドは、関連シグナルペプチドおよびそれらをコードする核酸を有しても、有さなくても、本発明により意図される。

【０１４５】

本明細書中に開示されるＦｃＲＨ５ポリペプチドの「シグナルペプチド」のおよその位置は、本明細書中および／または添付の図面に示され得る。しかしながら、シグナルペプチドのＣ末端境界は変わり得るが、しかしほとんど、本明細書中で最初に特定されるシグナルペプチドＣ末端境界のいずれかの側の約５以下のアミノ酸である、ということが注目されるが、この場合、シグナルペプチドのＣ末端境界は、その型のアミノ酸配列素子を特定するための当該技術分野でルーチンに用いられる判定基準に従って特定され得る（例えば、Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997)およびvon Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)）。さらに、いくつかの場合、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全に均一であるわけではなく、１つより多い分泌種を生じる、ということも認められる。これらの、シグナルペプチドが、本明細書中で特定されるシグナルペプチド、およびそれらをコードするポリヌクレオチドのＣ末端境界のいずれかの側で約５以下のアミノ酸内で切断される成熟ポリペプチドは、本発明により意図される。

【０１４６】

「ＦｃＲＨ５ポリペプチド変異体」は、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する本明細書中に記載されるようなＦｃＲＨ５ポリペプチド、好ましくは活性ＦｃＲＨ５ポリペプチド、本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠いているＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるような、シグナルペプチドを伴うかまたは伴わないＦｃＲＨ５ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示されるような全長ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、全長ＦｃＲＨ５ポリペプチドに関する完全コード配列の一部のみを表す核酸によりコードされるもの）を意味する。このようなＦｃＲＨ５ポリペプチド変異体としては、例えば、全長ネイティブアミノ酸配列のＮ－またはＣ末端で、１つ以上のアミノ酸残基が付加されるかまたは欠失されるＦｃＲＨ５ポリペプチドが挙げられる。普通は、ＦｃＲＨ５ポリペプチド変異体は、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠いているＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるような、シグナルペプチドを伴うかまたは伴わないＦｃＲＨ５ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示されるような全長ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列の任意の他の具体的に限定される断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、代替的には少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％のアミノ酸配列同一性を有する。普通は、ＦｃＲＨ５変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、代替的には少なくとも約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００アミノ酸長またはそれ以上である。任意に、ＦｃＲＨ５変異体ポリペプチドは、ネイティブＦｃＲＨ５ポリペプチド配列と比較して、１つ以下の保存的アミノ酸置換を、代替的には、ネイティブＦｃＲＨ５ポリペプチド配列と比較して、２、３、４、５、６、７、８、９または１０以下の保存的アミノ酸置換を有する。

【０１４７】
ペプチドまたはポリペプチド配列、すなわち本明細書中で特定されるＦｃＲＨ５ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列を一列に並べ、必要な場合はギャップを導入して、最大配列同一性パーセントを達成し、そして配列同一性の一部として如何なる保存的置換も考慮に入れない工程後の、特定ペプチドまたはポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列、すなわちＦｃＲＨ５ポリペプチド配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当該技術分野内である種々の方法で、例えば、公的に入手可能なコンピューターソフトウェア、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて、達成され得る。アラインメントを測定するための適切なパラメーターを、例えば、比較されている配列の全長に亘って最大アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを、当業者は決定し得る。しかしながら、本明細書中の目的のために、配列比較コンピュータープログラムＡＬＩＧＮ－２を用いてアミノ酸配列同一性％値が得られ、ここで、ＡＬＩＧＮ－２プログラムに関する完全なソースコードは、以下の表１に提示される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムはGenentech, Inc.により作製され、以下の表１に示されるソースコードは、米国著作権局（U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559）において、ユーザー文書とともにファイルされている（それは、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている）。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaを介して公開され、入手可能であり、あるいは以下の表１に提示されるソースコードからコンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ＵＮＩＸオペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄで用いるためにコンパイルされるべきである。配列比較パラメーターはすべて、ＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定され、変わらない。

【０１４８】
ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較のために用いられる場合、所定のアミノ酸配列Ａの、所定のアミノ酸配列Ｂとの、それに関するまたはそれに対するアミノ酸配列同一性％（代替的には、所定のアミノ酸配列Ｂと、それに関して、またはそれに対してある％のアミノ酸配列同一性を有するかまたは含む所定のアミノ酸配列Ａとして表され得る）は、以下のように算定される：

１００×Ｘ／Ｙの割合

（式中、Ｘは、ＡおよびＢのそのプログラムのアラインメント中で配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により同一整合性とスコアされたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列Ａの長さはアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合の、Ｂに対するＡのアミノ酸配列同一性％は、Ａに対するＢのアミノ酸配列同一性％と等しくない、と理解される。

【０１４９】
「ＦｃＲＨ５変異体ポリヌクレオチド」または「ＦｃＲＨ５変異体核酸配列」は、本明細書中で定義されるようなＦｃＲＨ５ポリペプチド、好ましくは活性ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードする、そして本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠く全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるような、シグナルペプチドを伴うかまたは伴わないＦｃＲＨ５ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示されるような全長ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、全長ＦｃＲＨ５ポリペプチドに関する完全コード配列の一部のみを表す核酸によりコードされるもの）をコードする核酸配列と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。普通は、ＦｃＲＨ５変異体ポリペプチドは、本明細書中に開示されるような全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠いている全長ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるような、シグナルペプチドを伴うかまたは伴わないＦｃＲＨ５ポリペプチド

の細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示されるような全長ＦｃＲＨ５ポリペプチド配列の任意の他の断片と、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、代替的には少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の核酸配列同一性を有する。変異体は、ネイティブヌクレオチド配列を包含しない。

【０１５０】

普通は、ＦｃＲＨ５変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約５ヌクレオチド長、代替的には少なくとも約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００、１０１０、１０２０、１０３０、１０４０、１０５０、１０６０、１０７０、１０８０、１０９０、１１００、１１１０、１１２０、１１３０、１１４０、１１５０、１１６０、１１７０、１１８０、１１９０、１２００、１２１０、１２２０、１２３０、１２４０、１２５０、１２６０、１２７０、１２８０、１２９０または１３００ヌクレオチド長であり、この文脈において、「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列長±参照長の１０％を意味する。

【０１５１】

本明細書中で特定されるＦｃＲＨ５コード核酸配列に関する「核酸配列同一性パーセント（％）」は、配列を一列に並べ、必要な場合はギャップを導入して、最大配列同一性パーセントを達成する工程後の、当該ＦｃＲＨ５核酸配列中のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。核酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当該技術分野内である種々の方法で、例えば、公的に入手可能なコンピューターソフトウェア、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて、達成され得る。しかしながら、本明細書中の目的のためには、配列比較コンピュータープログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて核酸配列同一性％値が得られるが、ここで、ＡＬＩＧＮ－２プログラムに関する完全なソースコードは、以下の表１に提示される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムはGenentech, Inc.により作製されており、以下の表１に示されるソースコードは、米国著作権局（U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559）において、ユーザー文書とともにファイルされている（それは、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている）。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaを介して公開されており、入手可能であり、あるいは以下の表１に提示されるソースコードからコンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ＵＮＩＸオペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄで用いるためにコンパイルされるべきである。配列比較パラメーターはすべて、ＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定され、変わらない。

【０１５２】

ＡＬＩＧＮ－２が核酸配列比較のために用いられる場合、所定の核酸配列Ｃの、所定の核酸配列Ｄとの、それに関するまたはそれに対する核酸配列同一性％（代替的には、所定の核酸配列Ｄと、それに関して、またはそれに対してある％の核酸配列同一性を有するか

または含む所定の核酸配列Ｃとして表され得る）は、以下のように算定される：
１００×Ｗ／Ｚの割合
（式中、Ｗは、ＣおよびＤのそのプログラムのアラインメント中で配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により同一整合性とスコアされた核酸の数であり、そしてＺは、Ｄ中のヌクレオチドの総数である）。核酸配列Ｃの長さは核酸配列Ｄの長さと等しくない場合の、Ｄに対するＣの核酸配列同一性％は、Ｃに対するＤの核酸配列同一性％と等しくない、と理解される。別記しない限り、本明細書中で用いられる核酸配列同一性％値は、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータープログラムを用いて、直前の段落で記載されたようにして得られる。

【０１５３】

他の実施形態では、ＦｃＲＨ５変異体ポリヌクレオチドは、ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、本明細書中に開示されるような全長ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズすることが可能である核酸分子である。ＦｃＲＨ５変異体ポリペプチドは、ＦｃＲＨ５変異体ポリヌクレオチドによりコードされるものであり得る。

【０１５４】

「全長コード領域」という用語は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードする核酸に言及するに際して用いられる場合、本発明の全長ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を指す（これはしばしば、添付の図面における出発および停止コドン（それを含める）間に示される）。「全長コード領域」という用語は、ＡＴＣＣ寄託核酸に言及するに際して用いられる場合、ＡＴＣＣに寄託されたベクター中に挿入されるｃＤＮＡのＦｃＲＨ５ポリペプチドコード部分を指す（これはしばしば、添付の図面における開始および停止コドン（それを含める）間に示される）（開始および停止コドンは、図中で太字で示され、下線を付される）。

【０１５５】

「単離される」は、本明細書中に開示される種々のＦｃＲＨ５ポリペプチドを記述するために用いられる場合、特定され、そしてその天然環境の構成成分から分離され、および／または回収されるポリペプチドを意味する。その天然環境の夾雑成分は、典型的には、ポリペプチドに関する治療的使用を妨げる物質であり、酵素、ホルモンならびにその他のタンパク質様または非タンパク質様溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、（１）スピニングカップ配列決定装置の使用によりＮ末端または内部アミノ酸配列のうちの少なくとも１５残基を得るのに十分な程度に、あるいは（２）クーマシーブルー、好ましくは銀染色を用いて、非還元または還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより均質になるまで、精製される。ＦｃＲＨ５ポリペプチド天然環境の少なくとも１つの構成成分が存在しないため、単離ポリペプチドはin situで組換え細胞内にポリペプチドを含む。しかしながら、普通は、単離ポリペプチドは少なくとも１つの精製工程により調製される。

【０１５６】

「単離」ＦｃＲＨ５ポリペプチドコード核酸または他のポリペプチドコード核酸は、それが、普通は、特定され、ポリペプチドコード核酸の天然供給源中で会合される少なくとも１つの夾雑核酸分子から分離される核酸分子である。単離ポリペプチドコード核酸分子は、それが実際に見出される形態または環境と異なって存在する。したがって、単離ポリペプチドコード核酸分子は、それが天然細胞中に存在するような特定のポリペプチドコード核酸分子と区別される。しかしながら、単離ポリペプチドコード核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なる染色体位置で存在するポリペプチドを普通は発現する細胞中に含入されるポリペプチドコード核酸分子を包含する。

【０１５７】

「制御配列」という用語は、特定宿主生物体中での操作可能的に連結されるコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を指す。原核生物に適している制御配列としては、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核生

物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【０１５８】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に配置される場合、「操作可能的に連結される」。例えば、プレ配列または分泌リーダーに関するＤＮＡは、それがポリペプチドの分泌に参加するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドに関するＤＮＡと操作可能的に連結され；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列と操作可能的に連結され；あるいはリボソーム結合部位は、それが翻訳を促すよう置かれる場合、コード配列と操作可能的に連結される。一般的に、「操作可能的に連結される」は、連結されているＤＮＡ配列が連続しており、そして分泌リーダーの場合、連続的で且つ読取り枠内にある、ということを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続でなければならないというわけではない。連結は、都合のよい制限部位での結紮により成し遂げられる。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが、慣用的実施に従って用いられる。

【０１５９】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者により容易に確定され、一般的に、プローブ長、洗浄温度および塩濃度に依存する経験的算定である。概して、プローブが長いほど、適正なアニーリングにはより高い温度を要するが、一方、プローブが短いほど、より低い温度を要する。ハイブリダイゼーションは、一般的には、相補鎖がそれらの融解温度より低い環境中に存在する場合、再アニーリングする変性ＤＮＡの能力によって決まる。プローブとハイブリダイズ可能配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、用いられ得る相対温度は高い。その結果、相対温度が高いほど反応条件は緊縮性が高くなりがちであるが、一方、温度が低いとそれほど高くない。ハイブリダイゼーション反応についてのさらなる詳細ならびに緊縮性の説明に関しては、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)を参照されたい。

【０１６０】

「緊縮条件」または「高緊縮性条件」は、本明細書中で定義される場合、（１）洗浄のために低イオン強度および高温を用いる、例えば０．０１５Ｍ塩化ナトリウム／０．００１５Ｍクエン酸ナトリウム／０．１％ドデシル硫酸ナトリウム（５０ＥＣ）；（２）ハイブリダイゼーション中、変性剤、例えばホルムアミド、例えば５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミドを０．１％ウシ結成アルブミン／０．１％フィコール／０．１％ポリビニルピロリドン／５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ６．５（７５０ｍＭ塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウム）とともに用いる（４２ＥＣ）；あるいは（３）５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５×デンハード溶液、音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳおよび１０％硫酸デキストラン（４２ＥＣ）を用いて溶液中で一晩ハイブリダイゼーションし、０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中で４２ＥＣで１０分間洗浄後、０．１×ＳＳＣ含有ＥＤＴＡ（５５ＥＣ）からなる高緊縮性洗浄液で１０分間洗浄する、ということにより特定され得る。

【０１６１】

「中等度緊縮条件」は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989により記載されたように特定され得、洗浄溶液、および上記のものより低緊縮性のハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度および％ＳＤＳ）の使用を包含する。中等度緊縮条件の一例は、溶液（２０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハード溶液、１０％硫酸デキストランおよび２０ｍｇ／ｍｌ変性剪断サケ精子ＤＮＡ）中での３７ＥＣでの一晩インキュベーションと、その後の１×ＳＳＣ（約３７～５０ＥＣ）中でのフィルターの洗浄である。プローブ長等のような因子を考慮することが必要である場合、温度、イオン強度

等を調整する方法を当業者は理解する。

【０１６２】

「タグされるエピトープ」という用語は、本明細書中で用いる場合、「タグポリペプチド」と融合されるＦｃＲＨ５ポリペプチドまたは抗ＦｃＲＨ５抗体を含むキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、抗体が作られ得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、さらに、それが融合されるポリペプチドの活性を妨げないよう、十分に短い。タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないよう、かなり独特でもある。適切なタグポリペプチドは、一般的に、少なくとも６個のアミノ酸残基を、通常は約８～５０個のアミノ酸残基（好ましくは約１０～２０個のアミノ酸残基）を有する。

【０１６３】

本明細書中の目的のための「活性な」または「活性」は、天然ＦｃＲＨ５の生物学的および／または免疫学的活性を保持するＦｃＲＨ５ポリペプチドの形態（単数または複数）を指し、この場合、「生物学的」活性は、ネイティブまたは天然ＦｃＲＨ５により保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の、ネイティブまたは天然ＦｃＲＨ５により引き起こされる生物学的機能（抑制的または刺激的）を指し、「免疫学的」活性は、ネイティブまたは天然ＦｃＲＨ５により保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力を指す。

【０１６４】

「アンタゴニスト」という用語は、最も広い意味で用いられ、ネイティブＦｃＲＨ５ポリペプチドの生物学的活性を、部分的にまたは完全に、遮断し、抑制し、または中和する任意の分子を包含する。同様に、「アゴニスト」という用語は、最も広い意味で用いられ、ネイティブＦｃＲＨ５ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を包含する。適切なアゴニストまたはアンタゴニスト分子は、具体的には、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体または抗体断片、ネイティブＦｃＲＨ５ポリペプチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小有機分子の断片またはアミノ酸配列変異体等を包含する。ＦｃＲＨ５ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを特定するための方法は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを、候補アゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させること、そしてＦｃＲＨ５ポリペプチドと普通は関連する１つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することからなる。

【０１６５】

「精製された」は、分子が、それが含有される試料の少なくとも９５重量％または少なくとも９８重量％の濃度で存在する、ということを意味する。

【０１６６】

「単離された」核酸分子は、例えばその天然環境中で、それが普通に会合される少なくとも１つの他の核酸分子から分離される核酸分子である。単離核酸分子は、さらに、核酸分子を普通に発現する細胞中に含入される核酸分子を包含するが、しかし核酸分子は、染色体外に、あるいはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【０１６７】

「ベクター」という用語は、本明細書中で用いる場合、それが連結された別の核酸を運搬し得る核酸分子を指す。ベクターの一つの型は「プラスミド」であり、これは、付加的ＤＮＡセグメントが結紮され得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の型のベクターは、ファージベクターである。別の型のベクターは、ウイルスベクターであって、ここでは、付加的ＤＮＡセグメントはウイルスゲノムに結紮され得る。あるベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、複製の細菌性起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノム中に組込まれ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、あるベクターは、それらが操作可能的に連結される遺伝子の発現を指図し得る。このようなベクターは、「組換え発現ベクター」（または単に「組換えベクター」）として本明細書中で言及される。概して、組換えＤＮＡ技術において

有用性を有する発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に用いられる形態であるので、互換的に用いられ得る。

【０１６８】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書中で互換的に用いられる場合、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および／またはそれらの類似体、あるいはＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼにより、あるいは合成反応により、ポリマー中に組み入れられ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体を含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの集合の前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成成分により遮られ得る。ポリヌクレオチドは、合成後、例えば標識との結合により、さらに修飾され得る。他の型の修飾としては、例えば「キャップ」、類似体による１つ以上の天然ヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電性結合によるもの（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）および荷電性結合によるもの（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、ペンダント部分を含有するもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ｐｌｙ－Ｌ－リシン等）、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラレン等）によるもの、キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾結合によるもの（例えば、アルファ・アノマー核酸等）、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチド（単数または複数）が挙げられる。さらに、糖中に普通に存在するヒドロキシル基のいずれかが、例えばホスホネート基、ホスフェート基により取って代わられ、標準的保護基により保護され、あるいは付加的ヌクレオチドとの付加的結合を調製するために活性化され得、あるいは固体または半固体支持体と結合され得る。５’および３’末端ＯＨは、リン酸化され得、あるいは１～２０個の炭素原子を有するアミンまたは有機キャッピング基部分で置換され得る。他のヒドロキシルも、標準保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドは、一般的に当該技術分野で既知である類似形態のリボースまたはでオキシリボース糖も含有し、例としては、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－アリル、２’－フルオロ－または２’－アジド－リボース、炭素環式糖類似体、アルファ－アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロースまたはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体および非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが挙げられる。１つ以上のホスホジエステル結合が、代替的連結基で置き換えられ得る。これらの代替的連結基としては、ホスフェートがＰ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、（Ｏ）ＮＲ．ｓｕｂ．２（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯまたはＣＨ．ｓｕｂ．２（「ホルムアセタル」）（式中、ＲまたはＲ’は、各々独立して、Ｈ、あるいは置換または非置換アルキル（１～２０Ｃ）である）（任意に、エーテル（－Ｏ－）結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルジルを含有する）で置き換えられる実施形態が挙げられるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。前記説明は、ＲＮＡおよびＤＮＡを含めて、本明細書中で言及される全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

【０１６９】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書中で用いる場合、一般的に（しかし必ずというわけではない）約２００ヌクレオチド長未満である短い、一般的に一本鎖の、一般的に合成のポリヌクレオチドを一般的に指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、互いに排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上記の説明は、等しく且つ十分にオリゴヌクレオチドに適用可能である。

【０１７０】

「癌」および「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞増殖を特徴とする哺

乳類における生理学的状態を指すかまたは説明する。癌の例としては、造血系癌または血液関連癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されず、脾臓の癌およびリンパ節の癌も、そして癌腫、芽細胞腫および肉腫も含まれる。癌のさらに特定の例としては、Ｂ細胞関連癌、例えば高度、中等度および低度リンパ腫（Ｂ細胞リンパ腫、例えば粘膜関連リンパ組織Ｂ細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、び漫性大細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ならびにホジキンリンパ腫およびＴ細胞リンパ腫を含む）、ならびに白血病（￥二次性白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、例えばＢ細胞白血病（ＣＤ５＋Ｂリンパ球）、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）および骨髄形成異常を含む）、ならびにその他の血液学的および／またはＢ細胞またはＴ細胞関連癌が挙げられる。付加的な造血系細胞、例えば多形核白血球、例えば好塩基球、好酸球、好中球および単球、樹状細胞、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞の癌も包含される。以下から選択される癌性Ｂ細胞増殖性障害も包含される：リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫。Ｂ細胞癌の起源としては、以下のものが挙げられる：辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫は辺縁帯における記憶Ｂ細胞中で始まり、濾胞性リンパ腫およびび漫性大Ｂ細胞リンパ腫は胚中心の明帯の中心細胞で生じ、慢性リンパ球性白血病および小リンパ球性白血病はＢ１細胞（ＣＤ５＋）で生じ、マントル細胞リンパ腫はマントル帯中のナイーブＢ細胞で生じ、バーキットリンパ腫は胚中心の暗帯の中心芽細胞で生じる。本明細書中で「造血細胞組織」と呼ばれる造血細胞を含む組織としては、胸腺および骨髄、ならびに末梢リンパ様組織、例えば脾臓、リンパ節、粘膜と関連したリンパ様組織、例えば腸関連リンパ様組織、扁桃、パイエル板および虫垂、ならびに他の粘膜に関連したリンパ様組織、例えば気管支内層が挙げられる。さらにこのような癌の特定の例としては、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌、膵臓癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、白血病およびその他のリンパ増殖性障害、ならびに種々の型の頭および首部癌が挙げられる。

【０１７１】

「Ｂ細胞悪性腫瘍」としては、本明細書中では、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、例えば低度／濾胞性ＮＨＬ、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中等度／濾胞性ＮＨＬ、中等度び漫性ＮＨＬ、高度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高度リンパ芽球性ＮＨＬ、高度小非開裂細胞ＮＨＬ、巨大腫瘤病変ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫およびワルデンシュトローム・マクログロブリネミア、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、リンパ球優位型ホジキン病（ＬＰＨＤ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、無痛性ＮＨＬ、例えば再発性無痛性ＮＨＬおよびリツキシマブ難治性無痛性ＮＨＬ；白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽細胞性白血病；マントル細胞リンパ腫；ならびにその他の血液学的悪性腫瘍が挙げられる。このような悪性腫瘍は、ＦｃＲＨ５のようなＢ細胞表面マーカーに対して向けられる抗体で処置され得る。このような疾患は、Ｂ細胞表面マーカー、例えばＦｃＲＨ５に対して向けられる抗体の投与により処置されるよう本明細書中で意図され、そして、非接合（「裸」）抗体、または本明細書中で開示されるような細胞傷害剤と接合される抗体の投与を包含する。このような疾患は、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体または抗ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体を、同時に、または連続して投与される別の抗体または抗体薬剤接合体、別の細胞傷害剤、放射線照射またはその他の処置と組合せて包含する併用療法により処置されることも本明細書中で意図される。本発明の例となる治療方法において、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、抗ＣＤ２０抗体、免疫グロブリンまたはそのＣ

Ｄ２０結合断片と組合せて、一緒にまたは逐次的に、投与される。抗ＣＤ２０抗体は、裸抗体または抗体薬剤接合体であり得る。併用療法の一実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は本発明の一抗体であり、抗ＣＤ２０抗体はリツキサン（登録商標）（リツキシマブ）である。

【０１７２】

「非ホジキンリンパ腫」または「ＮＨＬ」という用語は、本明細書中で用いる場合、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を指す。ホジキンリンパ腫は、一般的に、ホジキンリンパ腫におけるリード・シュテンベルク細胞の存在、ならびに非ホジキンリンパ腫における上記細胞の非存在により、非ホジキンリンパ腫と区別され得る。本明細書中で用いられる場合の当該用語に包含される非ホジキンリンパ腫の例としては、当該技術分野で既知の分類スキーム、例えば、Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000)に記載されたような改訂欧州米国リンパ腫（ＲＥＡＬ）スキームに従って当業者（例えば、癌学者または病理学者）により特定される任意のものが挙げられる。特に、図１１．５７、１１．５８および１１．５９の一覧を参照されたい。さらに具体的な例としては、再発性または難治性ＮＨＬ、最前線低度ＮＨＬ、ＩＩＩ／ＩＶ期ＮＨＬ、化学療法抵抗性ＮＨＬ、前駆体Ｂリンパ芽球白血病および／またはリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病および／または前リンパ球性白血病および／または小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性リンパ腫、免疫細胞腫、および／またはリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、節外辺縁帯－ＭＡＬＴリンパ腫、節性辺縁帯リンパ腫、有毛細胞白血病、形質細胞腫および／または形質細胞性骨髄腫、低度／濾胞性リンパ腫、中等度／濾胞性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、濾胞中心リンパ腫（濾胞性）、中等度び漫性ＮＨＬ、び漫性大Ｂ細胞リンパ腫、攻撃性ＮＨＬ（例えば、攻撃性最前線ＮＨＬ、および攻撃性再発性ＮＨＬ）、自系幹細胞移植後に再発するかまたはそれに対して難治性のＮＨＬ、原発性縦隔大Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出リンパ腫、高度免疫芽細胞ＮＨＬ、高度リンパ芽球ＮＨＬ、高度小非開裂細胞ＮＨＬ、大腫瘤病変ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、前駆体（末梢性）大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫および／またはセザリー症候群、皮膚リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７３】

形質細胞障害は、形質細胞クローンの非制御分裂または増殖に起因する。形質細胞は、活性化Ｂリンパ球（すなわち、Ｂ細胞）から生じる。各Ｂ細胞は、Ｂ細胞受容体として知られており、外来物質、すなわち抗原に特異的なその細胞表面に並べられる独自の受容体を産生する。Ｂ細胞受容体がその同類抗原と結合すると、受容体を発現している細胞は活性化されて細胞周期に再び入って、それ自体の多数のクローンコピーを産生する。クローンは、主に骨髄中に存在する、そして抗体として血流中に放出されるＢ細胞受容体のコピーを産生するよう特殊化される形質細胞に成熟する。形質細胞障害では、形質細胞または親Ｂ細胞は遺伝子損害を蒙って、細胞の分裂および／または活性の抑制、あるいはそれに関する正常な制御に対する非感受性を生じる。このような細胞に由来する娘形質細胞は、それらが抑制なく分裂し、および／または過剰量の同一免疫グロブリン（抗体）を生成し得るという点で悪性である。しばしば、産生される免疫グロブリンは不完全であり、あるいは血清、組織または器官（特に腎臓）中でのタンパク質（具体的障害によって、モノクローナルタンパク質、Ｍタンパク質、異常タンパク質またはアミロイドタンパク質としても知られている）の蓄積を引き起こして、器官の機能障害および／または不全をもたらし得る。形質細胞障害としては、意義不明のモノクローナルガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）、マクログロブリン血症、重鎖病および全身性軽鎖アミロイドーシス（ＡＬ）が挙げられ、これらはクローンの増殖性、骨髄関与の程度、ならびに発現されたＭタンパク質の型に基づいて識別される。さらなる形質細胞障害は、孤立性形質細胞腫、骨髄外形質細胞腫、多発性孤立性形質細胞腫、形質細胞白血病、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血

病である。新規の免疫療法、例えばリツキシマブおよびアレムツズマブは、いくつかのＢ細胞悪性腫瘍において改善された無病および全体的生存を示すが、しかし、標的抗原（それぞれＣＤ２０および死Ｄ５２）は悪性クローン性形質細胞により十分に発現されないため、このような療法は一部は形質細胞障害の治療に有効であると立証されていない。したがって、形質細胞障害の改善された療法の確認および開発が必要である（米国特許公開出願２００８０１６６７４２および２００８０３１７７４５（これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）参照）。

【０１７４】

Ｂ細胞、形質細胞および多発性骨髄腫細胞（例えばＭＭ患者試料からの細胞）上のＦｃＲＨ５（ＩＲＴＡ２）の発現は、従来、示されている（米国特許公開出願２００６０２５１６６２（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）参照）。したがって、多発性骨髄腫試料におけるＦｃＲＨ５発現パターンの点から見て、形質細胞傷害、例えば本明細書中に記載されたもの（すなわち多発性骨髄腫）、ならびに抗体分泌に関連した疾患、例えばアレルギーまたは自己免疫疾患を含めた哺乳類における腫瘍の療法のための優れた一標的である。

【０１７５】

「障害」は、本発明の物質／分子または方法を用いた処置から利益を得る任意の病状である。これは、慢性および急性の障害または疾患、例えば哺乳類が当該障害に罹りやすくする病理学的状態を包含する。本明細書中で処置される障害の例としては、癌性症状、例えば悪性および良性腫瘍；非白血病およびリンパ性悪性腫瘍；ニューロン、神経膠、星状細胞、視床下部およびその他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性および胞胚腔性障害；ならびに炎症性、免疫学的、およびその他の血管新生関連障害が挙げられるが、これらに限定されない。障害としては、さらに、癌性症状、例えばＢ細胞増殖性障害および／またはＢ細胞腫瘍、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。

【０１７６】

「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常細胞増殖に関連した障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害は癌である。

【０１７７】

「腫瘍」は、本明細書中で用いる場合、悪性であれ、良性であれ、全ての新生物性細胞成長および増殖を、ならびに全ての前癌性および癌性細胞および組織を指す。

【０１７８】

「自己免疫疾患」は、本明細書中では、個体自身の組織または器官、あるいは共分離物またはその症状発現、あるいはそれから結果的に生じる症状から生じ、それに対して向けられる疾患または障害である。これらの自己免疫性および炎症性障害の多くにおいて、多数の臨床的および実験室マーカー、例えば高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原－抗体複合体沈殿物、コルチコステロイドまたは免疫抑制処置からの利益、ならびに罹患組織中のリンパ様細胞凝集体（これらに限定されない）が存在し得る。Ｂ細胞媒介性自己免疫性疾患に関するいずれか１つの理論に限定せずに考えると、Ｂ細胞は、多数の機械学的経路、例えば自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状細胞およびＴ細胞活性化、サイトカイン合成、直接的ケモカイン放出、ならびに異所性新リンパ球生成のための病巣の提供によりヒト自己免疫疾患における病原性作用を示す。これらの経路は各々、自己免疫疾患の病態に、異なる程度に関与し得る。

【０１７９】

「自己免疫疾患」は、器官に特異的な疾患であり得（すなわち、免疫応答は、内分泌系、造血系、皮膚、心臓肺系、胃腸および肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経形等のような器官系に特異的に向けられる）、あるいは多数の器官系に影響を及ぼし得る全身性疾患（例えば、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、関節リウマチ、多発性筋炎等）で

あり得る。好ましいこのような疾患としては、自己免疫性リウマチ学的障害（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、狼瘡、例えばＳＬＥおよび狼瘡性腎炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、寒冷グロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群ならびに乾癬性関節炎）、自己免疫性胃腸および肝臓障害（例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性結腸炎およびクローン病）、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ならびにセリアック病）、血管炎（例えば、チャーグ・ストラウス血管炎、ウェーゲナー肉芽腫症および顕微鏡的多発性血管炎）、自己免疫性神経学的障害（例えば、多発性硬化症、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病および自己免疫性多発性神経障害）、腎臓障害（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群およびベルガー病）、自己免疫性皮膚科学的障害（例えば、乾癬、蕁麻疹、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡および皮膚紅斑性狼瘡）、血液学的障害（例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病および自己免疫性溶血性貧血）、アテローム硬化症、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患（例えば、内耳疾患および聴力損失）、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植および自己免疫性内分泌障害（例えば、糖尿病関連自己免疫疾患、例えばインスリン依存性真性糖尿病（ＩＤＤＭ）、アジソン病、ならびに自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーブス病および甲状腺炎））が挙げられる。さらに好ましいこのような疾患としては、例えば関節リウマチ、潰瘍性結腸炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、ＩＤＤＭ、悪性貧血、甲状腺炎および糸球体腎炎が挙げられる。

【０１８０】

いくつかの場合に上記のものを包含する本明細書中で限定されるような他の自己免疫疾患の具体的例としては、関節炎（急性および慢性の関節リウマチ、例えば若年発症性関節リウマチ、ならびにリウマチ性滑膜炎、痛風または通風性関節炎、急性免疫学的関節炎、慢性炎症性関節炎、変性関節炎、ＩＩ型コラーゲン誘発性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、スティル病、脊椎関節炎、骨関節炎、慢性進行性関節炎、変形性関節炎、原発性慢性多発性関節炎、反応性関節炎、更年期関節炎、エストロゲン欠乏性関節炎、および強直性脊椎炎／リウマチ様脊椎炎）、自己免疫性リンパ増殖性疾患、炎症性過増殖性皮膚疾患、乾癬、例えばプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬および爪の乾癬、アトピー、例えば花粉症およびヨブ症候群のようなアトピー性疾患、皮膚炎、例えば接触性皮膚炎、慢性接触性皮膚炎、剥離性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、蕁麻疹、疱疹性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、原発性刺激性接触性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎、ｘ連鎖型高ＩｇＭ症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹、例えば慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症（例えば全身性強皮症）、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症（ＭＳ）、例えば脊椎－眼ＭＳ、原発性進行性ＭＳ（ＰＰＭＳ）および再発性寛解ＭＳ（ＲＲＭＳ）、進行性全身性硬化症、アテローム硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎（ＮＭＯ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）（例えば、クローン病、自己免疫性媒介性消化器疾患、消化器炎症、結腸炎、例えば潰瘍性結腸炎、潰瘍性大腸炎、顕微鏡的結腸炎、コラーゲン結腸炎、大腸ポリープ、壊死性全腸炎および経壁結腸炎、ならびに自己免疫性炎症性腸疾患）、腸炎症、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例えば成人性または急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、髄膜炎、ブドウ膜の全部または一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液学的障害、移植片対宿主病、血管性浮腫、例えば遺伝性血管浮腫、髄膜炎におけるような脳神経損傷、妊娠性疱疹、妊娠性類天疱瘡、陰嚢の掻痒、自己免疫性早発卵巣不全、自己免疫症状のための突発性聴覚損失、ＩｇＥ媒介性疾患、例えばアナフィラキシーならびにアレルギー性およびアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスムッセン脳炎および辺縁系および／または脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または自己免疫性

ブドウ膜炎、糸球体腎炎（ＧＮ）（ネフローゼ症状を伴う場合と伴わない場合）、例えば慢性または急性糸球体腎炎、例えば原発性ＧＮ、免疫媒介性ＧＮ、膜性ＧＮ（膜性腎症）、特発性膜性ＧＮまたは特発性膜性腎症、膜性または膜性増殖性ＧＮ（ＭＰＧＮ）、例えばＩ型およびＩＩ型ならびに急速進行性ＧＮ（ＲＰＧＮ）、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、亀頭炎、例えば形質細胞限局性亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、層状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、前癌性角化症、壊疽性膿皮症、アレルギー性症状および応答、食物アレルギー、薬物アレルギー、昆虫アレルギー、希少性アレルギー性障害、例えば肥満細胞症、アレルギー反応、湿疹、例えばアレルギー性またはアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、発汗異常性湿疹および水疱性掌蹠湿疹、喘息、例えば気管支喘息、気管支喘息および自己免疫性喘息、Ｔ細胞の浸潤および慢性炎症性応答を伴う症状、妊娠中の胎児Ａ－Ｂ－Ｏ血液型のような外来抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫性心筋炎、白血球接着欠乏症、狼瘡、例えば狼瘡性腎炎、狼瘡性脳炎、小児狼瘡、非腎性狼瘡、腎臓外狼瘡、円板状狼瘡、円板状紅斑性狼瘡、狼瘡性脱毛症、ＳＬＥ、例えば皮膚ＳＬＥまたは亜急性皮膚ＳＬＥ、新生児狼瘡症候群（ＮＬＥ）および播種性紅斑性狼瘡、若年発症性（Ｉ型）真性糖尿病、例えば、小児ＩＤＤＭ、成人発症型真性糖尿病（ＩＩ型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性結腸炎、糖尿病性大型動脈障害サイトカインおよびＴリンパ球により媒介される急性および遅延性過敏症に関連した免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばリンパ腫様肉芽腫症、非顆粒球増加症、血管炎（例えば、大型血管の血管炎、例えばリウマチ性多発性筋痛および巨細胞（高安）動脈炎、中型血管の血管炎、例えば川崎病および結節性多発性動脈炎／結節性動脈周囲炎、免疫血管炎、ＣＮＳ血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壊死性血管炎、例えばフィブリン様壊死性血管炎、および全身性壊死性血管炎、ＡＮＣＡ陰性血管炎、およびＡＮＣＡ関連血管炎、例えばチャーグ・ストラウス症候群（ＣＳＳ）、ウェーゲナー肉芽腫症、ならびに顕微鏡的多発性血管炎）、一過性動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性再生不良性貧血、クームス陽性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、溶血性貧血または免疫性溶血性貧血、例えば自己免疫性溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、悪性貧血（anemia perniciosa）、アジソン病、真正赤血球性貧血または無形成（ＰＲＣＡ）、第ＩＩＩ因子欠乏症、血友病Ａ、自己免疫性好中球減少症、血球減少症、例えば汎血球減少症、白血球減少症、白血球漏出を伴う疾患、ＣＮＳ炎症性障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷または出血に派生するもの、抗原－抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スチーブン・ジョンソン症候群、類天疱瘡または天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、瘢痕性（粘膜）類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、腫瘍随伴天疱瘡、落葉性天疱瘡、天疱瘡粘膜類天疱瘡および紅斑性天疱瘡、後天性表皮水疱症、眼性炎症、好ましくはアレルギー性眼性炎症、自己免疫性多腺性内分泌障害、ライター病または症候群、自己免疫性症状のための熱損傷、子癇前症、免疫複合体障害、例えば免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、神経炎症性障害、多発性神経障害、慢性神経障害、例えばＩｇＭ多発性神経障害またはＩｇＭ媒介性神経障害、血小板減少症（例えば、心筋梗塞患者が発症）、例えば血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、輸血後紫斑病（ＰＴＰ）、ヘパリン誘発性血小板減少症および自己免疫性または免疫媒介性血小板減少症、例えば特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、例えば慢性または急性ＩＴＰ、強膜炎、例えば特発性角－強膜炎、上強膜炎、精巣および卵巣の自己免疫性疾患、例えば自己免疫性睾丸炎および卵巣炎、原発性甲状腺機能低下症、上皮小体機能低下症、自己免疫性内分泌疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）または亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼性疾患（眼症または甲状腺関連眼症）、多腺性症候群、例えば自己免疫性多腺性症候群、例えばＩ型（または多腺性内分泌障害症候群）、腫瘍随伴性症候群、例えば神経学的腫瘍随伴性症候群、例えばランバ

ート・イートン筋無力症候群またはイートン・ランバート症候群、スティフマンまたはスティフパーソン症候群、脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎またはアレルギー性脳脊髄炎（encephalomyelitis allergica）および実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連重症筋無力症、小脳変性症、神経ミオトニー、眼球クローヌスまたは眼球クローヌス・筋クローヌス症候群（ＯＭＳ）および感覚性神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、慢性肝炎、類狼瘡性肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫性慢性活動性肝炎、肺炎、例えばリンパ性間質性肺炎（ＬＩＰ）、閉鎖性細気管支炎（非移植性）対ＮＳＩＰ、ギラン・バレー症候群、ベルガー病（ＩｇＡ腎症）、特発性ＩｇＡ腎症、線状ＩｇＡ皮膚症、急性熱性好中球皮膚症、角層下膿疱性皮膚炎、一過性棘融解性皮膚炎、肝硬変、例えば原発性胆汁性肝硬変および肺肝硬変、自己免疫性腸疾患症候群、セリアック病、セリアックスプルー（グルテン性腸症）、難治性スプルー、特発性スプルー、寒冷グロブリン血症、例えば混合寒冷グロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ；ルー・ゲーリック病）、冠動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例えば自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫性聴覚損失、多発性軟骨炎、例えば難治性または再発性または再発性多発性軟骨炎、肺胞タンパク症、角膜炎、例えばコーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎、ベル麻痺、スウィート病／症候群、自己免疫性酒さ、帯状疱疹関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増加症、原発性リンパ球増加症（これはモノクローナルＢ細胞リンパ球増加症、例えば良性モノクローナル高ガンマグロブリン血症および意義未確定のモノクローナル高ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）を含む）、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例えば癲癇、片頭痛、不整脈、筋障害、難聴、失明、周期性麻痺およびＣＮＳのチャンネル病、自閉症、炎症性筋障害、病巣性または分節性あるいは病巣性分節性糸球体硬化症（ＦＳＧＳ）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓学的障害、繊維筋痛、多発性内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例えば自己免疫性脱髄性疾患および慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、全頭部脱毛症、ＣＲＥＳＴ症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、強指症および末梢血管拡張症）、（抗精原細胞抗体のための）雄性および雌性自己免疫性不妊症、混合型結合組織疾患、シャガス病、リウマチ熱、反復性流産、農夫肺、多形性紅斑、心術後症候群、クッシング症候群、鳥飼育者肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球性血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎および繊維化性肺胞炎、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫性疾患、例えばリーシュマニア症、kypanosomiasis、住血吸虫症、回虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋繊維症、び漫性間質性肺繊維症、間質性肺繊維症、繊維化縦隔炎、肺繊維症、特発性肺繊維症、嚢胞性繊維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シュルマン症候群、フェルティ症候群、フィラリア、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性または慢性）、あるいはフックス毛様体炎、ヘノッホ・シェンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染、ＳＣＩＤ、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）、エコーウイルス感染、敗血症（全身性炎症性応答症候群（ＳＩＲＳ））、内毒素血症、膵炎、甲状腺機能亢進症、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン・バーウイルス感染、おたふく風邪、エバンス症候群、自己免疫性性腺機能不全、シデナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、血栓性血管炎（thromboangitis ubiterans）、甲状腺中毒症、脊髄ろう、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛症、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例えば春季カタル、乾性角結膜炎および流行性角結膜炎、特発性ネフローゼ症候群、微小変化ネフローゼ、良性家族性および虚血再還流損傷、移植臓器再還流、自己免疫性網膜症、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道／肺疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害（脳血管機能不全）、例えば動脈硬化性脳症および動脈硬化性網膜症、aspermiogenese、自己免疫性溶血、ベック病、寒冷グロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、endophthalmia phacoanaphylactica、アレルギー性腸炎、ライ性結節性紅斑、特発性顔面神

経麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ熱、ハンマン・リッチ病、感覚神経性聴覚損失、発作性ヘモグロビン尿症（haemoglobinuria paroxysmatica）、性腺機能低下症、限局性回腸炎、白血球減少症、感染性単核球症、横断性脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感神経性眼炎（交感神経性眼炎）、新生児眼炎、視神経炎、肉芽腫性睾丸炎、膵炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルヴァン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮症、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒素性ショック症候群、食中毒、Ｔ細胞の浸潤を伴う症状、白血球接着欠乏症、サイトカインおよびＴリンパ球により媒介される急性および遅延性過敏症に関連した免疫応答、白血球漏出を伴う疾患、多臓器損傷症候群、抗原－抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、自己免疫性多発性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫性萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合型結合組織疾患、ネフローゼ症候群、膵島炎、多発性内分泌不全、自己免疫性多腺性症候群、例えばＩ型多腺性症候群、成人発症型特発性上皮小体機能低下症（ＡＯＩＨ）、心筋症、例えば遅延性心筋症、後天性表皮水疱症（ＥＢＡ）、血色素症、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨洞炎、前頭洞炎、上顎洞炎または蝶形骨洞炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球関連障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤性好酸球増加症、好酸球増加－筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球増加性肺炎、局所性肺好酸球増加症、気管支アスペルギルス症、アスペルギルス腫または好酸球を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清反応陰性脊椎関節症、多発性内分泌性自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮層カンジダ症、ブルトン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット・アルドリッヒ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、コラーゲン性疾患に関連した自己免疫性障害、リウマチ、例えば慢性関節リウマチ、リンパ腺炎、血圧応答の低下、血管機能不全、組織損傷、心臓血管性虚血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、および血管新生を伴う疾患、アレルギー性過敏性障害、糸球体腎炎、再還流損傷、虚血性再還流障害、心筋または他の組織の再還流損傷、リンパ腫様気管気管支炎、炎症性皮膚疾患、急性炎症性成分を伴う皮膚疾患、多臓器不全、水疱性疾患、腎臓皮質壊死、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性障害、眼および眼窩の炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導毒性、ナルコレプシー、急性重篤性炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎および子宮内膜炎が挙げられるが、これらに限定されない。このような疾患は、本明細書中では、Ｂ細胞表面マーカー、例えばＦｃＲＨ５と結合する抗体の投与、例えば、非接合（「裸」）抗体または本明細書中で開示されるような細胞傷害剤と接合された抗体の投与により処置されるよう意図される。このような疾患は、本明細書中では、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体または抗ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体を、同時にまたは順次投与される別の抗体または抗体薬剤接合体、別の細胞傷害剤、放射線、またはその他の処置と組合せて包含する併用療法により処置されるようにも意図される。

【０１８１】

「処置すること」または「処置」または「軽減」は、療法的処置および予防的または防止的測定の両方を指し、この場合、目的は、標的病理学的状態または障害を防止するかまたは遅らせる（低下させる）ことである。処置を必要とする者としては、障害を既に有する者、ならびに障害を有する傾向がある者または障害が防止されるべきである者が挙げられる。対象または哺乳動物は、本発明の方法に従って治療的量の抗ＦｃＲＨ５抗体を投与後に、以下のうちの１つ以上における観察可能なおよび／または測定可能な低減または非存在を患者が示す場合、ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現性癌に対して首尾よく「処置」される：癌細胞の数の低減または癌細胞の非存在；腫瘍サイズの低減；末梢器官中への癌細胞浸潤、例えば柔組織または骨への癌の蔓延の抑制（すなわち、ある程度遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍転移の抑制（すなわち、ある程度遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍増殖のある程度の抑制；および／または特定の癌に関連した症候のうちの１つ以上のある程度の軽減；罹患率および死亡率の低減、ならびに生活の質に関する問題の改善。抗ＦｃＲＨ５抗体が癌細胞の増殖を防止しおよび／または存在する癌細胞を殺害し得た結果、それは細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であり得る。

【０１８２】
疾患の上首尾の処置および改善を査定するための上記のパラメーターは、医師によく知られた慣用的手法により容易に測定可能である。癌療法に関しては、例えば、疾患進行までの時間（ＴＴＰ）を査定し、および／または応答速度（ＲＲ）を確定することにより、効率が測定され得る。転移は、段階区分試験により、ならびに骨への蔓延を確定するためのカルシウムレベルおよびその他の酵素に関する骨のスキャンおよび試験により確定され得る。領域中の骨盤およびリンパ節への拡散を探すために、ＣＴスキャンも実行され得る。胸部Ｘ線撮影ならびに既知の方法による肝臓酵素レベルの測定を用いて、それぞれ肺および肝臓への転移を探す。疾患をモニタリングするためのその他の慣例的方法としては、経直腸的超音波検査（ＴＲＵＳ）および経直腸的針生検（ＴＲＮＢ）が挙げられる。

【０１８３】
より限局性の癌である膀胱癌に関して、疾患の進行を確定するための方法としては、膀胱鏡検査による尿の細胞学的評価、尿中の血液の存在に関するモニタリング、超音波検査または静脈内腎盂Ｘ線像、コンピューター断層撮影（ＣＴ）および磁気共鳴画像処理（ＭＲＩ）による尿路上皮の可視化が挙げられる。遠隔転移の存在は、腹部のＣＴ、胸部Ｘ線または骨格の放射性核種画像処理により査定され得る。

【０１８４】
「長期」投与は、長期間、初期治療効果（活性）を保持するために、短期方式とは対照的に、連続方式での作用物質（単数または複数）の投与を指す。「間欠的」投与は、中断せずに連続して実行されるわけではなく、むしろ事実上周期的である処置である。

【０１８５】
「個体」は、脊椎動物である。ある実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物としては、農場動物（例えば雌牛）、競技動物、ペット（例えばネコ、イヌおよびウマ）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【０１８６】
癌の処置の（癌の症候の軽減する）目的のための「哺乳動物」は、哺乳類として分類される任意の動物、例えばヒト、飼育および農場動物、ならびに動物園、競技またはペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ等を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【０１８７】
１つ以上のさらなる治療薬「と組合せた」投与は、同時的（共存的）、ならびに任意の順序での連続的投与を包含する。

【０１８８】
「担体」は、本明細書中で用いる場合、用いられる投与量および濃度でそれに曝露されている細胞または哺乳動物に対して非毒性である製薬上許容可能な担体、賦形剤または安定剤を包含する。しばしば、生理学的に許容可能な担体は、ｐＨ緩衝水溶液である。生理学的に許容可能な担体の例としては、緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩およびその他の有機酸；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン；単糖、二糖およびその他の炭水化物、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート剤、例えばＥＤＴＡ；糖アルコール、例えばマンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；および／または非イオン性界面活性剤、例えばトゥイーン（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）およびプルロニック（登録商標）が挙げられる。

【０１８９】
「固相」または「固体支持体」とは、本発明の抗体が接着するかまたは結合し得る非水性マトリックスを意味する。本明細書中に包含される固相の例としては、ガラス（例えば制御多孔質ガラス）、多糖（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、

ポリビニルアルコールおよびシリコーンの一部または全部を形成するものが挙げられる。ある実施形態では、状況によって、固相は検定プレートのウェルを含み得る；他の場合、それは精製カラム（例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム）である。この用語は、米国特許第４，２７５，１４９号に記載されているもののような、離散粒子の不連続固相も包含する。

【０１９０】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬剤（例えばＦｃＲＨ５抗体）の送達のために有用である種々の型の脂質、リン脂質および／または界面活性剤からなる小胞である。リポソームの構成成分は、一般に、生物学的膜の脂質配列と類似の二重層形成で配置される。

【０１９１】

「小」分子または「小」有機分子は、約５００ダルトンより小さい分子量を有すると本明細書中では定義される。

【０１９２】

「個体」、「対象」または「患者」は、脊椎動物である。ある実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物としては、農場動物（例えば雌牛）、競技動物、ペット（例えばネコ、イヌおよびウマ）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【０１９３】

「薬学的処方物」という用語は、活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態であり、そして処方物が投与される対象に対して非許容的に有毒である付加的構成成分を含有しない調製物を指す。このような処方物は、滅菌性であり得る。

【０１９４】

「滅菌性」処方物は、全ての生きている微生物およびそれらの胞子を含有しない無菌性である。

【０１９５】

本明細書中に開示される抗体の「有効量」は、具体的に記述される目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、実験的にならびに慣例的方法で、記述される目的に関して確定され得る。

【０１９６】

「治療的有効量」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「治療する」ために有効な抗体または他の薬剤の量を指す。癌の場合、治療的有効量の薬剤は、癌細胞の数を低減し；腫瘍サイズを低減し；周囲器官への癌細胞浸潤を抑制し（すなわち、ある程度遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍転移を抑制し（すなわち、ある程度遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍増殖をある程度抑制し；および／または癌に関連した症候のうちの１つ以上をある程度軽減する。「処置する」についての本明細書中の定義を参照されたい。ある程度、薬剤は、増殖を防止し、および／または存在する癌細胞を殺害し得る。それは、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であり得る。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するのに必要な投与量で必要な時間で有効な量を指す。典型的には（しかし必ずというわけではないが）、予防的用量は疾患の前または早期段階で対象に用いられるため、予防的有効量は治療的有効量より少ない。

【０１９７】

抗ＦｃＲＨ５抗体の「増殖抑制量」は、in vitroまたはin vivoで、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の増殖を抑制し得る量である。新生物細胞増殖を抑制する目的のための抗ＦｃＲＨ５抗体の「増殖抑制量」は、実験的にまたは慣例的方法で決定され得る。

【０１９８】

抗ＦｃＲＨ５抗体の「細胞傷害量」は、in vitroまたはin vivoで、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の破壊を引き起こし得る量である。新生物細胞増殖を抑制する目的のための抗ＦｃＲＨ５抗体の「細胞傷害量」は、実験的にまたは慣例的方法で決定され得る。

【０１９９】

「ＦｃＲＨ５発現細胞」は、細胞表面に、または分泌形態で、内因性またはトランスフ

ェクト化ＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現する細胞である。「ＦｃＲＨ５発現癌」は、細胞表面に存在するＦｃＲＨ５ポリペプチドを有するか、あるいはＦｃＲＨ５ポリペプチドを産生または分泌する細胞を含む癌である。「ＦｃＲＨ５発現癌」は、任意に、抗ＦｃＲＨ５抗体をそれと結合し得る、そして癌に関して治療的効果を有するよう、十分なレベルのＦｃＲＨ５ポリペプチドをその細胞表面に産生する。別の実施形態では、「ＦｃＲＨ５発現癌」は、任意に、抗ＦｃＲＨ５抗体アンタゴニストがそれと結合し得る、そして癌に関して治療的効果を有するよう、十分なレベルのＦｃＲＨ５ポリペプチドを産生し、分泌する。後者に関しては、アンタゴニストは、腫瘍細胞による分泌ＦｃＲＨ５ポリペプチドの産生および分泌を低減し、抑制し、または防止するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。ＦｃＲＨ５ポリペプチドを「過剰発現する」癌は、同一組織型の非癌性細胞と比較して、有意に高レベルのＦｃＲＨ５ポリペプチドをその細胞表面に有するものである。このような過剰発現は、遺伝子増幅により、あるいは転写または翻訳増大により引き起こされうる。ＦｃＲＨ５ポリペプチド過剰発現は、細胞の表面に存在するかまたは細胞により分泌されるＦｃＲＨ５タンパク質のレベル増大を評価することにより（例えば、ＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードする単離核酸から組換えＤＮＡ技法を用いて調製され得る単離ＦｃＲＨ５ポリペプチドに対して調製される抗ＦｃＲＨ５抗体を用いる免疫組織化学検定（ＦＡＣＳ分析等）により）、検出または予後検定で確定され得る。代替的には、または付加的には、例えば、ＦｃＲＨ５コード核酸またはその相補体に対応する核酸ベースのプローブを用いる蛍光in situハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ：ＷＯ９８／４５４７９（１９９８年１０月公開）参照）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技法、例えば実時間定量的ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）により、細胞中のＦｃＲＨ５ポリペプチドコード核酸またはｍＲＮＡのレベルを測定し得る。例えば抗体ベースの検定を用いて、生物学的流体、例えば血清中のシェッド（shed）抗原を測定することにより、ＦｃＲＨ５ポリペプチド過剰発現を試験することもある（例えば米国特許第４，９３３，２９４号（１９９０年６月１２日発行）；ＷＯ９１／０５２６４（１９９１年４月１８日公開）；米国特許第５，４０１，６３８号（１９９５年３月２８日発行）；およびSias et al., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)も参照）。上記検定のほかに、種々のin vivo検定が当業者に利用可能である。例えば、検出可能な標識、例えば放射性同位体で任意に標識される抗体に患者の身体内の細胞を曝露し得るし、患者における細胞と抗体との結合は、例えば放射能に関する外部スキャニングにより、あるいは抗体に予め曝露された患者から採取された生検を分析することにより、評価され得る。

【０２００】

本明細書中で用いる場合、「イムノアドヘシン」という用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを併有する抗体様分子を意味する。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識および結合部位以外である（すなわち、「異種」である）所望の結合特異性を有するアミノ酸配列、ならびに免疫グロブリン定常ドメイン配列の融合物からなる。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には、受容体またはリガンドの少なくとも結合部位を含む連続アミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えばＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３またはＩｇＧ－４サブタイプ、ＩｇＡ（例えばＩｇＡ－１およびＩｇＡ－２）、ＩｇＥ、ＩｇＤまたはＩｇＭから得られ得る。

【０２０１】

「標識」という語は、本明細書中で用いる場合、「標識化」抗体を生じるよう、抗体と直接または間接的に接合される検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であり得（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、あるいは、酵素的標識の場合、検出可能である基質化合物または組成物の化学的変化を触媒し得る。

【０２０２】

「細胞傷害剤」という用語は、本明細書中で用いる場合、細胞の機能を抑制するかまた

は防止する、および／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。本用語は、放射性同位体（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、およびＬｕの放射性同位体）、化学療法薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポキシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、またはその他の挿入剤、酵素およびその断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、ならびに細菌、真菌、植物または動物起源の毒素、例えば小分子毒素または酵素的に活性な毒素（その断片および／または変異体を含む）、ならびに以下に開示される種々の抗腫瘍または抗癌剤を包含するよう意図される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【０２０３】

「毒素」は、細胞の成長または増殖に及ぼす有害作用を有し得る物質である。

【０２０４】

「化学療法薬」は、作用メカニズムに関係なく、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法薬の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパおよびサイトキサン（登録商標）シクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、イムプロスルファンおよびピポスルファン；アジリジン、例えばベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパおよびウレドーパ；エチレンイミンおよびメチルアメラミン、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチルオロメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（例えば、合成類似体トポテカン）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（例えば、そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（例えば、合成類似体、ＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１）；エレウセロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン；抗生物質、例えばエンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマＩＩおよびカリケアマイシンオメガＩＩ（例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)参照））；ダイネマイシン、例えばダイネマイシンＡ；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン・クロモフォアおよび関連クロモプロテインエンジイン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、アドリアマイシン（登録商標）ドキソルビシン（例えば、モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシン）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ブテルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝産物、例えばメトトレキセートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオ

スタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎薬、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充物、例えばフロリン酸；アセグラクトン；アルドホスファミドグルコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシルアセテート；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド、例えばマイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖複合体（ＪＨＳ Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；２，２’，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にＴ－２毒素、ベルラクリンＡ、ロリジンＡおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、アブラキサン（商標）パクリタキセルのクレモフォア無含有、アルブミン操作ナノ粒子処方物（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois）およびタキソテレ（登録商標）ドキセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；ゲムザール（登録商標）ゲムシタビン；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナ類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド（ＶＰ－１６）；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ナベルビン（登録商標）ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセロダ；イバンドロネート；イリノテカン（カンプトサル、ＣＰＴ－１１）（例えば、５－ＦＵおよびロイコボリンを伴うイリノテカンの治療レジメン）；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド、例えばレチン酸；カペシタビン；コンブレタスタチン；ベルケード；レブリミド（登録商標）（レナリドミド）；ロイコボリン（ＬＶ）；オキサリプラチン、例えばオキサリプラチン治療レジメン（ＦＯＬＦＯＸ）；細胞増殖を低減するＰＫＣ－アルファ、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、ＥＧＦＲ（例えばエルロチニブ（タルセバ（商標））およびＶＥＧＦ－Ａの阻害剤、ならびに上記のいずれかの製薬上許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられる。

【０２０５】

腫瘍に及ぼすホルモン作用を調節するかまたは抑制するよう作用する抗ホルモン剤、例えば抗エストロゲン剤および選択的エストロゲン受容体調節物質（ＳＥＲＭ）もこの定義に含まれ、例としては、以下のものが挙げられる：タモキシフェン（例えば、ノルバデックス（登録商標）タモキシフェン）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケトキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストンおよびファレストン－トレミフェン；副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを抑制するアロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、メガーゼ（登録商標）メゲストロールアセテート、アロマシン（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、リビソール（登録商標）ボロゾール、フェマラ（登録商標）レトロゾールおよびアリミデクス（登録商標）アナストロゾール；ならびに抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリン；ならびにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異所性細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を抑制するもの、例えばＰＫＣ－α、ＲａｆおよびＨ－Ｒａｓ；リボザイム、例えばＶＥＧＦ発現阻害剤（例えば、アンギオザイム（登録商標）リボザイム）およびＨＥＲ２発現阻害剤；ワクチン、例えば遺伝子療法ワクチン、例えばアロベクチン（登録商標）ワクチン、ロイベクチン（登録商標）ワクチンおよびバキシド（登録商標）ワクチン；プロロイキン（登録商標）ｒＩＬ－２；ルルトテカン（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；アバレリクス（登録商標）ｒｍＲＨ；ビノレルビ

ンおよびエスペラマイシン（米国特許第４，６７５，１８７号参照）、ならびに上記のいずれかの製薬上許容可能な塩、酸または誘導体。

【０２０６】

アレムツズマブ（カンパス）、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標）、Genentech）；セツキシマブ（エルビツクス（登録商標）、Imclone）；パニツムマブ（ベクチビクス（登録商標）、Amgen）、リツキシマブ（リツキサン（登録商標）、Genentech/Biogen Idec）、ペルツズマブ（オムニタルグ（登録商標）、２Ｃ４、Genentech）、トラツズマブ（ヘルセプチン（登録商標）、Genentech）、トシツモマブ（ベクサール、Corixia）、ならびに抗体薬剤接合体、ゲムツズマブ　オゾガミシン（ミロタルグ（登録商標）、Wyeth）のような治療抗体も、「化学療法薬」の定義に含まれる。

【０２０７】

「増殖阻害剤」は、本明細書中で用いる場合、in vitroまたはin vivoで、細胞、特にＦｃＲＨ５発現癌細胞の増殖を抑制する化合物または組成物を指す。したがって増殖阻害剤は、Ｓ期におけるＦｃＲＨ５発現細胞のパーセンテージを有意に低減するものであり得る。増殖阻害剤の例としては、（Ｓ期以外の箇所で）細胞周期進行を遮断する作用物質、例えば、Ｇ１期停止およびＭ期停止を誘導する作用物質が挙げられる。古典的Ｍ期遮断剤としては、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン、ならびにトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシンが挙げられる。Ｇ１期を停止する作用物質、例えばＤＮＡアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、５－フルオロウラシルおよびアラ－Ｃは、Ｓ期停止ももたらす。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp. 13に見出され得る。タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、イチイからともに得られる抗癌薬である。セイヨウイチイから得られるドセタキセル（タキソテレ（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（タキソール（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類似体である。パクリタキセルおよびドセタキセルはチューブリン二量体からのマイクロチューブの集合を促し、脱重合を防止することにより微小管を安定化して、これが、細胞における有糸分裂の抑制を生じる。

【０２０８】

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

【０２０９】

「サイトカイン」という用語は、細胞間媒介物質として別の細胞に作用する一細胞集団により放出されるタンパク質に関する一般名である。このようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカインおよび伝統的ポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、Ｎ－メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；上皮小体ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）および黄体形成ホルモン（ＬＨ）；肝細胞増殖因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子αおよびβ；ミュラー抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；神経増殖因子、例えばＮＧＦ－β；血小板増殖因子；形質転換成長因子（ＴＧＦ）、例えばＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－β；インスリン様成長因子－ＩおよびＩＩ；エリスロポエチン（ＥＰＯ）；骨形成誘導因子；インターフェロン、例えばインターフェロン－α、βおよびγ；コロニー刺激因

子（ＣＳＦ）、例えばマクロファージ－ＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）；顆粒球－マクロファージ－ＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）；および顆粒球－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）；インターロイキン（ＩＬ）、例えばＩＬ－１、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２；腫瘍壊死因子、例えばＴＮＦ－αまたはＴＮＦ－β；ならびにその他のポリペプチド因子、例えばＬＩＦおよびキットリガンド（ＫＬ）である。本明細書中で用いる場合、サイトカインという用語は、天然供給源からの、または組換え細胞培養からのタンパク質、ならびにネイティブ配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を包含する。

【０２１０】

「パッケージ挿入物」という用語は、治療用製品の市販パッケージ中に慣例的に含まれる使用説明書であって、このような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌、および／または警告についての情報を含有する使用説明書を指すために用いられる。

【０２１１】

「細胞内代謝産物」という用語は、抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）に対する細胞内の代謝過程または反応から生じる化合物を指す。代謝過程または反応は、酵素的過程、例えば、ＡＤＣのペプチドリンカーのタンパク質分解的切断、あるいはヒドラゾン、エステルまたはアミドのような官能基の加水分解であり得る。細胞内代謝産物としては、細胞中への進入、拡散、取込みまたは運搬後に細胞内切断を受けた抗体および遊離薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１２】

「細胞内で切断される」および「細胞内切断」という用語は、薬剤部分（Ｄ）と抗体（Ａｂ）との間の共有結合、すなわちリンカーが分断されて、細胞内に抗体から解離された遊離薬剤を生じる、抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）に関する細胞内の代謝過程または反応を指す。したがって、ＡＤＣの切断部分は、細胞内代謝産物である。

【０２１３】

「生物学的利用能」という用語は、患者に投与された所定量の薬剤の全身的利用能（すなわち、血液／血漿レベル）を指す。生物学的利用能は、投与された剤形から全身循環に達する時間（速度）および総量（程度）の測定値を示す絶対項である。

【０２１４】

「細胞傷害活性」という用語は、ＡＤＣまたはＡＤＣの細胞内代謝産物の細胞殺害、細胞増殖抑制または成長抑制作用を指す。細胞傷害活性はIC_{50}値として表され、これは、半数の細胞が生き残る単位容積当たりの濃度（モルまたは質量）である。

【０２１５】

「アルキル」という用語は、本明細書中で用いる場合、１～１２個の炭素原子（C_1～C_{12}）を有する飽和線状または分枝鎖一価炭化水素ラジカルを指す（ここで、アルキルラジカルは、任意に、下記の１つ以上の置換基で独立して置換され得る）。別の実施形態では、アルキルラジカルは、１～８個の炭素原子（C_1～C_8）または１～６個の炭素原子（C_1～C_6）である。アルキル基の例としては、メチル（Ｍｅ、$-CH_3$）、エチル（Ｅｔ、$-CH_2CH_3$）、１－プロピル（ｎ－Ｐｒ、ｎ－プロピル、$-CH_2CH_2CH_3$）、２－プロピル（ｉ－Ｐｒ、ｉ－プロピル、$-CH(CH_3)_2$）、１－ブチル（ｎ－Ｂｕ、ｎ－ブチル、$-CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－メチル－１－プロピル（ｉ－Ｂｕ、ｉ－ブチル、$-CH_2CH(CH_3)_2$）、２－ブチル（ｓ－Ｂｕ、ｓ－ブチル、$-CH(CH_3)CH_2CH_3$）、２－メチル－２－プロピル（ｔ－Ｂｕ、ｔ－ブチル、$-C(CH_3)_3$）、１－ペンチル（ｎ－ペンチル、$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ペンチル（$-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$）、３－ペンチル（$-CH(CH_2CH_3)_2$）、２－メチル－２－ブチル（$-C(CH_3)_2CH_2CH_3$）、３－メチル－２－ブチル（$-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$）、３－メチル－１－ブチル（$-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$）、２－メチル－１－ブチル（$-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$）、１－ヘキシル（$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ヘキ

シル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－ヘキシル（－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$））、２－メチル－２－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、４－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、３－メチル－３－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）$_2$）、２－メチル－３－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、２，３－ジメチル－２－ブチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、３，３－ジメチル－２－ブチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、１－ヘプチル、１－オクチル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１６】

「アルケニル」という用語は、不飽和（すなわち、炭素－炭素、ｓｐ^{2}二重結合）の少なくとも１つの部位を有する２～８個の炭素原子（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$）を有する線状または分枝鎖一価炭化水素ラジカルを指し（ここで、アルケニルラジカルは、任意に、本明細書中に記載される１つ以上の置換基で独立して置換され得る）、「シス」および「トランス」配向を、あるいは代替的には「Ｅ」および「Ｚ」配向を有するラジカルを包含する。例としては、エチレニルまたはビニル（－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、アリル（－ＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１７】

「アルキニル」という用語は、不飽和（すなわち、炭素－炭素、ｓｐ三重結合）の少なくとも１つの部位を有する２～８個の炭素原子（Ｃ$_2$～Ｃ$_8$）を有する線状または分枝鎖一価炭化水素ラジカルを指す（ここで、アルキニルラジカルは、任意に、本明細書中に記載される１つ以上の置換基で独立して置換され得る）。例としては、エチニル（－Ｃ≡ＣＨ）、プロピニル（プロパルギル、－ＣＨ$_2$ＣＨ≡ＣＨ）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１８】

「炭素環」、「カルボシクリル」、「単環式環」および「シクロアルキル」という用語は、単環式環として３～１２個の炭素原子（Ｃ$_3$～Ｃ$_{12}$）または二環式環として７～１２個の炭素原子を有する一価非芳香族、飽和または一部不飽和の環を指す。７～１２個の炭素原子を有する二環式炭素環は、例えば、ビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］または［６，６］系として配置され、そして９～１０個の環原子を有する二環式炭素環は、ビシクロ［５，６］または［６，６］系として、あるはビシクロ［２．２．１］ヘプタン、ビシクロ［２．２．２］オクタンおよびビシクロ［３．２．２］ノナンのような架橋系として、配置される。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキス－１－エニル、１－シクロヘキス－２－エニル、１－シクロヘキス－３－エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、シクロドデシル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１９】

「アリール」は、親芳香族環系の単一炭素原子から１つの水素原子を除去することにより得られる６～２０個の炭素原子（Ｃ$_6$～Ｃ$_{20}$）の一価芳香族炭化水素基を意味する。いくつかのアリール基は、「Ａｒ」として例となる構造で表される。アリールは、飽和一部不飽和環と縮合された芳香族環、または芳香族炭素環式環からなる二環式ラジカルを含む。典型的アリール基としては、ベンゼン（フェニル）、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、１，２－ジヒドロナフタレン、１，２，３，４－テトラヒドロナフチル等に由来するラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。アリール基は、任意に、本明細書中に記載される１つ以上の置換基で独立して置換される。

【０２２０】

「複素環」、「ヘテロシクリル」および「複素環式環」という用語は、本明細書中で互換的に用いられ、少なくとも１つの環原子が窒素、酸素、リンおよびイオウから選択され

る異種原子であり、残りの環原子がＣである３～２０個の環原子を有する飽和または一部不飽和（すなわち、１つ以上の二重および／または三重結合を環内に有する）単環式ラジカルを指し、この場合、１つ以上の環原子は任意に、下記の１つ以上の置換基で独立して置換される。複素環は、３～７個の環成員（２～６個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～４個の異種原子）を有する単環、あるいは７～１０個の環成員（４～９個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～６個の異種原子）を有する二環、例えばビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］または［６，６］系であり得る。複素環は、Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1、3、4、6、7および9章；“The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950提供)、特に、Volumes 13、14、16、19および28；ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載されている。「ヘテロシクリル」は、複素環ラジカルが飽和一部不飽和環、あるいは芳香族炭素環式または複素環式環と縮合されたラジカルも包含する。複素環式環の例としては、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、２－ピロリニル、３－ピロリニル、インドリニル、２Ｈ－ピラニル、４Ｈ－ピラニル、ジオキサニル、１，３－ジオキソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニルイミダゾリニル、イミダゾリジニル、３－アザビシクロ［３．１．０］ヘキサニル、３－アザビシクロ［４．１．０］ヘプタニル、アザビシクロ［２．２．２］ヘキサニル、３Ｈ－インドリルキノリジニルおよびＮ－ピリジル尿素が挙げられるが、これらに限定されない。スピロ部分も、この定義の範囲内に含まれる。２個の環炭素原子がオキソ（＝Ｏ）部分で置換される複素環式基の例は、ピリミジノニルおよび１，１－ジオキソ－チオモルホリニルである。本明細書中の複素環基は、任意に、本明細書中に記載される１つ以上の置換基で独立して置換される。

【０２２１】

「ヘテロアリール」という用語は、５、６または７員環の一価芳香族ラジカルを指し、窒素、酸素およびイオウから独立して選択される１つ以上の異種原子を含有する５～２０個の原子を有する縮合環系（そのうちの少なくとも１つは芳香族である）を包含する。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル（例えば２－ヒドロキシピリジニル）、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル（例えば、４－ヒドロキシピリミジニル）、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニルおよびフロピリジニルである。ヘテロアリール基は、任意に、本明細書中に記載される１つ以上の置換基で独立して置換される。

【０２２２】

複素環またはヘテロアリール基は、可能である場合、結合された炭素（炭素結合）または窒素（窒素結合）であり得る。例として（しかしこれらに限定されない）、炭素結合複素環またはヘテロアリールは、ピリジンの位置２、３、４、５または６、ピリダジンの位置３、４、５または６、ピリミジンの位置２、４、５または６、ピラジンの位置２、３、５または６、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールまたはテトラヒドロピロールの位置２、３、４または５、オキサゾール、イミダゾールまたはチア

ゾールの位置２、４または５、イソキサゾール、ピラゾールまたはイソチアゾールの位置３、４または５、アジリジンの位置２または３、アゼチジンの位置２、３または４、キノリンの位置２、３、４、５、６、７または８、イソキノリンの位置１、３、４、５、６、７または８で結合される。

【０２２３】

例として（しかしこれらに限定されない）、窒素結合複素環またはヘテロアリールは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾールの位置１、イソインドールまたはイソインドリンの位置２、モルホリンの位置４、ならびにカルバゾールまたはβ－カルボリンの位置９で結合される。

【０２２４】

「アルキレン」は、１～１８個の炭素原子を有し、親アルカンの同一のまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子の除去により得られる２つの一価ラジカル中心を有する飽和、分枝鎖または直鎖あるいは環状炭化水素ラジカルを指す。典型的アルキレンラジカルとしては、メチレン（－CH_2－）１，２－エチル（－CH_2CH_2－）、１，３－プロピル（－$CH_2CH_2CH_2$－）、１，４－ブチル（－$CH_2CH_2CH_2CH_2$－）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２５】

「C_1～C_{10}アルキレン」は、式－（CH_2）$_{1-10}$－の直鎖飽和炭化水素基である。C_1～C_{10}アルキレンの例としては、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレンおよびデカレンが挙げられる。

【０２２６】

「アルケニレン」は、２～１８個の炭素原子を有し、親アルケンの同一のまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子の除去により得られる２つの一価ラジカル中心を有する不飽和、分枝鎖または直鎖あるいは環状炭化水素ラジカルを指す。典型的アルケニレンラジカルとしては、１，２－エチレン（－CH＝CH－）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２７】

「アルキニレン」は、２～１８個の炭素原子を有し、親アルキンの同一のまたは２つの異なる炭素原子から２つの水素原子の除去により得られる２つの一価ラジカル中心を有する不飽和、分枝鎖または直鎖あるいは環状炭化水素ラジカルを指す。典型的アルキニレンラジカルとしては、アセチレン

（－C≡C－）

、プロパルギル

（－CH_2C≡C－）

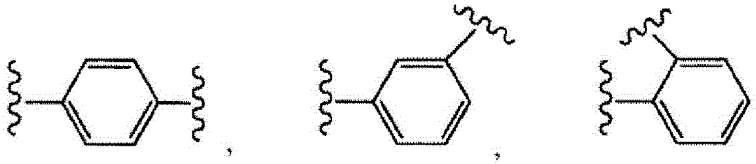
および４－ペンチニル

（－$CH_2CH_2CH_2$C≡C－）

が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２８】

「アリーレン」は、２つの共有結合を有し、以下の構造で示されるようなオルト、メタまたはパラ立体配置で存在し得るアリール基である：



式中、フェニル基は、４個までの基、例えば－C_1～C_8アルキル、－O－（C_1～C_8

アルキル）、－ａｒｙｌ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ’、－Ｃ（Ｏ）NH_2、－Ｃ（Ｏ）ＮＨＲ’、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）$_2$－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－ＯＨ、－ハロゲン、－N_3、－NH_2、－ＮＨ（Ｒ’）、－Ｎ（Ｒ’）$_2$および－ＣＮ（ここで、Ｒ’は、各々独立して、Ｈ、－C_1～C_8アルキルおよびアリールから選択される）で非置換または置換され得る。

【０２２９】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端またはsp^3炭素原子と結合される水素原子のうちの１つがアリールラジカルで置き換えられた非環式アルキルラジカルを指す。典型的アリールアルキル基としては、ベンジル、２－フェニルエタン－１－イル、２－フェニルエテン－１－イル、ナフチルメチル、２－ナフチルエタン－１－イル、２－ナフチルエテン－１－イル、ナフトベンジル、２－ナフトフェニルエタン－１－イル等が挙げられるが、これらに限定されない。アリールアルキル基は６～２０個の炭素原子を含み、例えばアリールアルキル基のアルキル部分、（アルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含めて）は、１～６個の炭素原子であり、アリール部分は５～１４個の炭素原子である。

【０２３０】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端またはsp^3炭素原子と結合される水素原子のうちの１つがヘテロアリールラジカルで置き換えられた非環式アルキルラジカルを指す。典型的ヘテロアリールアルキル基としては、２－ベンズイミダゾリルメチル、２－フリルエチル等が挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロアリールアルキル基は６～２０個の炭素原子を含み、例えばヘテロアリールアルキル基のアルキル部分（アルカニル、アルケニルまたはアルキニル基を含めて）は、１～６個の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は５～１４個の炭素原子、ならびにＮ、ＯＰおよびＳから選択される１～３個の異種原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は、３～７個の環成員（２～６個の炭素原子）を有する単環、あるいは７～１０個の環成員（４～９個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３個の異種原子）を有する二環、例えばビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］または［６，６］系であり得る。

【０２３１】

「プロドラッグ」という用語は、本出願中で用いられる場合、親薬剤と比較して腫瘍細胞に対して低細胞傷害性であり、酵素的に活性化され得るかまたはより活性な親形態に変換され得る薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態を指す。例えば、Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)およびStella et al., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)を参照されたい。本発明のプロドラッグとしては、リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Ｄ－アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、βラクタム含有プロドラッグ、任意置換化フェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意置換化フェニルアセトアミド含有プロドラッグ、５－フルオロシトシン、ならびににより活性な無細胞傷害性薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。本発明に用いるためのプロドラッグに誘導され得る細胞傷害性薬剤の例としては、上記の化学療法薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２３２】

「放射線療法」とは、正常に機能するその能力を制限するのに、あるいは細胞完全に破壊するのに十分な損傷を誘発することに向けられるガンマ線またはベータ線の使用を意味する。線量および処置継続期間を決定するための当該技術分野で既知の多数の方法が存在する、と理解される。典型的処置は単一回投与として示され、典型的線量は１０～２００単位（Gray）／日の範囲である。

【０２３３】

「代謝産物」は、特定化合物またはその塩の身体中での代謝により産生される生成物である。化合物の代謝産物は、当該技術分野で既知の慣例的技法を用いて特定され、それらの活性は本明細書中に記載されるような試験を用いて確定され得る。このような生成物は、例えば、投与化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、脱エステル化、酵素的切断等から生じ得る。したがって、本発明は、本発明の化合物の代謝産物、例えば、本発明の化合物を、その代謝生成物を産生するのに十分な時間、哺乳動物と接触させることを包含する過程により産生される化合物を包含する。

【０２３４】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬剤の送達に有用である種々の型の脂質、リン脂質および／または界面活性剤からなる小胞である。リポソームの構成成分は、一般に、生物学的膜の脂質配列と類似の二重層形成で配置される。

【０２３５】

「リンカー」は、共有結合あるいは抗体を薬剤部分と共有的に結合する原子の鎖からなる化学的部分を指す。種々の形態において、リンカーとしては、二価ラジカル、例えば、アルキルジイル、アリールジイル、ヘテロアリールジイル、－（ＣＲ$_2$）$_n$Ｏ（ＣＲ$_2$）$_n$－、アルキルオキシの反復単位（例えば、ポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、ジェファミン（商標）のような部分；ならびに二酸エステルおよびアミド、例えばスクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネートおよびカプロアミドが挙げられる。

【０２３６】

「キラル」という用語は、鏡像相手の重ね合わせ出来ない特性を有する分子を指し、一方、「アキラル」という用語は、それらの鏡像相手に重ね合わせ可能な分子を指す。

【０２３７】

「立体異性体」という用語は、同一の化学的構成を有するが、しかし空間中の原子または基の配置に関して異なる化合物を指す。

【０２３８】

「ジアステレオマー」は、２つ以上のキラル中心を有し、その分子が互いに鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的特性、例えば融点、沸点、スペクトル特性および反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、高分解能分析手法、例えば電気泳動およびクロマトグラフィー下で分離され得る。

【０２３９】

「エナンチオマー」は、高いに重ね合わせ出来ない化合物の２つの立体異性体を指す。

【０２４０】

本明細書中で用いられる立体化学の定義および慣例は、一般的に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；およびEliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多数の有機化合物は光学的活性形態で存在し、すなわち、それらは、平面－偏光の平面を回転させる能力を有する。光学的活性化合物を記述する場合、接頭辞ＤおよびＬ、またはＲおよびＳは、そのキラル中心（単数または複数）についての分子の絶対的立体配置を意味する。接頭辞ｄおよびｌ、または（＋）および（－）は、化合物による平面－偏光の回転の符号を示すために用いられ、（－）またはｌは、化合物が左旋性である、ということを意味する。（＋）またはｄの接頭辞を付された化合物は、右旋性である。所与の化学構造に関して、これらの立体異性体は、それらが互いに鏡像であることを除いて、同一である。特定の立体異性体はエナンチオマーとしても言及され得、このような異性体の混合物はしばしば、エナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの５０：５０混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体として言及され、これは、化学的反応または工程において立体選択または立体選択性がなかった場合に生じ得る。「ラセミ混合物」および「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く２つのエナンチオマー種の等モル混合物を指す。

【０２４１】

「互変異性体」または「互変異性形態」という用語は、低エネルギーバリアを介して相互交換可能である異なるエネルギーを有する構造異性体を指す。例えば、プロトン互変異性体（向プロトン性互変異性体としても既知である）としては、プロトンの移動を介した相互変換、例えばケトーエノールおよびイミンーエナミン異性体化が挙げられる。原子価互変異性体は、結合電子のいくつかの再編成による相互変換を包含する。

【０２４２】

「製薬上許容可能な塩」という語句は、本明細書中で用いる場合、本発明の化合物の製薬上許容可能な有機または無機塩を指す。例となる塩としては、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシレート」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐートルエンスルホン酸塩およびパモエート（すなわち、１，１’ーメチレンービス（２ーヒドロキシー３ーナフトエート））塩が挙げられるが、これらに限定されない。製薬上許容可能な塩は、別の分子、例えば酢酸塩イオン、コハク酸塩イオンまたは他の対イオンの含入を伴い得る。対イオンは、親化合物における電荷を安定化させる任意の有機または無機部分であり得る。さらに、製薬上許容可能な塩は、その構造中に１つより多い荷電した原子を有し得る。複数の荷電した原子が製薬上許容可能な塩の一部である場合は、多重対イオンを有し得る。それゆえ、製薬上許容可能な塩は、１つ以上の荷電した原子および／または１つ以上の対イオンを有し得る。

【０２４３】

本発明の化合物が塩基である場合、所望の製薬上許容可能な塩は、当該技術分野で利用可能な任意の適切な方法、例えば無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、小酸、メタンスルホン酸、リン酸等による、あるいは有機酸、例えば酢酸、トリフルオロ酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ピルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシジル酸、例えばグルクロン酸またはガラクツロン酸、アルファヒドロキシ酸、例えばクエン酸または酒石酸、アミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸、芳香族酸、例えば安息香酸または肉桂酸、スルホン酸、例えばｐートルエンスルホン酸またはエタンスルホン酸等による遊離塩基の処理により調製され得る。

【０２４４】

本発明の化合物が酸である場合、所望の製薬上許容可能な塩は、任意の適切な方法、例えば無機または有機塩基、例えばアミン（第一級、第二級または第三級）、アルカリ金属水酸化物またはアルカリ土類金属水酸化物等による遊離酸の処理により調製され得る。適切な塩の例証例としては、アミノ酸、例えばグリシンおよびアルギニン、アンモニア、第一級、第二級および第三級アミン、ならびに環状アミン、例えばピペリジン、モルホリンおよびピペラジン由来の有機塩、ならびにナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウムおよびリチウム由来の無機塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４５】

「製薬上許容可能な」という語句は、物質または組成物は、処方物を成す他の成分、および／または処置される哺乳動物と化学的および／または毒物学的に適合性でなければならないことを示す。

【０２４６】

「溶媒和物」は、１つ以上の溶媒分子と本発明の化合物の集合物または複合物を指す。溶媒和物を構成する溶媒の例としては、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、酢酸およびエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。「水和物」という用語は、溶媒分子が水である複合体を指す。

【０２４７】

「保護基」という用語は、化合物上の他の官能基に反応しながら、特定の官能基を遮断

するかまたは保護するために一般に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能基を遮断するかまたは保護するアミノ基と結合される置換基である。適切なアミノ保護基としては、アセチル、トリフルオロアセチル、ｔ－ブトキシカルボニル（ＢＯＣ）、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ）および９－フルオレニルメチレンおきしカルボニル（Ｆｍｏｃ）が挙げられる。同様に、「ヒドロキシ保護基」は、ヒドロキシ官能基を遮断するかまたは保護するヒドロキシ基の置換基を指す。適切な保護基としては、アセチルおよびシリルが挙げられる。「カルボキシ保護基」は、カルボキシ官能基を遮断するかまたは保護するカルボキシ基の置換基を指す。一般的カルボキシ保護基としては、フェニルスルホニルエチル、シアノエチル、２－（トリメチルシリル）エチル、２－（トリメチルシリル）エトキシメチル、２－（ｐ－トルエンスルホニル）エチル、２－（ｐ－ニトロフェニルスルフェニル）エチル、２－（ジフェニルホスフィノ）－エチル、ニトロエチル等が挙げられる。保護基およびそれらの使用についての一般的記述に関しては、T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照されたい。

【０２４８】

「脱離基」は、別の官能基により置換され得る官能基を指す。ある脱離基は当該技術分野で周知であり、例としては、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、メタンスルホニル（メシル）、ｐ－トルエンスルホニル（トシル）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフラート）およびトリフルオロメチルスルホネートが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４９】

略号

リンカー構成成分：

ＭＣ＝６－マレイミドカプロイル

Ｖａｌ－Ｃｉｔまたは「ｖｃ」＝バリン－シトルリン（プロテアーゼ切断可能リンカー中の例となるジペプチド）

シトルリン＝２－アミノ－５－ウレイドペンタン酸

ＰＡＢ　＝ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「自壊的」リンカー構成成分の一例）

Ｍｅ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ＝Ｎ－メチル－バリン－シトルリン（この場合、リンカーペプチド結合は、カテプシンＢによるその切断を防止するよう修飾されている）

ＭＣ（ＰＥＧ）６－ＯＨ＝マレイミドカプロイル－ポリエチレングリコール（抗体システインと結合され得る）。

細胞傷害性薬剤：

ＭＭＡＥ＝モノ－メチルアウリスタチンＥ（分子量　７１８）

ＭＭＡＦ＝薬剤のＣ末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンＥの変異体（ＭＭＡＥ）（分子量　７３１．５）

ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ＝Ｃ末端フェニルアラニンとのアミド結合中にＤＭＡＥＡ（ジメチルアミノエチルアミン）を有するＭＭＡＦ（分子量　８０１．５）

ＭＭＡＦ－ＴＥＧ＝フェニルアラニンにエステル化されるテトラエチレングリコールを有するＭＭＡＦ

ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ＝アミドとしてＭＭＡＦのＣ末端に結合されるＮ－ｔ－ブチル

ＤＭ１＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ（２’）－（３－メルカプト－１－オキソピル）－マイタンシン

ＤＭ３＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ２－（４－メルカプト－１－オキソペンチル）－マイタンシン

ＤＭ４＝Ｎ（２’）－デアセチル－Ｎ２－（４－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）－マイタンシン

【０２５０】

さらなる略号を、以下に示す：ＡＥはアウリスタチンＥであり、ＢｏｃはＮ－（ｔ－ブ

トキシカルボニル）であり、ｃｉｔはシトルリンであり、ｄａｐはドラプロリンであり、ＤＣＣは１，３－次シクロヘキシルカルボジイミドであり、ＤＣＭはジクロロメタンであり、ＤＥＡはジエチルアミンであり、ＤＥＡＤはジエチルアゾジカルボキシレートであり、ＤＥＰＣはジエチルホスホリルシアニデートであり、ＤＩＡＤはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、ＤＩＥＡはＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミンであり、ｄｉｌはドライソロイシンであり、ＤＭＡはジメチルアセトアミドであり、ＤＭＡＰは４－ジメチルアミノピリジンであり、ＤＭＥはエチレングリコールジメチルエーテル（または１，２－ジメトキシエタン）であり、ＤＭＦはＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドであり、ＤＭＳＯはジメチルスルホキシドであり、ｄｏｅはドラフェニンであり、ｄｏｖはＮ，Ｎ－ジメチルバリンであり、ＤＴＮＢは５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）であり、ＤＴＰＡはジエチレントリアミン五酢酸であり、ＤＴＴはジチオトレイトールであり、ＥＤＣＩは１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩であり、ＥＥＤＱは２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノリンであり、ＥＳ－ＭＳは電気噴霧質量分光分析であり、ＥｔＯＡｃは酢酸エチルであり、ＦｍｏｃはＮ－（９－フルオレニルメトキシカルボニル）であり、ｇｌｙはグリシンであり、ＨＡＴＵはＯ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェートであり、ＨＯＢｔは１－ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、ＨＰＬＣは高圧液体クロマトグラフィーであり、ｉｌｅはイソロイシンであり、ｌｙｓはリシンであり、ＭｅＣＮは（CH_3CN）はアセトニトリルであり、ＭｅＯＨはメタノールであり、Ｍｔｒは４－アニシルジフェニルメチル（または４－メトキシトリチル）であり、ｎｏｒは（１Ｓ，２Ｒ）－（＋）－ノルエフェドリンであり、ＰＢＳはリン酸塩緩衝生理食塩水（ｐＨ７．４）であり、ＰＥＧはポリエチレングリコールであり、Ｐｈはフェニルであり、Ｐｎｐはｐ－ニトロフェニルであり、ＭＣは６－マレイミドカプロイルであり、ｐｈｅはＬ－フェニルアラニンであり、ＰｙＢｒｏｐはブロモとリス－ピロリジノホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェートであり、ＳＥＣはサイズ排除クロマトグラフィーであり、Ｓｕはスクシンイミドであり、ＴＦＡは取りフルオロ酢酸であり、ＴＬＣは薄層クロマトグラフィーであり、ＵＶは紫外線であり、そしてｖａｌはバリンである。

【０２５１】

「遊離システインアミノ酸」は、親抗体で操作され、チオール官能基（－ＳＨ）を有し、分子内または分子間ジスルフィド架橋として対合されないシステインアミノ酸残基を指す。

【０２５２】

「チオール反応性値」という用語は、遊離システインアミノ酸の反応性の定量的な特徴付けである。チオール反応性値は、チオール反応性試薬と反応するシステイン操作された抗体中の遊離システインアミノ酸のパーセンテージであり、最大値１に換算される。例えば、チオール反応性試薬、例えばビオチン－マレイミド試薬と収率１００％で反応してビオチン標識抗体を生成するシステイン操作された抗体上の遊離システインアミノ酸は、１．０というチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬と収率８０％で反応する同一のまたは異なる親抗体で操作された別のシステインアミノ酸は、０．８のチオール反応性値を有する。チオール反応性試薬と全く反応できない同一のまたは異なる親抗体で操作された別のシステインアミノ酸はチオールは、チオール反応性値は０である。特定のシステインのチオール反応性値の決定は、ＥＬＩＳＡ検定、質量分光分析、液体クロマトグラフィー、オートラジオグラフィーまたは他の定量的分析試験により実行され得る。

【０２５３】

「親抗体」は、１つ以上のアミノ酸残基が１つ以上のシステイン残基で置き換えられるアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、ネイティブまたは野生型配列を含み得る。親抗体は、他のネイティブ、野生型または修飾形態の抗体に比して、先在アミノ酸配列修飾（例えば、付加、欠失および／または置換）を有し得る。親抗体は、当該標的抗原、例えば生物学的に重要なポリペプチドに対して向けられ得る。非ポリペプチド抗原（例えば、

腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第５０９１１７８号参照）に対して向けられる抗体も意図される。

【０２５４】

表１

```
/*
 *
 * C-C  12から15に増大
 * ZはＥＱの平均である
 * BはＮＤの平均である
 * 停止を伴う整合は_M; 停止－停止 = 0; Ｊ（ジョーカー）整合 = 0
 */
#define_M      -8      /* 停止を伴う整合の値 */

int    _day[26][26] = {
/*       A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z
*/
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3,
0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3,
1},
/* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0,
0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4,
2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4,
3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0,
7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5,
0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0,
0, 2},
/* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5,
0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0},
```

```
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4,
0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2,
0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4,
0,-2,-1},
/* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2,
1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5,
0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4,
3},
/* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4,
0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3,
0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3,
0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6,
0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0,
0,-6},
/* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0,
0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4,
4}
};
```

表１（続き）

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP  16      /* 項中の最大の jump */
#define MAXGAP  24      /* これより大きいギャップにペナルティ負荷し続けない */
#define JMPS            1024    /* パス中の最大 jump */
#define MX              4       /* 最終 jump 以降、少なくとも MX-1 塩基が存在した場合
に保存 */

#define DMAT            3       /* 整合塩基の値 */
#define DMIS            0       /* 不整合塩基に関するペナルティ */
#define DINS0           8       /* ギャップに関するペナルティ */
#define DINS1           1       /* ペナルティ／塩基 */
#define PINS0           8       /* ギャップに関するペナルティ */
#define PINS1           4       /* ペナルティ／残基 */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* jmp のサイズ（遅延に対しては負）*/
        unsigned short x[MAXJMP];       /* 配列中のジャンプの塩基番号 x */
};                                      /* 2^16 -1 に配列を制限する */

struct diag {
        int             スコア;         /* 最終 jum. でのスコア */
        long            オフセット;     /* 前のブロックのオフセット */
        short           ijmp;           /* 最新 jmp 指数 */
        struct jmp      jp;             /* jmps のリスト */
};

struct path {
        int     spc;                    /* 先頭スペースの数 */
```

```
        short   n[JMPS];                /* jmp (ギャップ)のサイズ */
        int     x[JMPS];                /* jmp (ギャップ前の最終要素)の位置
*/
};

char            *ofile;             /* 出力ファイル名 */
char            *namex[2];              /* 配列名: getseqs() */
char            *prog;              /* エラーメッセージに関するプログラム名 */
char            *seqx[2];               /* 配列: getseqs() */
int             dmax;               /* 最良の対角線: nw() */
int             dmax0;              /* 最終対角線 */
int             dna;                /* dna の場合に設定:主() */
int             エンドギャップ;                 /* 末端ギャップをペナルティ
化する場合に設定 */
int             gapx, gapy;             /* 配列中の総ギャップ */
int             len0, len1;             /* 配列長 */
int             ngapx, ngapy;       /* 総ギャップサイズ */
int             smax;               /* 最大スコア: nw() */
int             *xbm;               /* 整合に関するビットマップ */
long            オフセット;             /* jmp における現在のオフセット*/
struct diag     *dx;                /* 対角線を保持*/
struct path     pp[2];              /* 配列のパスを保持 */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

表 1（続き）

```
/* Needleman-Wunsch アラインメントプログラム
 *
 * 使用法: progs file1 file2
 *  ここで file1 and file2 は、２つのＤＮＡまたは２つのタンパク質配列である。
 *  配列は、大文字または小文字で、あいまいさを含んでも良い。
 *  Any lines beginning with 「;'」、「>」 または 「<」 で始まる行は無視される。
 *  ファイルの最大長は 65535 である（jmp struct 中の unsigned short x により制限される)。
 *  要素 ACGTU が 1/3 以上である配列は DNA であると想定される。
 *  ファイル 「align.out」 に出力される。
 *
 * プログラムは、 /tmp に tmp ファイルを生成して、トレースバック情報を保持し得る.
 * オリジナルバージョンは、BSD 4.3 on a vax 8650 上でＢＳＤ４．３の環境下で開発された。
 */
#include “nw.h”
#include “day.h”

static _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

メイン(ac, av) main
        int     ac;
        char    *av[];
```

```
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file１  file２¥n", prog);
                fprintf(stderr,"file１ and file２ が２つの dna または２つのタンパク
質の配列である場合.¥n");
                fprintf(stderr,"配列は大文字または小文字であり得る¥n");
                fprintf(stderr,"';' または 'く'で始まる任意の行は無視される¥n");
                fprintf(stderr,"出力はファイル ¥"align.out¥"¥n"にある);
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        エンドギャプ = 0;              /* 1 は末端ギャップにペナルティを課す */
        0ファイル = "align.out";              /* 出力ファイル */

        nw();          /* マトリックスを埋める、考え得る jmps を得る */
        readjmps();            /* 実 jmps を得る */
        印刷();        /* 統計量、アラインメントを印刷 */

        クリーンアップ(0);     /*  任意の tmp ファイルを削除する */}
```

表１（続き）

```
/* アラインメントを実行する、ベストスコアに戻す: メイン()
 * dna  : Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983 における値
 * pro: PAM 250 値
 * スコアが等しい場合、任意のギャップとの整合を選択する, prefer
 * 進行中のギャップを伸長するための新しいギャップ、そして配列中のギャップ x を選択する
 * 配列 y 中の一ギャップに対して.
 */
nw()    nw
{
        char            *px, *py;               /* 配列および ptrs */
        int             *ndely, *dely; /* dely の進路を維持する */
        int             ndelx, delx;    /* の進路を維持する */
        int             *tmp;           /*  row0, row1 を交換するため */
        int             mis;            /* 各型に関するスコア */
        int             ins0, ins1;     /* 挿入ペナルティー */
        register                id;             /* 対角線指数 */
        register                ij;             /* jmp 指数 */
        register                *col0, *col1;   /* curr に関するスコア, 、最終行 */
        register                xx, yy;         /* seqs での指数 */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (エンドギャップ) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
```

```
                col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;   /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                dely[yy] = -ins0;
/* 整合マトリックスを埋める
 */
for (px = 配列 x[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* col で最初の記載項目を初期化する
         */
        if (エンドギャップ) {
                if (xx == 1)
                        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                else
                        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                ndelx = xx;
        }
        else {
                col1[0] = 0;
                delx = -ins0;
                ndelx = 0;
        }
```

表 1（続き）

```
...nw
        for (py = 配列 x[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
                mis = col0[yy-1];
                if (dna)
                        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
                else
                        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

                /*  x 配列における del に関する更新ペナルティー;
                 * 進行中の del より新規の del を選ぶ
                 * エンドギャップを加重する場合、MAXGAP を無視する
                 */
                if (エンドギャップ || ndely[yy] < MAXGAP) {
                        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                                ndely[yy] = 1;
                        } else {
                                dely[yy] -= ins1;
                                ndely[yy]++;
                        }
                } else {
                        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                                ndely[yy] = 1;
                        } else
                                ndely[yy]++;
                }

                /*  y 配列における del に関する更新ペナルティー;
                 *進行中の del より新規の del を選ぶ
                 */
                if (エンドギャップ || ndelx < MAXGAP) {
```

```
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* 最大スコアを選ぶ；選択中
         * mis /任意の del および delx / dely
         */

...nw

        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

表 1（続き）

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna  || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].s コア
+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].オフセット = オフセット;
                                        オフセット += sizeof(struct jmp) +
sizeof(オフセット);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].s コア = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].s コア
+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].オフセット = オフセット;
                                        オフセット += sizeof(struct jmp) +
sizeof(オフセット);
```

```
                        }
                    }
                    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                    dx[id].jp.x[ij] = xx;
                    dx[id].sコア = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                    /* last col
                     */
                    if (エンドギャップ)
                        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                    if (col1[yy] > smax) {
                        smax = col1[yy];
                        dmax = id;
                    }
                }
            }
            if (エンドギャップ && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
            if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
            }
            tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;        }
        (void) free((char *)ndely);
        (void) free((char *)dely);
        (void) free((char *)col0);
        (void) free((char *)col1);                  }
```

表 1（続き）

```
/*
 *
 * 印刷() -- このモジュールの外で認識可能な唯一のルーチン
 *
 * スタティック:
 * getmat() --0020trace back best path, count matches: 印刷()
 * pr_align() -- アレイ p で記載されたものの印刷 アラインメント[]: 印刷()
 * dumpblock() -- 番号を有する行の遮断をダンプする、 星印: pr_揃える()
 * nums() -- 番号行を出す: dumpblock()
 * putline() -- 行を出す (name, [num], 配列, [num]): dumpblock()
 * stars() - -星印の行を入れる: dumpblock()
 * stripname() -- 任意のパスを seqname から取外して、前に置く
 */

#include "nw.h"

#define SPC    3
#define P_LINE 256      /* 最大出力行 */
#define P_SPC  3        /* 名称または番号および配列間のスペース */

extern _day[26][26];
int    olen;            /* 出力行長を設定する */
FILE   *fx;             /* 出力ファイル */

印刷() 印刷
{
        int     lx, ly, 第一ギャップ, 最終ギャップ;  /* 重複 */

        if ((fx = f オープン(ofile, "w")) == 0) {
                f 印刷 f(stderr,"%s: 書き込みできない %s¥n", prog, ofile);
                クリーンアップ(1);
        }
```

```
f印刷 f(fx, “<第一配列: %s (長さ = %d)¥n”, namex[0], len0);
f印刷 f(fx, “<第二配列: %s (length = %d)¥n”, namex[1], len1);
olen = 60;
lx = len0;
ly = len1;
第一ギャップ = 最終ギャップ = 0;
if (dmax < len1 - 1) {/* x中の先頭ギャップ */
        pp[0].spc = 第一ギャップ = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
}
else if (dmax > len1 - 1) {  /* y中の先頭ギャップ */
        pp[1].spc = 第一ギャップ = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
}
if (dmax0 < len0 - 1) {      /* x中の後端ギャップ */
        最終ギャップ = len0 - dmax0 -1;
        lx -= 最終ギャップ;
}
else if (dmax0 > len0 - 1) { /* y中の後端ギャップ */
        最終ギャップ = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= 最終ギャップ;
}
getmat(lx, ly, 第一ギャップ, 最終ギャップ);
pr_align();    }
```

表 1（続き）

```
/*
 * 最良のパスを突き止めて、整合を計数する
 */
スタティック
getmat(lx, ly, 第一ギャップ, 最終ギャップ)  getmat
        int     lx, ly;                 /* “コア”（マイナス エンドギャップ）*/
        int     第一ギャップ, 最終ギャップ;          /* 先頭 後端 重複 */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register                n0, n1;
        register char  *p0, *p1;
        /* 全整合を得る, s コア
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
```

```
        else {
                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                        nm++;
                if (n0++ == pp[0].x[i0])
                        siz0 = pp[0].n[i0++];
                if (n1++ == pp[1].x[i1])
                        siz1 = pp[1].n[i1++];
                p0++;
                p1++;
        }
}

/* pct 相同性:
 * エンドギャップをペナルティ化する場合, 塩基はより短い配列である
 * そうでなければ、重複を取り除いて、より短いコアを取る
 */
if (エンドギャップ)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
f印刷f(fx, "¥n");
f印刷f(fx, "<%d 整合%s in an 重複 of %d: %.2f 類似性パーセント¥n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

表 1（続き）

```
        f印刷 f(fx, "<第一配列中のギャップ: %d", gapx);      ...getmat
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "塩基":"残基", (ngapx == 1)? "":"s");
                f印刷 f(fx,"%s", outx);
        f印刷 f(fx, ", 第二配列中のギャップ: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "塩基":"残基", (ngapy == 1)? "":"s");
                f印刷 f(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                f印刷 f(fx,
                "¥n<s コア: %d (整合 = %d, 不整合 = %d, ギャップペナルティー = %d + %d
／塩基)¥n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                f印刷 f(fx,
                "¥n<s コア: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per 残
基)¥n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (エンドギャップ)
                f印刷 f(fx,
                "<ペナルティ化エンドギャップ . 左エンドギャップ: %d %s%s, 右エンド
ギャップ: %d %s%s¥n",
                第一ギャップ, (dna)? "塩基" : "残基", (第一ギャップ == 1)? "" : "s",
                最終ギャップ, (dna)? "塩基" : "残基", (最終ギャップ == 1)? "" : "s");
        else
                f印刷 f(fx, "<非ペナルティ化エンドギャップ¥n");
}
 static         nm;             /* コア中の整合 -- 点検用 */
 static         lmax;           /* 除去ファイル名の長さ */
```

```
static        ij[2];          /* パスのための jmp 指数 */
static        nc[2];          /* 最新行の開始時の番号 */
static        ni[2];          /* 最新エレメント番号 -- ギャッピング用 *
static        siz[2];
static char   *ps[2];         /*最新エレメントに対する ptr  */
static char   *po[2];         /* 次の出力文字スロットに対する ptr  */
static char   out[2][P_LINE];       /* 出力行 */
static char   star[P_LINE];  /* 星印により設定() */
/*
* 構造パス pp で記載される印刷 アラインメント
*/
static
pr_align()     pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register                i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = 配列 x[i];
                po[i] = out[i];                         }
```

表 1（続き）

```
for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                /*
                 *この配列のうちより多くを有する?
                 */
                if (!*ps[i])
                        continue;
                more++;
                if (pp[i].spc) {        /* 先頭 スペース */
                        *po[i]++ = ' ';
                        pp[i].spc--;
                }
                else if (siz[i]) {      /* ギャップ中 */
                        *po[i]++ = '-';
                        siz[i]--;
                }
                else {          /* 配列エレメントを入れる
                                 */
                        *po[i] = *ps[i];
                        if (islower(*ps[i]))
                                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                        po[i]++;
                        ps[i]++;
                        /*
                         * この配列に関して次のギャップで?
                         */
                        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                /*
                                 * 全ギャップを合併する必要がある
                                 * この位置で
                                 */
```

```
                                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                        siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                        }
                        ni[i]++;
                }
        }
        if (++nn == olen || !more && nn) {
                dumpblock();
                for (i = 0; i < 2; i++)
                        po[i] = out[i];
                nn = 0;
        }
    }
}
/*
 * 番号、星印を含めて行の遮断をダンプする: pr_align()
 */
スタティック
dumpblock()     dumpblock
{
    register        i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
            *po[i]-- = '¥0';
```

表 1（続き）

```
        ...dumpblock
        (void) putc('¥n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                f印刷 f(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * 番号行を出す: dumpblock()
 */
スタティック
nums(ix)        nums
        int     ix;     /*  配列行の保持における／からの指数 */
{
        char            nline[P_LINE];
        register                i, j;
        register char  *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
```

```
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '¥0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('¥n', fx);
}
/*
 * 行を出す (name, [num], 配列, [num]): dumpblock()
 */
スタティック
putline(ix)     putline
        int     ix;                     {
```

表 1（続き）

```
        ...putline
        int             i;
        register char  *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* これらは 1 から計数する:
         * ni[] 最新エレメントである (1 から)
         * nc[] 最新行の先頭の番号である
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('¥n', fx);
}


/*
 * 星印の行を入れる (配列は常に out[0], out[1]): dumpblock()
 */
スタティック
stars() stars
{
        int             i;
        register char  *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
            !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
```

```
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '¥n';
        *px = '¥0';
}
```

表 1（続き）

```
/*
 * パスを取り去るかまたは pn から前置し、len を戻す: pr_align()
 */
スタティック
stripname(pn)  stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char  *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

表 1（続き）

```
/*
 * クリーンアップ() – 任意の tmp ファイルをクリーンアップする
 * getseq() -- 配列で読み取り、dna, len, maxlen を設定する
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- 必要ならば、tmp から良好な jmps を得る
 * writejmps() -- tmp ファイルに jmps の充填アレイを書き入れる: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     クリーンアップ();                          /* クリーンアップ tmp file */
long    lseek();
/*
 * 書き込む場合、任意の tmp ファイルを除去する
 */
cleanup(i)      クリーンアップ
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * 読み取り、ptr を seq に戻し、 dna, len, maxlen を設定する
 *  ';', '<', or '>'で始まる行をスキップする
 * 大文字または小文字での配列
 */
char    *
getseq(file, len)       getseq
        char    *file; /* file name */
```

```
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s¥n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '¥n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                f印刷 f(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s¥n", prog,
tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '¥0';
```

表 1（続き）

```
        ...getseq
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '¥n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '¥0';
        *py = '¥0';
        (void) f クローズ(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz) g_calloc
        char    *msg;           /* ルーチンと呼ばれるプログラム */
        int     nx, sz;         /* 要素の数およびサイズ */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        f印刷 f(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)¥n",
prog, msg, nx, sz);
```

```
                exit(1);
            }
        }
        return(px);
}

/*
 * dx[]または tmp ファイルから最終 jmps を得る、 pp を設定する、 dmax を再設定する:
メイン()
 */
readjmps()      readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) f クローズ(fj);
                if ((fd = オープン(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        f 印刷 f(stderr, "%s: オープン出来ない() %s¥n", prog, jname);
                        クリーンアップ(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

表 1（続き）

```
        ...readjmps
                        if (j < 0 && dx[dmax].オフセット && fj) {
                                (void) lseek(fd, dx[dmax].オフセット, 0);
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct
jmp));
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].オフセット,
sizeof(dx[dmax].オフセット));
                                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                    }
                        else
                                break;          }
                if (i >= JMPS) {
                        fprintf(stderr, "%s: アラインメント中の多すぎるギャップ¥n",
プログラム);
                        クリーンアップ(1);
                }
                if (j >= 0) {
                        siz = dx[dmax].jp.n[j];
                        xx = dx[dmax].jp.x[j];
                        dmax += siz;
                        if (siz < 0) {          /* 第二配列中のギャップ */
                                pp[1].n[il] = -siz;
                                xx += siz;
                                /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
                                pp[1].x[il] = xx - dmax + len1 - 1;
                                gapy++;
                                ngapy -= siz;
/* エンドギャップを実行する場合、 MAXGAP を無視する */
                                siz = (-siz < MAXGAP || エンドギャップ)? -siz :
MAXGAP;
                                il++;
                        }
```

```
                else if (siz > 0) {    /* gap in first 配列 */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* エンドギャップを実行する場合、MAXGAP を無視する */
                        siz = (siz < MAXGAP || エンドギャップ)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* jmps の順序を逆にする        */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) クローズ(fd);
if (fj) {
        (void) 削除(jname);
        fj = 0;
        オフセット = 0;
}                               }
```

表１（続き）

```
/*
 *前のもの（もしあれば)の充填ｊｍｐ構造オフセットを書き込む: nw()
 */
writejmps(ix)  writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        f印刷 f(stderr, "%s: can't mktemp() %s¥n", prog, jname);
                        クリーンアップ(1);
                }
                if ((fj = fオープン(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: 書き込みできない %s¥n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].オフセット, sizeof(dx[ix].オフセット), 1,
fj);
}
```

【０２５５】

ＩＩＩ．　本発明の組成物および方法

本発明は、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその機能性断片、ならびに造血系腫瘍の処置におけるそれらの使用方法を提供する。

【０２５６】

一態様において、本発明は、上記または下記のポリペプチドのいずれかと、好ましくは特異的に結合する抗体を提供する。任意に、抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖ断片、ダイアボディ、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、または抗ＦｃＲＨ５ポリペプチド抗体とそのそれぞれの抗原エピトープとの結合を競合的に抑制する抗体である。本発明の抗体は、任意に、増殖阻害剤または細胞傷害性物質、例えば毒素、例えばアウリスタチン、マイタンシノイド、ドロスタチン誘導体またはカリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解酵素等と接合され得る。本発明の抗体は、任意に、ＣＨＯ細胞または細菌細胞中で産生され得、好ましくはそれらが結合する細胞の死を誘導する。検出目的のために、本発明の抗体は、検出可能的に標識され、固体支持体と結合され得る。

【０２５７】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に

対するＦａｂ断片としての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）に示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、ネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのネズミ抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和力）の一価親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２５８】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）に示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、ネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのネズミ抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和力）の一価親和力より低い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９，１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２５９】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する抗体の一価親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、ネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのネズミ抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和力）の一価親和力より高い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６０】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、その二価型でのネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＦａｂ断片としてのキメラ抗体の親和力）の親和力と実質的に同一であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６１】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、その二価型でのネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしてのキメラ抗体の親和力）の親和力より低い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９，１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５または６０分の１より低いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６２】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対する二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）で示されるような軽鎖および重鎖可変ドメイン配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる、その二価型でのネズミ抗体（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）またはキメラ抗体（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしてのキメラ抗体の親和力）の親和力より高い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０倍より高いヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６３】
別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。さらなる態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４ｎＭ±０．０４であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。
【０２６４】
別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３２ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３６ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４４ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４８ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．５ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３ｎＭ～０．５ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３２ｎＭ～０．４８ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３６ｎＭ～０．４４ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。
【０２６５】
別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。さらなる態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２ｎＭ±０．０２であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。
【０２６６】
別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１２ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１４ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１６ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１８ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供す

る。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２２ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２４ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２６ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．２８ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３０ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１ｎＭ～０．３ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１２ｎＭ～０．２８ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１４ｎＭ～０．２６ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１６ｎＭ～０．２４ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．１８ｎＭ～０．２２ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６７】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．５ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。さらなる態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．５ｎＭ±０．０１であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。

【０２６８】

別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．５ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．６ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．７ｎＭまたはそれより良好であるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えばＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．３ｎＭ～０．７ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．４ｎＭ～０．６ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。別の態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５に対するその二価型の抗体の親和力（例えば、ＦｃＲＨ５に対するＩｇＧとしての抗体の親和力）が０．５ｎＭ～０．５５

ｎＭであるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。
【０２６９】
一態様では、ＦｃＲＨ５に対するネズミ抗体の一価親和力は、図９（配列番号１８）および図１０（配列番号２０）の可変ドメイン配列を含むＦａｂ断片の結合親和力と実質的に同一である。
【０２７０】
当該技術分野で十分に確立されているように、その受容体に対するリガンドの結合親和力は、種々の検定のいずれかを用いて決定され、種々の定量的値に換算して表され得る。したがって、一実施形態では、結合親和力は、Ｋｄ値として表され、固有の結合親和力を反映する（例えば、最小化結合活性作用を伴う）。無細胞であるかまたは細胞関連設定であるか否かにかかわらず、一般的に且つ好ましくは、結合親和力はin vitroで測定される。本明細書中でさらに詳細に記載されるように、結合親和力おける倍差は、ヒト化抗体（例えばＦａｂ形態）の一価結合親和力値と参照／比較抗体（例えばＦａｂ形態）（例えば、ドナー超可変領域配列を有するネズミ抗体）の一価結合親和力値との比に換算して定量され得るが、この場合、結合親和力は類似の検定条件下で決定される。したがって、一実施形態では、結合親和力における倍差は、Ｆ子Ａｂ形態のヒト化抗体と上記参照／比較Ｆａｂ抗体のＫｄ値の比として決定される。例えば、一実施形態では、本発明の抗体（Ａ）が参照抗体（Ｍ）の親和力より「３倍低い」親和力を有する場合には、Ａに関するＫｄ値が３×である場合、ＭのＫｄ値は１×であり、ＡのＫｄ対ＭのＫｄの比は３：１である。逆に、一実施形態では、本発明の抗体（Ｃ）が参照抗体（Ｒ）の親和力より「３倍高い」親和力を有する場合には、Ｃに関するＫｄ値が１×である場合、ＲのＫｄ値は３×であり、ＣのＫｄ対ＲのＫｄの比は１：３である。本明細書中に記載されるものを含めて当該技術分野で既知の多数の検定、例えばBiacore、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）およびＥＬＩＳＡを用いて、結合親和力測定値を得ることができる。
【０２７１】
一態様では、ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、以下のものを含む抗体が提供される：
（ａ）以下の：
（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号２６）を含むＨＶＲ－Ｌ１
（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴ（配列番号２７）を含むＨＶＲ－Ｌ２
（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴ（配列番号２８）を含むＨＶＲ－Ｌ３
（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳ（配列番号３５）を含むＨＶＲ－Ｈ１
（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲ（配列番号３６）を含むＨＶＲ－Ｈ２
（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹ（配列番号３７）を含むＨＶＲ－Ｈ３
からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５または６つのＨＶＲ。
一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号２６の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号２７の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号２８の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号３５の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号３６の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号３７の配列を含む。一実施形態では、（本明細書中に記載されるような組合せで）これらの配列を含む本発明の抗体は、ヒト化またはヒト抗体である。
【０２７２】
一態様では、ＦｃＲＨ５と結合する抗体であって、以下のものを含む抗体が提供される：
（ａ）以下の：
（ｉ）配列ＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号２６）を含むＨＶＲ－Ｌ１
（ｉｉ）配列ＳＡＳＹＲＹＴ（配列番号２７）を含むＨＶＲ－Ｌ２
（ｉｉｉ）配列ＱＱＨＦＳＳＰＲＴ（配列番号２８）を含むＨＶＲ－Ｌ３

（ｉｖ）配列ＧＦＴＦＳＳＹＡＶＳ（配列番号３５）を含むＨＶＲ－Ｈ１
（ｖ）配列ＡＴＩＳＳＧＧＳＬＴＦＹＬＤＳＶＲ（配列番号３６）を含むＨＶＲ－Ｈ２
（ｖｉ）配列ＰＩＰＤＹＹＡＬＤＹ（配列番号３７）を含むＨＶＲ－Ｈ３
からなる群から選択される少なくとも１、２、３、４、５または６つのＨＶＲ；ならびに
（ｂ）変異体ＨＶＲ配列は、配列番号２６、２７、２８、３５、３６または３７で示される配列の少なくとも１つの残基の修飾を含む、少なくとも１つの変異体ＨＶＲ。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号２６の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号２７の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号２８の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号３５の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号３６の配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体のＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号３７の配列を含む。一実施形態では、（本明細書中に記載されるような組合せで）これらの配列を含む本発明の抗体は、ヒト化またはヒト抗体である。

【０２７３】

一態様では、本発明は、１、２、３、４、５または６つのＨＶＲを含む抗体を提供するが、この場合、各ＨＶＲが配列番号２６、２７、２８、３５、３６または３７からなる群から選択される配列を含むか、それらからなるか、または本質的にそれらからなり、そして配列番号２６がＨＶＲ－Ｌ１に対応し、配列番号２７がＨＶＲ－Ｌ２に対応し、配列番号２８がＨＶＲ－Ｌ３に対応し、配列番号３５がＨＶＲ－Ｈ１に対応し、配列番号３６がＨＶＲ－Ｈ２に対応し、配列番号３７がＨＶＲ－Ｈ３に対応する。一実施形態では、本発明の抗体は、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２およびＨＶＲ－Ｈ３を含み、それらは各々、その順で、配列番号２６、２７、２８、３５、３６および３７を含む。

【０２７４】

本発明の抗体中の変異体ＨＶＲは、ＨＶＲ内に１つ以上の残基の修飾を有し得る。

【０２７５】

宿主対象中で用いるための治療薬は、好ましくは、上記対象中の作用物質に対して免疫原性応答をほとんどまたは全く引き出さない。一実施形態では、本発明は、このような作用物質を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、宿主対象中の配列番号１８＆２０の配列を含む抗体と比較して、実質的低レベルで、ヒト抗マウス抗体応答（ＨＡＭＡ）を引き出すか、および／または引き出すよう発現されるヒト化抗体を提供する。別の例では、本発明は、ヒト抗マウス抗体応答（ＨＡＭＡ）を最小度に引き出すかまたは全く引き出さない、および／または最小度に引き出すかまたは全く引き出さないことが予期されるヒト化抗体を提供する。一例では、本発明の抗体は、臨床的に許容可能なレベルで、またはそれより低いレベルである抗マウス抗体応答を引き出す。

【０２７６】

本発明のヒト化抗体は、その重鎖および／または軽鎖可変ドメイン中に、１つ以上のヒトおよび／またはヒトコンセンサス非超可変領域（例えば、フレームワーク）配列を含み得る。いくつかの実施形態では、１つ以上の付加的修飾が、ヒトおよび／またはヒトコンセンサス非超コンセンサス領域配列内に存在する。一実施形態では、本発明の抗体の重鎖可変ドメインは、ヒトコンセンサスフレームワーク配列を含み、これは、一実施形態では、亜群ＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列である。一実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも１つのアミノ酸位置で修飾された変異体亜群ＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体の軽鎖可変ドメインはヒトコンセンサスフレームワーク配列を含み、これは、一実施形態では、κＩコンセンサスフレームワーク配列である。一実施形態では、本発明の抗体は、少なくとも１つのアミノ酸位置で修飾された変異体κＩコンセンサスフレームワーク配列を含む。

【０２７７】

当該技術分野で知られているように、且つ以下の本明細書中で詳細に記載されるように

、抗体の超可変領域を描くアミノ酸位置／境界は、（下記のような）当該技術分野で既知の状況および種々の定義によって、変化し得る。可変ドメイン内のいくつかの位置は、これらの位置が一組の判定基準下では超可変領域内にあると思われるが、一方、異なる組の判定基準下では超可変領域の外側にあると思われ得るハイブリッド超可変位置として見られ得る。これらの位置のうちの１つ以上は、（以下でさらに記載されるような）延長超可変領域中にも見出され得る。本発明は、これらのハイブリッド超可変位置における修飾を含む抗体を提供する。一実施形態では、これらの超可変位置としては、重鎖可変ドメイン中の１つ以上の位置２６～３０、３３～３５Ｂ、４７～４９、５７～６５、９３、９４および１０１～１０２が挙げられる。一実施形態では、これらのハイブリッド超可変位置としては、軽鎖可変ドメイン中の位置２４～２９、３５～３６、４６～４９、５６および９７のうちの１つ以上が挙げられる。一実施形態では、本発明の抗体は、１つ以上のハイブリッド超可変位置で修飾されたヒト可変ヒト亜群コンセンサスフレームワーク配列を含む。

【０２７８】

一態様では、本発明の抗体は、位置２６～３０、３３～３５、４８～４９、５８、６０～６３、９３および１０１のうちの１つ以上で修飾された変異体ヒト亜群ＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【０２７９】

一態様では、本発明の抗体は、位置２４、２７～２９、５６および９７のうちの１つ以上で修飾された変異体ヒトκ亜群Ｉコンセンサスフレームワーク配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【０２８０】

一態様では、本発明の抗体は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６で、あるいは位置２６～３０、３３～３５、４８～４９、５８、６０～６３、９３および１０１の全てで修飾された変異体ヒト亜群ＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【０２８１】

一態様では、本発明の抗体は、１、２、３、４、５で、または位置２４、２７～２９、５６および９７の全てで修飾された変異体ヒトκ亜群Ｉコンセンサスフレームワーク配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【０２８２】

本発明の抗体は、抗体が所望の生物学的特質（例えば、所望の結合親和力）を示すことを条件に、任意の適切なヒトまたはヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含み得る。一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトκ軽鎖のフレームワーク配列の少なくとも一部（または全部）を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトκ亜群Ｉフレームワークコンセンサス配列の一部（または全部）を含む。

【０２８３】

一態様では、本発明の抗体は、図９～１１のうちの１つに示されるフレームワーク配列を含む重鎖および／または軽鎖可変ドメインを含む。

【０２８４】

一態様では、本発明の抗体は、細胞傷害性物質と接合されるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体である。一態様では、細胞傷害性物質と接合されるヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体は、異種移植片における腫瘍進行を抑制する。

【０２８５】

一態様では、ヒト化抗体およびキメラ抗体はともに一価である。一実施形態では、ヒト化およびキメラ抗体はともに、Ｆｃ領域と連結される単一Ｆａｂ領域を含む。一実施形態では、参照キメラ抗体は、ヒトＦｃ領域と結合される図２（配列番号１１）および図４（配列番号１３）に示される可変ドメイン配列を含む。一実施形態では、ヒトＦｃ領域は、ＩｇＧのもの（例えば、ＩｇＧ１、２、３または４）である。

【０２８６】

一態様では、本発明は、図９～１１に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施形態では、可変ドメインは、図９～１１に示されるＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣ配列を含む。一実施形態では、抗体は、図１１に示されるＣＨ１および／またはＦｃ配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図１０～１１に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列、ならびに図１０～１１に示されるＦＲ１－ＨＣ、ＦＲ２－ＨＣ、ＦＲ３－ＨＣおよび／またはＦＲ４－ＨＣ配列を含む重鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図１０～１１に示されるＨＶＲ１－ＨＣ、ＨＶＲ２－ＨＣおよび／またはＨＶＲ３－ＨＣ配列、ならびに図１０～１１に示されるＣＨ１および／またはＦｃ（図１１）を含む重鎖可変ドメインを含む。

【０２８７】

一態様では、本発明は、図９および１１に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。一実施形態では、可変ドメインは、図９および１１に示されるＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣ配列を含む。一実施形態では、抗体は、図１１に示されるＣＬ１配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図９および１１に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列、ならびにＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣ配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図９および１１に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列、ならびにＣＬ１配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、本発明の抗体は、図９および１１に示されるＨＶＲ１－ＬＣ、ＨＶＲ２－ＬＣおよび／またはＨＶＲ３－ＬＣ配列、ならびにＦＲ１－ＬＣ、ＦＲ２－ＬＣ、ＦＲ３－ＬＣおよび／またはＦＲ４－ＬＣ配列、ならびに図１１に示されるＣＬ１配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【０２８８】

一態様では、本発明の抗体は、親抗体の１つ以上のアミノ酸がＷＯ２００６／０３４４８８；ＵＳ２００７／００９２９４０（これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）に開示されるような遊離システインアミノ酸で置き換えられた、システイン操作された抗体を包含する。任意の形態の抗ＦｃＲＨ５抗体が、そのように操作され、すなわち突然変異化され得る。例えば、親Ｆａｂ抗体断片は、「チオＦａｂ」として本明細書中で言及されるシステイン操作されたＦａｂを形成するよう操作され得る。同様に、親モノクローナル抗体は、「チオＭａｂ」を形成するよう操作され得る。単一の部位突然変異がチオＦａｂ中で単一の操作システイン残基を生じるが、一方、ＩｇＧ抗体の二量体的性質のため、単一の部位突然変異がチオａｂ中では２つの操作システイン残基を生じる、ということに留意すべきである。本発明のシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体としては、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラモノクローナル抗体、ならびに抗体の抗原結合断片、融合ポリペプチド、および細胞関連ＦｃＲＨ５ポリペプチドを優先的に結合する類似体が挙げられる。システイン操作された抗体は、代替的には、ファージ表示抗体設計および選択による、あるいは軽鎖および／または重鎖フレームワーク配列および定常領域のde novo設計による、といったような親抗体を変更することを必ずしも伴わずに、抗体の配列設計および／または選択に起因する抗体またはＦａｂ中に本明細書中に開示される位置にシステインを含む抗体を含み得る。システイン操作された抗体は、０．６～１．０；０．７～１．０または０．８～１．０の範囲のチオール反応性値を有する１つ以上の遊離システインアミノ酸を含む。遊離システインアミノ酸は、親抗体へ操作され、ジスルフィド架橋の一部でないシステイン残基である。システイン操作された抗体は、例えばマレイミドまたはハロアセチルを介した操作されたシステインの部位での細胞傷害性および／ま

たは画像処理化合物の結合のために有用である。マレイミド基に対するＣｙｓ残基のチオール官能基の求核的反応性は、リシン残基のアミノ基、あるいはＮ末端アミノ基のようなタンパク質中の任意の他のアミノ酸官能基と比較して、約１０００倍高い。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬中のチオール特異的官能基はアミン基と反応し得るが、しかしより高いｐＨ（＞９．０）およびより長い反応時間が必要とされる（Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London）。

【０２８９】

一態様では、本発明のシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、適切な位置に操作されたシステインを含み、そこで、その位置は、軽鎖においてはKabat等に従って（Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD参照）、重鎖（Ｆｃ領域を含めて）においてはＥＵ番号付け（Kabat et al. (1991)、上記参照）に従って、番号付けされる。

【０２９０】

一態様では、本発明は、１つ以上の遊離システインアミノ酸を含むシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体であって、ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合し、親抗ＦｃＲＨ５抗体の１つ以上のアミノ酸残基をシステインで置き換えることを包含する工程により調製されるシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を包含する（この場合、親抗体は少なくとも１つの本明細書中に記載されるＨＶＲ配列を含む）。

【０２９１】

ある態様では、本発明は、本明細書中に開示されるような全長アミノ酸配列を有するシステイン操作された抗体、または本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠くシステイン操作された抗体アミノ酸配列と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、代替的には少なくとも約８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体に関する。

【０２９２】

さらなる態様では、本発明は、（ａ）本明細書中に開示されるような全長アミノ酸配列を有するシステイン操作された抗体、（ｂ）本明細書中に開示されるようなシグナルペプチドを欠くシステイン操作された抗体アミノ酸配列、（ｃ）本明細書中に開示されるような、シグナルペプチドを有するかまたは有さない、膜貫通システイン操作された抗体の細胞外ドメイン、（ｄ）本明細書中に開示される核酸配列のいずれかによりコードされるアミノ酸配列、あるいは（ｅ）本明細書中に開示されるような全長システイン操作された抗体アミノ酸配列の任意の他の特異的限定断片をコードするＤＮＡ分子の相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む単離システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体に関する。

【０２９３】

具体的態様では、本発明は、Ｎ末端シグナル配列を有さないか、および／または開始メチオニンを有さない、本明細書中に記載されるようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる、単離システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。それを産生するための工程も本明細書中に記載されており、その工程は、システイン操作された抗体の発現に適した条件下で適切なコード核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養すること、ならびに細胞培養からシステイン操作された抗体を回収することを包含する。

【０２９４】

本発明の別の態様は、膜貫通ドメイン欠失されるかまたは膜貫通ドメイン不活性化される単離された、システイン操作されたＦｃＲＨ５抗体を提供する。その産生工程も本明細書中に記載されており、その工程は、システイン操作された抗体の発現に適した条件下で適切なコード核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養すること、ならびに細胞培養

からシステイン操作された抗体を回収することを包含する。

【０２９５】

他の態様では、本発明は、異種（非ＦｃＲＨ５）ポリペプチドと融合される本明細書記載のシステイン操作された抗体のいずれかを含む単離抗ＦｃＲＨ５キメラシステイン操作された抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、例えばエピトープタグ配列または免疫グロブリンのＦｃ領域のような異種ポリペプチドと融合される本明細書記載のシステイン操作された抗体のいずれかを含む。

【０２９６】

システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、または抗ＦｃＲＨ５ポリペプチド抗体とそのそれぞれの抗原エピトープとの結合を競合的に抑制する抗体であり得る。本発明の抗体は、任意に、増殖阻害剤または細胞傷害性物質、例えば毒素、例えばアウリスタチン、マイタンシノイド、ドロスタチン誘導体、カリケアマイシン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解酵素等と接合され得る。本発明の抗体は、任意に、ＣＨＯ細胞または細菌細胞中で産生され得、好ましくはそれらが結合する細胞の成長または増殖を抑制し、あるいはその死を誘導する。診断目的のために、本発明の抗体は、検出可能的に標識され、固体支持体と結合され得る。

【０２９７】

本発明の他の態様において、本発明は、本明細書記載の抗ＦｃＲＨ５抗体および抗ＦｃＲＨ５システイン操作された抗体のいずれかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含む宿主細胞も、提供される。例として、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞、酵母細胞であり得る。本明細書記載のポリペプチドのいずれかを産生する工程がさらに提供され、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること、ならびに細胞培養から所望のポリペプチドを回収することを包含する。

【０２９８】

システイン操作された抗体は癌の治療に有用であり、細胞表面および膜貫通受容体、ならびに腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に特異的な抗体を包含する。このような抗体は、裸抗体（薬剤または標識部分と接合されない）として、または抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）として用いられ得る。本発明のシステイン操作された抗体は、チオール反応性試薬と部位特異的におよび効率的に結合され得る。チオール反応性試薬は、多機能性リンカー試薬、捕捉標識試薬、蛍光体試薬または薬剤－リンカー中間体であり得る。システイン操作された抗体は、固相支持体上に固定され、および／または薬剤部分と接合される検出可能な標識で標識され得る。チオール反応性は、反応性システインアミノ酸によるアミノ酸の置換が、アミノ酸範囲：Ｌ１０～Ｌ２０、Ｌ１０５～Ｌ１１５、Ｌ１０９～Ｌ１１９、Ｌ１１６～Ｌ１２６、Ｌ１２２～Ｌ１３２、Ｌ１６３～Ｌ１７３、Ｌ２００～Ｌ２１０から選択される軽鎖中の範囲内、ならびにアミノ酸範囲：Ｈ１～Ｈ１０、Ｈ１８～Ｈ２８、Ｈ７９～Ｈ８９、Ｈ１０７～Ｈ１１７、Ｈ１０９～Ｈ１１９、Ｈ１１１～Ｈ１２１から選択される重鎖中の範囲内で、ならびにＨ２７０～Ｈ２８０、Ｈ３６６～Ｈ３７６、Ｈ３９１～４０１から選択される範囲内のＦｃ領域でなされ得る任意の抗体に一般化され得るが、この場合、アミノ酸位置の番号は、カバト番号付けシステム（Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）の位置１で始まり、その後、ＷＯ２００６０３４４８８；ＵＳ　２００７／００９２９４０に開示されたように順次、続く。チオール反応性は、さらにまた、抗体のあるドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）および重鎖定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３に一般化され得る。０．６以上のチオール反応性値を生じるシステイン置換は、無傷抗体：それぞれＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ、例えばＩｇＧサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＡ２の重鎖定常ドメインα、δ、ε、γおよびμでなされ得る。このような抗体およびそれらの使用は、ＷＯ２００６/０３４４８８；ＵＳ　２００７／００９２９４０に開示されている。

【０２９９】
本発明のシステイン操作された抗体は、好ましくは、それらの野生型親抗体対応物の抗原結合能力を保持する。したがって、システイン操作された抗体は、好ましくは、抗原と特異的に結合し得る。このような抗原としては、例えば腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、細胞表面受容体タンパク質およびその他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発生または分化（に機能的に関与することが既知であるかまたは疑われる）に関連した分子、リンフォカイン、サイトカイン、細胞周期調節に関与する分子、血管形成に関与する分子、ならびに血管新生（に機能的に関与することが既知であるかまたは疑われる）に関連した分子が挙げられる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子（すなわち、ＣＤタンパク質、例えばＦｃＲＨ５（これに限定されない））であり得る。本発明のシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、それらの親抗ＦｃＲＨ５抗体対応物の抗原結合能力を保持する。したがって、本発明のシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、細胞、例えばＢ細胞（これに限定されない）の表面で抗原が発現される場合を含めて、ヒト抗ＦｃＲＨ５アイソフォームβおよび／またはαを含めたＦｃＲＨ５抗原と好ましくは特異的に結合し得る。

【０３００】
一態様では、本発明の抗体は、反応性部分、活性化部分または反応性システインチオール基を介して抗体と共有結合され得る任意の標識部分と接合され得る（Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL）。結合標識は、（ｉ）検出可能シグナルを提供し；（ｉｉ）第二標識と相互作用して、第一または第二標識により提供される検出可能シグナルを修飾し、例えばＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー移動）を生じ；（ｉｉｉ）抗原またはリガンドとの相互作用を安定化し、それらとの結合親和力を増大し；（ｉｖ）電荷、親水性、形状またはその他の物理的パラメーターにより移動度、例えば電気泳動移動度または細胞透過性に作用し、あるいは（ｖ）リガンド親和力、抗体／抗原結合またはイオン錯体形成を調整するために捕捉部分を提供するよう機能し得る。

【０３０１】
標識化されたシステイン操作された抗体は、例えば、特定の細胞、組織または血清における当該抗原の発現を検出するための診断検定に有用であり得る。診断用途に関しては、抗体は、典型的には、検出可能部分で標識される。以下の部類に一般的に群分けされ得る多数の標識が利用可能である：

【０３０２】
放射性同位体（放射性核種）、例えば^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{64}Ｃｕ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{177}Ｌｕ、^{211}Ａｔまたは^{213}Ｂｉ。放射性同位体標識抗体は、受容体標的化画像処理実験で有用である。抗体は、放射性同位体金属に結合し、キレート化し、またはそうでなければ錯体形成するリガンド試薬で標識され得るが、ここで、試薬は、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)に記載された技法を用いて、抗体の操作されたシステインチオールと反応性である。金属イオンと錯体形成し得るキレートリガンドとしては、ＤＯＴＡ、ＤＯＴＰ、ＤＯＴＭＡ、ＤＴＰＡおよびＴＥＴＡ（Macrocyclics, Dallas, T)が挙げられる。放射性核種は、本発明の抗体－薬剤接合体による錯体形成を介して標的化され得る（Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146）。

【０３０３】
リンカー試薬、例えばＤＯＴＡ－マレイミド（４－マレイミドブチルアミドベンジル－ＤＯＴＡ）は、Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807の手順に従って、アミノベンジル－ＤＯＴＡと、イソプロピルクロロホルメート（Aldrich

）で活性化される４－マレイミド酪酸（Fluka）との反応により調製され得る。ＤＯＴＡ－マレイミド試薬は、システイン操作された抗体の遊離システインアミノ酸と反応し、抗体上に金属錯体形成リガンドを提供する（Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86）。キレートリンカー標識化試薬、例えばＤＯＴＡ－ＮＨＳ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル））は、市販されている（Macrocyclics, Dallas, TX）。放射性核種標識化抗体を用いた受容体標的画像処理は、腫瘍組織中の抗体の漸進的蓄積の検出および定量化による経路活性化のマーカーを提供し得る（Albert et al (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210）。接合放射性金属は、リソソーム分解後に細胞内に残留し得る。

【０３０４】

画像処理実験のための抗体標識として適している金属キレート化合物錯体が開示されている：US5342606; US5428155; US5316757; US5480990; US5462725; US5428139; US5385893; US5739294; US5750660; US5834456; Hnatowich et al (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157; Meares et al (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares et al (1990) J. Cancer1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula et al (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis et al (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera et al (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg et al (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee et al (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer et al (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo et al (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend et al (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula et al (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi et al (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli et al (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

【０３０５】

蛍光標識、例えば希土類キレート化合物（ユーロピウムキレート化合物）、フルオレセイン型、例えばＦＩＴＣ、５－カルボキシフルオレセイン、６－カルボキシフルオレセイン；ローダミン型、例えばＴＡＭＲＡ；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；ならびにその類似体。蛍光標識は、例えばCurrent Protocols in Immunology（上記）に開示された技法を用いて、抗体と接合され得る。蛍光染料および蛍光標識試薬は、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものを包含する。

【０３０６】

種々の酵素－基質標識が利用可能であり、または開示されている（ＵＳ４２７５１４９）。酵素は、一般的に、種々の技法を用いて測定され得る色原性基質の化学的変更を触媒する。例えば、酵素は、基質における色変化を触媒し、これは、分光分析的に測定され得る。代替的には、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変更し得る。蛍光の変化を定量するための技法は、上で説明されている。化学発光基質は、化学反応により電子的に励起されるようになり、次いで、（例えば、化学発光計を用いて）測定され得る光を出すか、または蛍光受容体にエネルギーを供与し得る。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第４７３７４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリ性ホスファターゼ（ＡＰ）、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ライソザイム、サッカリドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、複素環式オキシダーゼ（例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、ミク

ロペルオキシダーゼ等が挙げられる。酵素を抗体に接合するための技法は、O'Sullivan et al (1981) “Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay”, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166に記載されている。

【０３０７】

酵素－基質組合せの例としては、例えば以下のものが挙げられる：

（ｉ）ホースラディッシュペルオキシダーゼと基質としての水素ペルオキシダーゼ。ここで、水素ペルオキシダーゼは染料前駆体（例えば、オルトフェニレンジアミン（ＯＰＤ）または３，３’，５，５’－テトラメチルベンジン塩酸塩（ＴＭＢ））を酸化する。

（ｉｉ）アルカリ性ホスファターゼ（ＡＰ）と色原性基質としてのパラ－ニトロフェニルホスフェート；ならびに

（ｉｉｉ）β－Ｄ－ガラクトシダーゼと色原性基質（例えば、Ｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ）または蛍光原基質４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ。

【０３０８】

多数の他の酵素－基質の組合せが、当業者に利用可能である。一般的考察に関しては、米国特許第４２７５１４９号および米国特許第４３１８９８０号を参照されたい。

【０３０９】

標識は、アミノ酸側鎖、活性化アミノ酸側鎖、システイン操作された抗体等と間接的に接合され得る。例えば、抗体はビオチンと接合され得る、上記標識の３つの広範な部類のいずれもアビジンまたはストレプトアビジンと接合され得る、その逆も言える。ビオチンはストレプトアビジンと選択的に結合し、したがって、標識はこの間接的方式で抗体と接合され得る。代替的には、ポリペプチド変異体との標識の間接的接合を達成するために、ポリペプチド変異体は小ハプテン（例えば、ジゴキシン）と接合され、異なる型の標識のうちの１つが抗ハプテンポリペプチド変異体（例えば、抗ジゴキシン抗体）と接合される。このようにして、ポリペプチド変異体との標識の間接的接合が達成され得る（Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego）。

【０３１０】

本発明の抗体は、任意の検定方法で、例えばＥＬＩＳＡ、競合的結合検定、直接および間接的サンドイッチ検定、ならびに免疫沈降検定で用いられ得る（Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.）。

【０３１１】

検出標識は、結合または認識事象を限定し、可視化し、定量するために有用であり得る。本発明の標識化抗体は、細胞表面受容体を検出し得る。検出可能的に標識された抗体に関する別の用途は、ビーズベースの免疫補足方法であって、ビーズを蛍光標識化抗体と接合させること、リガンドの結合時に蛍光シグナルを検出することを包含する方法である。類似の結合検出方法は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）作用を利用して、抗体－抗原相互作用を測定し、検出する。

【０３１２】

検出標識、例えば蛍光染料および化学発光染料（Briggs et al (1997) “Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids,” J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058）は、検出可能なシグナルを提供し、一般的に、好ましくは以下の特性を有する抗体を標識するのに適用可能である：（ｉ）少量の抗体が無細胞および細胞ベースの検定の両方で、高感度で検出され得るよう、標識化抗体は低バックグラウンドで非常に高いシグナルを生じるべきであり；（ｉｉ）蛍光シグナルが、光漂白を伴わずに、観察され、モニタリングされ、記録されるよう、標識化抗体は光安定性であるべきである。膜または細胞表面との標識化抗体の細胞表面結合を包含する適用に関して、標識は、好ましくは（ｉｉｉ）有効な接合体濃度および検出感度を達成するために良好な水溶性を有し、ならびに（ｉｖ）細胞の正常な代謝過程を崩壊し、早発性細胞死を引き起こすことのないよう、生きている細胞に対して非毒性である。

【０３１３】
細胞蛍光強度の直接的定量および蛍光的標識化事象、例えばペプチド－染料接合体の細胞表面結合の計数は、生細胞またはビーズを用いた混合および読取式非放射性検定を自動化する系（ＦＭＡＴ（登録商標）８１００　ＨＴＳシステム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.）で実行され得る（Miraglia, “Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204）。標識化抗体の用途としては、細胞表面受容体結合検定、免疫捕捉検定、蛍光結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）、カスパーゼ切断（Zheng, “Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo”, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23；ＵＳ　６３７２９０７）、アポトーシス（Vermes, “A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V” (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51）、および細胞傷害性検定も挙げられる。蛍光定量的微量検定技法を用いて、細胞表面を標的にする分子による上方または下方調節を特定し得る（Swartzman, “A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology”, (1999) Anal. Biochem. 271:143-51）。

【０３１４】
本発明の標識化抗体は、生物医学および分子画像処理の以下のような種々の方法および技法により、画像処理バイオマーカーおよびプローブとして有用である：（ｉ）ＭＲＩ（磁気共鳴画像処理）；（ｉｉ）ＭｉｃｒｏＣＴ（コンピューター断層撮影）；（ｉｉｉ）ＳＰＥＣＴ（単光子放射型コンピューター断層撮影）；（ｉｖ）ＰＥＴ（陽電子放射断層撮影）Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49；（ｖ）生物発光；（ｖｉ）蛍光；および（ｖｉｉ）超音波。免疫シンチグラフィーは、放射性物質で標識される抗体が動物またはヒト患者に投与され、抗体が局在する身体中の部位についての像が撮影される画像処理手法である。（米国特許第６５２８６２４号）。画像処理バイオマーカーは、正常の生物学的過程、病理学的過程、または治療的介入に対する薬理学的応答の指標として、客観的に測定され、評価され得る。バイオマーカーは、いくつかの型を有し得る：０型は、疾患の自然発達歴マーカーであり、既知の臨床的指標、例えば関節リウマチにおける滑膜炎症のＭＲＩ査定と長期間に亘って相関する；Ｉ型マーカーは、作用機序に従って介入の効果を捕捉するが、当該機序は臨床結果を伴わない場合もある；ＩＩ型マーカーは、バイオマーカーにおける変化またはそれからのシグナルが標的化応答、例えばＣＴによる関節リウマチにおいて測定される骨侵食を「認定する」ための臨床的利益を予測する。したがって、画像処理バイオマーカーは、以下の事柄についての薬力学的（ＰＤ）治療情報を提供し得る：（ｉ）標的タンパク質の発現、（ｉｉ）治療薬の標的タンパク質への結合、すなわち、選択性、ならびに（ｉｉｉ）クリアランスおよび半減期薬物動態データ。実験室ベースのバイオマーカーと比較したin vivo画像処理バイオマーカーの利点としては、以下のものが挙げられる：非侵襲性処置、定量可能、全身査定、反復用量投与および査定、すなわち多重時点、ならびに前臨床（小動物）から臨床（ヒト）結果への潜在的に転化可能な作用。いくつかの適用に関して、生体画像処理は、前臨床試験における動物実験に取って代わるかまたはその数を最小限にする。

【０３１５】
ペプチド標識方法はよく知られている。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2；Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2；Glazer et al (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G.

(1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York；およびWong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.)；De Leon-Rodriguez et al (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis et al (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324；Li et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115；Mier et al (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237を参照。

【０３１６】

２つの部分、すなわち十分に近接した蛍光レポーターおよび失活剤で標識されるペプチドおよびタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を受ける。レポーター基は、典型的には、ある波長の光により励起され、最大の明るさでの放射のために適切なストークシフトで、受容体または死活剤基にエネルギーを移す蛍光染料である。蛍光染料としては、拡張芳香族性を有する分子、例えばフルオレセインおよびローダミン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。蛍光レポーターは、無傷ペプチド中の失活剤部分により部分的にまたは有意に消光され得る。ペプチダーゼまたはプロテアーゼによるペプチドの切断時に、蛍光の検出可能な増大が測定され得る（Knight, C. (1995) “Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes”, Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34）。

【０３１７】

本発明の標識化抗体は、親和性精製剤としても用いられ得る。この工程において、標識された抗体は、当該技術分野で周知の方法を用いて、セファデックス樹脂または濾紙のような固相上に固定される。固定された抗体は、精製されるべき抗原を含有する試料と接触され、その後、支持体は、精製されるべき抗原（これは固定ポリペプチド変異体と結合される）を除いて試料中の実質的に全ての物質を除去する適切な溶媒で洗浄される。最後に、支持体は、別の適切な溶媒、例えばグリシン緩衝液、ｐＨ５．０で洗浄され、ポリペプチド変異体から抗原が放出される。

【０３１８】

標識試薬は、典型的には、反応性官能基を保有し、これは、（ｉ）システイン操作された抗体のシステインチオールと直接反応して、標識化抗体を形成し、（ｉｉ）リンカー試薬と反応して、リンカー標識中間体を形成し、または（ｉｉｉ）リンカー抗体と反応して標識化抗体を形成し得る。標識試薬の反応性官能基としては、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル（例えば、ＮＨＳ、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）、イソチオシアネート、塩化スルホニル、２，６－ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステルおよびホスホルアミダイトが挙げられるが、他の官能基も用いられ得る。

【０３１９】

例となる反応性官能基は、検出可能標識、例えばビオチンまたは蛍光染料のカルボキシル基置換基のＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル（ＮＨＳ）である。標識のＮＨＳエステルは、予め形成され、単離され、精製されるかおよび／または特性化され、あるいはそれは、in situで形成され、抗体の求核性基と反応され得る。典型的には、カルボキシル型の標識は、カルボジイミド試薬、例えばジクロロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、あるいはウロニウム試薬、例えばＴＳＴＵ（Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート、ＨＢＴＵ（Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート）またはＨＡＴＵ（Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート）、活性剤、例えば１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、ならびにＮ－ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組合せと反応することにより活性化されて、標識のＮＨＳエステルを生じる。いくつかの場合、標識および抗体は、標識のin situ活性化ならびに抗体との反応によりカップリングされて、標識－抗体接合体を一段階で形成し得る。その他の活性化およびカップリング試薬としては、ＴＢＴＵ（２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾ－１－いる）－１－１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフ

ェート）、ＴＦＦＨ（Ｎ，Ｎ’，Ｎ”，Ｎ’”－テトラメチルウロニウム２－フルオロ－ヘキサフルオロホスフェート）、ＰｙＢＯＰ（ベンゾトリアゾール－１－イル－オキシ－トリス－ピロリジノ－ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、ＥＥＤＱ（２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロ－キノリン）、ＤＣＣ（ジクロロヘキシルカルボジイミド）；ＤＩＰＣＤＩ（ジイソプロピルカルボジイミド）、ＭＳＮＴ（１－（メシチレン－２－スルホニル）－３－ニトロ－１Ｈ－１，２，４－トリアゾール、ならびにアリールスルホニルハリド、例えば、トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリドが挙げられる。

【０３２０】

本発明のアルブミン結合ペプチド－Ｆａｂ化合物

一態様において、本発明の抗体は、アルブミン結合タンパク質と融合される。血漿－タンパク質結合は、短命分子の薬物動態特性を改良する有効な手段であり得る。アルブミンは、血漿中で最も豊富なタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド（ＡＢＰ）は、組織取込み、移行および拡散を含む、融合活性ドメインタンパク質の薬力学を変更し得る。これらの薬力学的パラメーターは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列の特定の選択により調整され得る（ＵＳ　２００４０００１８２７）。一連のアルブミン結合ペプチドが、ファージ表示スクリーニングにより特定された（Dennis et al. (2002) “Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins” J Biol Chem. 277:35035-35043；ＷＯ　０１／４５７４６）。本発明の化合物には、（ｉ）Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038；（ｉｉ）ＵＳ　２００４０００１８２７（[0076] 配列番号９～２２）；および（ｉｉｉ）ＷＯ　０１／４５７４６（12～13ページ）（これらの記載内容はすべて、参照により本明細書中で援用される）により教示されたＡＢＰ配列が含まれる。アルブミン結合（ＡＢＰ）－Ｆａｂは、１：１化学量比（１　ＡＢＰ／１　Ｆａｂ）で、アルブミン結合ペプチドをＦａｂ重鎖のＣ末端に融合することにより、操作される。アルブミンとこれらのＡＢＰ－Ｆａｂとの会合は、抗体半減期をウサギおよびマウスの２５倍以上に増大する、ということが示された。したがって、上記の反応性Ｃｙｓ残基は、これらＡＢＰ－Ｆａｂ中に導入され、細胞傷害性薬剤との部位特異的接合と、その後のin vivo動物試験のために用いられ得る。

【０３２１】

アルブミン結合ペプチド配列の例としては、配列番号５３～５７で列挙されたアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない：

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF　配列番号５３
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF　配列番号５４
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF　配列番号５５
RLIEDICLPRWGCLWEDD　配列番号５６
DICLPRWGCLW　配列番号５７

【０３２２】

抗体－薬剤接合体

別の態様では、本発明は、細胞傷害性物質、例えば化学療法薬、薬剤、増殖阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片）、あるいは放射性同位体（すなわち、放射性接合体）と接合される抗体を含む免疫接合体、または抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）を提供する。別の態様では、免疫接合体は、細胞傷害性物質または検出可能作用物質と共有結合される上記抗ＦｃＲＨ５抗体のいずれかを含む。

【０３２３】

一態様では、本発明のＦｃＲＨ５抗体は、別のＦｃＲＨ５抗体により結合されるＦｃＲＨ５上の同一エピトープと結合する。

【０３２４】

別の態様では、本発明のＦｃＲＨ５抗体は、別のＦｃＲＨ５抗体により結合されるエピ

トープとは異なるＦｃＲＨ５上のエピトープと結合する。

【０３２５】

一態様では、本発明の抗体は、第一の動物種のＦｃＲＨ５と特異的に結合し、第二の動物種のＦｃＲＨ５と特異的に結合しない。一実施形態では、第一の動物種はヒトおよび／または霊長類（例えば、カニクイザル）であり、第二の動物種はネズミ（例えば、マウス）および／またはイヌである。一実施形態では、第一の動物種はヒトである。一実施形態では、第一の動物種は、霊長類、例えばカニクイザルである。一実施形態では、第二の動物種はネズミ、例えばマウスである。一実施形態では、第二の動物種はイヌである。

【０３２６】

一態様では、本発明は、本発明の１つ以上の抗体、および担体を含む組成物を提供する。一実施形態では、担体は製薬上許容可能である。

【０３２７】

一態様では、本発明は、本発明のＦｃＲＨ５抗体をコードする核酸を提供する。

【０３２８】

一態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

【０３２９】

一態様では、本発明は、本発明の核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターは、任意の型のもの、例えば組換えベクター、例えば発現ベクターであり得る。種々の宿主細胞のいずれをも用いられ得る。一実施形態では、宿主細胞は、原核生物細胞、例えば大腸菌である。一実施形態では、宿主細胞は、真核生物細胞、例えば哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である。

【０３３０】

一態様では、本発明は、本発明の抗体の作製方法を提供する。例えば本発明は、ＦｃＲＨ５抗体（本明細書中で定義されるように、全長およびその断片を含む）の作製方法であって、上記抗体（またはその断片）をコードする本発明の組換えベクターを適切な宿主細胞中で発現すること、および上記抗体を回収することを包含する方法を提供する。

【０３３１】

一態様では、本発明は、容器、容器内に含入される組成物を含む製品であって、組成物が１つ以上の本発明のＦｃＲＨ５抗体を含む製品を提供する。一実施形態では、組成物は、本発明の核酸を含む。一実施形態では、抗体を含む組成物は、さらに、担体を含み、これはいくつかの実施形態では、製薬上許容可能である。一実施形態では、本発明の製品はさらに、対象に組成物（例えば、抗体）を投与するための使用説明書を包含する。

【０３３２】

一態様では、本発明は、本発明の１つ以上のＦｃＲＨ５抗体を含む組成物を含む第一容器；および緩衝剤を含む第二容器を包含するキットを提供する。一実施形態では、緩衝液は製薬上許容可能である。一実施形態では、アンタゴニスト抗体を含む組成物はさらに担体を含み、これは、いくつかの実施形態では、製薬上許容可能である。一実施形態では、キットはさらに、対象に組成物（例えば、抗体）を投与するための使用説明書を包含する。

【０３３３】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明のＦｃＲＨ５抗体の使用を提供する。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３４】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明の核酸の使用を提供する

。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３５】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明の発現ベクターの使用を提供する。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３６】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明の宿主細胞の使用を提供する。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３７】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明の製品の使用を提供する。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３８】

一態様では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害の治療的および／または予防的処置のための医薬剤の調製における本発明のキットの使用を提供する。一実施形態では、癌、腫瘍および／または細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。

【０３３９】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞の増殖の抑制方法であって、上記細胞を本発明の抗体と接触させ、それにより上記細胞の増殖の抑制を引き起こすことを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は、細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３４０】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置する方法であって、治療的有効量の本発明の抗体を上記哺乳動物に投与し、それにより上記哺乳動物を有効に処置することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３４１】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５の発現増大と関連した細胞増殖性障害を処置するか

または防止するための方法であって、このような処置を必要とする対象に有効量の本発明の抗体を投与し、それにより上記細胞増殖性障害を効果的に処置または防止することを包含する方法を提供する。一実施形態では、上記増殖性障害は癌である。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３４２】

一態様では、本発明は、細胞の増殖を抑制するための方法であって、上記細胞の増殖が少なくとも一部は、ＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている方法であって、上記細胞を有効量の本発明の抗体と接触させ、それにより上記細胞の増殖を抑制することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３４３】

一態様では、本発明は、哺乳動物における腫瘍を治療的に処置する方法であって、上記腫瘍の増殖が少なくとも一部は、ＦｃＲＨ５の増殖増強作用に依っている方法であって、上記細胞を有効量の本発明の抗体と接触させ、それにより上記腫瘍を有効に処置することを包含する方法を提供する。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３４４】

一態様では、本発明は、本明細書中に記載される免疫接合体、許容可能ナ希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的処方物を患者に投与することを包含する癌の処置方法を提供する。一実施形態では、癌は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施形態では、患者は、細胞傷害性物質を、抗体－薬剤接合体化合物と組合せて投与される。

【０３４５】

一態様では、本発明は、Ｂ細胞増殖の抑制方法であって、免疫接合体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下で、方法の抗体を含む免疫接合体に細胞を曝露することを包含する方法を提供する。一実施形態では、Ｂ細胞増殖は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施形態では、Ｂ細胞は異種移植片である。一実施形態では、曝露はin vitroで起こる。一実施形態では、曝露はin vivoで起こる。

【０３４６】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５を含有することが疑われる試料中のＦｃＲＨ５の存在を確定する方法であって、上記試料を本発明の抗体に曝露すること、そして上記抗体と上記試料中のＦｃＲＨ５との結合を確定することを包含する方法を提供し、ここで、上記抗体と上記試料中のＦｃＲＨ５との結合は、上記試料中の上記タンパク質の存在を示す。一実施形態では、試料は生物学的試料である。さらなる実施形態では、生物学的試料は、Ｂ細胞を含む。一実施形態では、生物学的試料は、Ｂ細胞障害および／またはＢ細胞増殖性障害、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫（これらに限定されない）を経験しているかまたはその疑いがある哺乳動物からである。

【０３４７】

一態様では、ＦｃＲＨ５を発現する細胞、例えばＢ細胞の増大に関連した細胞増殖性障害の診断方法であって、生物学的試料中の試験細胞を上記抗体のいずれかと接触させること；抗体とＦｃＲＨ５との結合を検出することにより試料中の試験細胞と結合される抗体のレベルを確定すること；そして対照試料中の細胞と結合される抗体のレベルを比較する

ことを包含する方法が提供されるが、ここで、結合される抗体のレベルは試験および対照試料中のＦｃＲＨ５発現細胞の数に正規化され、そして対照試料と比較した場合の試験試料中の結合される抗体の高レベルは、ＦｃＲＨ５を発現する細胞と関連した細胞増殖性障害の存在を示す。

【０３４８】

一態様では、血液または血清中の可溶性ＦｃＲＨ５の検出方法であって、Ｂ細胞増殖性障害の疑いがあるかまたはそれを経験している哺乳動物からの血液または血清の試験試料を本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体と接触させること、そして正常哺乳動物からの血液または血清の対照試料と比較して試験試料中の可溶性ＦｃＲＨ５の増大を検出することを包含する方法が提供される。一実施形態では、検出方法は、哺乳動物の血液または血清中の可溶性ＦｃＲＨ５の増大に関連したＢ細胞増殖性障害の診断方法として有用である。

【０３４９】

一態様では、本発明の抗体とＦｃＲＨ５を発現する細胞との結合方法であって、上記細胞を本発明の抗体と接触させることを包含する方法が提供される。一実施形態では、抗体は細胞傷害性物質と接合される。一実施形態では、抗体は増殖阻害剤と接合される。

【０３５０】

本発明の方法は、任意の適切な病理学的状態、例えばＦｃＲＨ５の発現と関連した細胞および／または組織に作用するために用いられ得る。一実施形態では、本発明の方法において標的にされる細胞は、造血系細胞である。例えば造血系細胞は、リンパ球、白血球、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞からなる群から選択されるものであり得る。一実施形態では、本発明の方法において標的にされる細胞は、Ｂ細胞またはＴ細胞である。一実施形態では、本発明の方法において標的にされる細胞は、癌細胞である。例えば癌細胞は、リンパ腫細胞、白血病細胞または骨髄腫細胞からなる群から選択されるものであり得る。

【０３５１】

本発明の方法は、さらに、追加の処置段階を包含する。例えば、一実施形態では、方法はさらに、標的化細胞および／または組織（例えば癌細胞）が放射線処置または化学療法薬に曝露される段階を包含する。

【０３５２】

本明細書中に記載されるように、ＦｃＲＨ５（またはＩＲＴＡ２）発現は、多発性骨髄腫およびバーキットリンパ腫細胞株において脱制御されることが観察されている。したがって、本発明の方法の一実施形態では、標的にされる細胞（例えば、癌細胞）は、ＦｃＲＨ５を発現しない細胞と比較して、ＦｃＲＨ５が発現されるものである。さらなる実施形態では、標的化細胞は、同一組織型の正常非癌細胞と比較した場合、ＦｃＲＨ５発現が増強される癌細胞である。一実施形態では、本発明の方法は、標的化細胞の死を引き起こす。

【０３５３】

本発明の他の態様では、本発明は、本明細書中に記載される抗体のいずれかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含む宿主細胞も、提供される。例として、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌細胞または酵母細胞であり得る。本明細書中に記載される抗体のいずれかの産生方法がさらに提供され、所望の抗体の発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること、そして細胞培養から所望の抗体を回収することを包含する。

【０３５４】

さらなる態様では、本発明は、本明細書中に記載されるような抗ＦｃＲＨ５抗体を、担体と組合せて含む物質の組成物に関する。任意に、担体は製薬上許容可能な担体である。

【０３５５】

本発明の別の態様は、抗ＦｃＲＨ５ポリペプチド抗体に応答性である症状の処置に有用な医薬剤の調製のための、本明細書中に記載されるような抗ＦｃＲＨ５抗体の使用に向けられる。

【０３５６】
本発明の別の態様は、抗体当たりの平均薬剤負荷率が約２～約５、または約３～約４である式Ｉの抗体－薬剤化合物の混合物を含む組成物である。
【０３５７】
本発明の別の態様は、式Ｉ　ＡＤＣ化合物、式Ｉ　ＡＤＣ化合物の混合物、あるいはその製薬上許容可能な塩または溶媒和物、ならびに製薬上許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む薬学的組成物である。
【０３５８】
別の態様は、式Ｉ　ＡＤＣ化合物、および抗癌特性またはその他の治療的作用を有する第二の化合物を含む薬学的組合せを提供する。
【０３５９】
別の態様は、腫瘍細胞または癌細胞を殺害するかまたはその増殖を抑制するための方法であって、腫瘍細胞または癌細胞を殺害するかまたはその増殖を抑制するのに有効である量の式Ｉの抗体－薬剤接合体、あるいはその製薬上許容可能な塩または溶媒和物で細胞を処置することを包含する方法である。
【０３６０】
別の態様は、癌の処置方法であって、治療的有効量の薬学的組成物（式Ｉ　ＡＤＣを含む）を患者に投与することを包含する方法である。
【０３６１】
別の態様は、製品、すなわち、抗体－薬剤接合体、容器、および処置を指示する包装挿入物または標識を包含するキットを含む。
【０３６２】
本発明の一態様は、式Ｉの抗体薬剤接合体化合物の製造方法であって、（ａ）システイン操作された抗体の操作されたシステイン基をリンカー試薬と反応させて抗体－リンカー中間体Ａｂ－Ｌを形成すること；そして（ｂ）Ａｂ－Ｌを活性化薬剤部分Ｄと反応させて、それにより抗体－薬剤接合体が形成されるステップを包含するか、あるいは（ｃ）薬剤部分の求核性基をリンカー試薬と反応させて、薬剤－リンカー中間体Ｄ－Ｌを形成すること；そして（ｄ）Ｄ－Ｌをシステイン操作された抗体の操作されたシステイン基と反応させて、それにより抗体－薬剤接合体を形成するステップを包含する方法である。
【０３６３】
本発明の一態様は、癌細胞を検出するための検定であって、（ａ）システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体－薬剤接合体に細胞を曝露すること；そして（ｂ）システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体－薬剤接合体化合物と細胞との結合の程度を確定することを包含する検定である。
【０３６４】
Ａ．　抗ＦｃＲＨ５抗体
一実施形態では、本発明は、治療薬として本明細書中で用途を見出し得る抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性および異種接合体抗体が挙げられる。
【０３６５】
１．ポリクローナル抗体
ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原およびアジュバントの多数回皮下（ｓｃ）
または腹腔内（ｉｐ）注射により、動物中に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質に対する関連抗原（特に、合成ペプチドが用いられる場合）を接合するために有用であり得る。例えば、抗原は、二重官能性または誘導剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介して接合）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介して）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、$SOCl_2$、または$R^1N=C=NR$（式中、ＲおよびＲ^{1}は異なるアルキル基である）を用いて、カギアナカサガイヘモシアニン（ＫＬＨ）、血清アルブミン、ウシチ

ログロブリンまたはダイズトリプシン阻害剤と接合され得る。

【０３６６】

動物は、例えば（それぞれウサギまたはマウスに関して）１００μｇまたは５μｇのタンパク質または接合体を、３容積のフロイント完全アジュバントと組合せ、多重部位で皮膚内に溶液を注射することにより、抗原、免疫学的接合体または誘導体に対して免疫化される。１ヵ月後、動物は、多重部位での皮下注射により、フロイント完全アジュバント中の元の量の１／５～１／１０のペプチドまたは接合体を追加免疫される。７～１４日後、動物は採血され、抗体力価に関して血清が検定される。動物は、力価がプラトーになるまで、追加免疫される。接合体は、タンパク質融合物として組換え細胞培養中で作られ得る。さらにまた、凝集剤、例えば明礬は、免疫応答を増強するために適切に用いられる。

【０３６７】

２．　モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製され得、あるいは組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）により作製され得る。

【０３６８】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えばハムスターが上記のように免疫化されて、免疫化のために用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を引き出す。代替的には、リンパ球は、in vitroで免疫化され得る。免疫化後、リンパ球は単離され、次いで、適切な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いて骨髄腫細胞株と融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。

【０３６９】

このように調製されたハイブリドーマ細胞は、適切な培地中に植えつけられ、増殖されるが、この培地は、好ましくは、非融合親骨髄腫細胞（融合相手とも呼ばれる）の増殖または生存を抑制する１つ以上の物質を含有する。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマのための選択的培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（ＨＡＴ培地）を含み、この物質はＨＧＰＲＴ欠乏細胞の増殖を防止する。

【０３７０】

好ましい融合相手骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択抗体産生細胞による抗体の安定高レベル産生を支持し、非融合親細胞に対して選択する選択培地に感受性であるものである。好ましい骨髄腫細胞株は、ネズミ骨髄腫株、例えばSalk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍に、ならびにAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USAから入手可能なＳＰ－２および誘導体、例えばＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞に由来するものである。ヒト骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)；およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

【０３７１】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、抗原に対して向けられるモノクローナル抗体の産生のために検定される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により、またはin vitro結合検定、例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）により確定される。

【０３７２】

モノクローナル抗体の結合親和力は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:2

20 (1980)に記載されたスカッチャード解析により決定され得る。

【０３７３】

所望の特異性、親和性および／または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマが一旦特定されると、クローンは限界希釈手順によりサブクローニングされ、標準方法により増殖され得る（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。この目的のための適切な培地としては、例えばＤ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、例えば、マウス中への細胞の腹腔内注射により、動物中の腹水腫瘍としてin vivoで増殖され得る。

【０３７４】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、慣用的抗体精製手法、例えばアフィニティークロマトグラフィー（例えば、プロテインＡまたはプロテインＧ－セファロースを使用）、またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等により、培地、腹水または血清から適切に分離される。

【０３７５】

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、慣用的手法を用いて（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）、容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、ＤＮＡは発現ベクター中に入れられ、これは次に、別の状況では抗体タンパク質を産生しない宿主細胞、例えば大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または骨髄腫細胞中でトランスフェクトされて、組換え宿主細胞中でのモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードするＤＮＡの細菌中での組換え発現に関する検討文献としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)およびPluckthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)が挙げられる。

【０３７６】

さらなる実施形態では、モノクローナル抗体または抗体断片は、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技法を用いて生成される抗体ファージライブラリーから単離され得る。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを用いて、それぞれネズミおよびヒト抗体の単離を記載する。その後の出版物は、鎖シャッフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）ヒト抗体の産生（Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としての組合せ感染およびin vivo組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993))を記載する。したがって、これらの技法は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的モノクローナル抗体ハイブリドーマ技法に代わる実行可能な技法である。

【０３７７】

抗体をコードするＤＮＡは、例えば、相同ネズミ配列をヒト重鎖および軽鎖定常ドメイン（ＣＨおよびＣＬ）配列に置換することにより（米国特許第４，８１６，５６７号；およびMorrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）、あるいは免疫グロブリンコード配列を、非免疫グロブリンポリペプチド（非相同ポリペプチド）に関するコード配列の全部または一部と融合することにより、キメラまたは融合抗体ポリペプチドを産生するよう修飾され得る。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインにとって代わり得るし、あるいはそれらは抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置き換えられて、一抗原に対する特異性を有するある抗原結合部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

【０３７８】

３．　ヒトおよびヒト化抗体

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、さらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。ヒト化型の非ヒト（例えばネズミ）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含

有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２または抗体のその他の抗原結合配列）である。ヒト化抗体としては、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基が、所望の特異性、親和性および容量を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラットまたはウサギのＣＤＲからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にも、輸入ＣＤＲまたはフレームワーク配列中にも見出されない残基も含み得る。概して、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含み、ＣＤＲ領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体はさらにまた、最適には、免疫グロブリンの、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含む[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988)；およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【０３７９】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野で周知である。一般的には、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入される１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入」残基として言及され、これは、典型的には「輸入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、ウィンターと共同研究者の方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]に従って、齧歯類ＣＤＲまたはＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに置換することにより、実施され得る。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第４，８１６，５６７号）であって、この場合、実質的に無傷とは言えないヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列により置換されている。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのＣＤＲ残基およびおそらくはいくつかのＦＲ残基が齧歯類抗体中の類似部位からの残基により置換されるヒト抗体である。

【０３８０】

ヒト化抗体を作製するのに用いられるべき、軽鎖および重鎖の両方の、ヒト可変ドメインの選択は、抗体がヒト療法的使用を意図される場合、抗原性およびＨＡＭＡ応答（ヒト抗マウス抗体）を低減するために非常に重要である。ＨＡＭＡ応答の低減または排除は、適切な治療薬の臨床的開発の有意の一局面である（例えば、Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937；Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572；Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530；Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138；Miller et al., Blood (1983), 62:988；Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352；Reichmann et al., Nature (1988), 332:323；Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495参照）。本明細書中に記載されるように、本発明は、ＨＡＭＡ応答が低減されるかまたは排除されるよう、ヒト化される抗体を提供する。当該技術分野で既知の慣例的方法を用いて、これらの抗体の変異体がさらに得られるが、それらのいくつかはさらに以下に記載される。いわゆる「最良適合」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。齧歯類のものに最も近いヒトＶドメイン配列が特定され、その中のヒトフレームワーク領域（ＦＲ）はヒト化抗体に関して許容される（Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)；Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)）。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定の亜群の全てのヒト抗体の共通配列由来の特定フレームワーク領域を用いる。同一フレームワークは、いくつかの異なるヒト化抗体のために用いられ得る（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)）。

【０３８１】

例えば、本明細書中に記載されるような抗体からのアミノ酸配列は、フレームワークお

よび／または超可変配列（単数または複数）の多様化のための出発（親）配列として役立ち得る。出発超可変配列が連結される選択フレームワーク配列は、本明細書中では受容体ヒトフレームワークと称する。受容体ヒトフレームワークはヒト免疫グロブリン（そのＶＬおよび／またはＶＨ領域）からであるかまたはそれに由来し得るが、このようなフレームワークはヒト患者において最小の免疫原性を有するかまたはまったく有さないことが実証されているので、好ましくは受容体ヒトフレームワークは、ヒト定常フレームワーク配列からであるかまたはそれに由来する。

【０３８２】

受容体がヒト免疫グロブリンに由来する場合、ヒトフレームワーク配列のコレクション中にドナーフレームワーク配列と種々のヒトフレームワーク配列を一列に並べることにより、ドナーフレームワーク配列とのその相同性に基づいて選択されるヒトフレームワークを任意に選択し、受容体として最も相同のフレームワーク配列を選択し得る。

【０３８３】

一実施形態では、本明細書中のヒト定常フレームワークは、ＶＨ亜群ＩＩＩおよび／またはＶＬκ亜群Ｉコンセンサスフレームワーク配列からであるかまたはそれらに由来する。

【０３８４】

それがヒト免疫グロブリンからであれ、ヒト定常フレームワークからであれ、受容体は選択されるヒトフレームワーク配列と配列が同一であるが、受容体配列は、ヒト免疫グロブリン配列またはヒト定常フレームワーク配列に比して、先在するアミノ酸配列を含み得ることを本発明は意図する。これらの先在置換は、ヒト免疫グロブリン配列または定常フレームワーク配列に比して、好ましくは最小であり；通常は４、３、２または１つのアミノ酸の差のみである。

【０３８５】

非ヒト抗体の超可変領域残基は、ＶＬおよび／またはＶＨ受容体ヒトフレームワーク中に組み入れられる。例えば、カバトＣＤＲ残基、チョチア超可変ループ残基、Ａｂｍ残基および／または接触残基に対応する残基を組み入れ得る。任意に、以下のような拡大超可変領域残基が組み入れられる：２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）、２６～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～６５、４７～６５または４９～６５（Ｈ２）および９３～１０２、９４～１０２または９５～１０２（Ｈ３）。

【０３８６】

超可変領域残基の「組み入れ」は本明細書中で考察されているが、これは種々の方法で達成され、例えば、そのフレームワーク残基が受容体ヒトフレームワーク残基に変えられるよう、マウス可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異化することにより、あるいは超可変ドメイン残基が非ヒト残基に変えられるよう、ヒト可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異化することにより、あるいは所望の配列をコードする核酸を合成すること等により、所望の核酸配列をコードする核酸が生成され得ることを理解されるべきである。

【０３８７】

本明細書中の例では、超可変領域移植変異体は、各超可変領域に関して別個のオリゴヌクレオチドを用いて、ヒト受容体配列をコードする核酸のクンケル突然変異誘発により生成された（Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)）。適正な超可変領域－抗原相互作用を補正し、再確立するために、慣例的技法を用いて、適切な変化がフレームワークおよび／または超可変領域内に導入され得る。

【０３８８】

ファージ（ミド）表示（いくつかの状況ではファージ表示としても、本明細書中で言及される）は、配列無作為化により生成されるライブラリー中の多数の異なる潜在的変異体抗体を生成し、スクリーニングするための便利な且つ迅速な方法として用いられ得る。しかしながら、変更抗体を作製し、スクリーニングするための他の方法は、当業者に利用可能である。

【０３８９】
ファージ（ミド）表示技法は、抗原のようなリガンドと結合する新規のタンパク質を生成し、選択するための強力なツールを提供している。ファージ（ミド）表示の技法の使用は、高親和力で標的分子と結合する配列に関して迅速に分類され得るタンパク質変異体の大型ライブラリーの生成を可能にする。変異体ポリペプチドをコードする核酸は、一般的に、ウイルス外殻タンパク質、例えば遺伝子ＩＩＩタンパク質または遺伝子ＶＩＩＩタンパク質をコードする核酸配列と融合される。タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸配列が遺伝子ＩＩＩタンパク質の一部をコードする核酸配列と融合される一価ファージミド表示系が、開発されている（Bass, S., Proteins, 8:309 (1990)；Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991)）。一価ファージミド表示系では、粒子の感染性が保持されるよう、遺伝子融合は低レベルで発現され、そして野生型遺伝子ＩＩＩタンパク質も発現される。ペプチドライブラリーを生成し、それらのライブラリーをスクリーニングする方法は、多数の特許で開示されている（例えば、米国特許第５，７２３，２８６号、米国特許第５，４３２，０１８号、米国特許第５，５８０，７１７号、米国特許第５，４２７，９０８号および米国特許第５，４９８，５３０号）。

【０３９０】
抗体または抗原結合ポリペプチドのライブラリーは、多数の方法で、例えば無作為ＤＮＡ配列を挿入することにより単一遺伝子を変更することにより、または関連遺伝子のファミリーをクローニングすることにより、調製されている。ファージ（ミド）表示を用いて抗体または抗原結合断片を表示するための方法は、米国特許第５，７５０，３７３号、第５，７３３，７４３号、第５，８３７，２４２号、第５，９６９，１０８号、第６，１７２，１９７号、第５，５８０，７１７号および第５，６５８，７２７号に記載されている。次いでライブラリーは、所望の特性を有する抗体または抗原結合タンパク質の発現に関してスクリーニングされる。

【０３９１】
鋳型核酸中の選り抜きの核酸の置換方法は当該技術分野で十分に確立されており、そのいくつかは、本明細書中に記載されている。例えば、超可変領域残基は、クンケル法を用いて置換され得る（例えば、Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)参照）。

【０３９２】
オリゴヌクレオチドの配列は、変更されるべき超可変領域残基に関して設計されたコドン組のうちの１つ以上を含む。コドン組は、ＩＵＢコードに従って以下に示されるような特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を意味するための記号を用いて表され得る。

ＩＵＢコード	
Ｇ	グアニン
Ａ	アデニン
Ｔ	チミン
Ｃ	シトシン
Ｒ	（ＡまたはＧ）
Ｙ	（ＣまたはＴ）
Ｍ	（ＡまたはＣ）
Ｋ	（ＧまたはＴ）
Ｓ	（ＣまたはＧ）
Ｗ	（ＡまたはＴ）
Ｈ	（ＡまたはＣまたはＴ）
Ｂ	（ＣまたはＧまたはＴ）
Ｖ	（ＡまたはＣまたはＧ）
Ｄ	（ＡまたはＧまたはＴ）Ｈ

Ｎ （ＡまたはＣまたはＧまたはＴ）

【０３９３】

例えば、コドン組ＤＶＫでは、ＤはヌクレオチドＡまたはＧまたはＴであり得る；ＶはＡまたはＧまたはＣであり得る；そしてＫはＧまたはＴであり得る。このコドン組は、１８の異なるコドンを示し得るし、アミノ酸Ａｌａ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｙｓ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、ＧｌｙおよびＣｙｓをコードし得る。

【０３９４】

オリゴヌクレオチドまたはプライマー組は、標準方法を用いて合成され得る。オリゴヌクレオチドの一組は、例えば、固相合成により合成され、コドン組により提供されるヌクレオチド三つ組の全ての考え得る組合せを表し、そしてアミノ酸の所望の群をコードする配列を含有する。ある位置に選択ヌクレオチド「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当該技術分野で周知である。あるコドン組を有するヌクレオチドのこのような組は、市販の核酸合成機（例えば、Applied Biosystems, Foster City, CAから入手可能）を用いて合成され得、あるいは購入することができる（例えば、Life Technologies, Rockville, MDから）。したがって、特定のコドン組を有して合成されるオリゴヌクレオチドの一組は、典型的には、その差が全体の配列内のコドン組により確立される異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、本発明にしたがって用いられる場合、可変ドメイン核酸鋳型とのハイブリダイゼーションを可能にし、クローニング目的のための制限酵素部位も含み得る配列を有する。

【０３９５】

一方法において、変異体アミノ酸をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチド媒介性突然変異誘発により作られ得る。この技法は、Zoller et al. Nucleic Acids Res. 10:6487-6504(1987)に記載されているように、当該技術分野で周知である。簡潔に述べると、変異体アミノ酸をコードする核酸配列は、所望のコドン組をコードするオリゴヌクレオチドをＤＮＡ鋳型とハイブリダイズすることにより作成され、ここで、鋳型は、可変領域拡散鋳型配列を含有するプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーション後、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、鋳型の完全第二相補鎖を合成し、したがって、これは、オリゴヌクレオチドプライマーを組み入れ、オリゴヌクレオチド組により提供されるようなコドン組を含有する。

【０３９６】

一般に、少なくとも２５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが用いられる。最適オリゴヌクレオチドは、突然変異（単数または複数）をコードするヌクレオチド（単数または複数）のいずれかの側の上の鋳型と完全に相補的である１２～１５ヌクレオチドを有する。これは、オリゴヌクレオチドが一本鎖ＤＮＡ鋳型分子と適性にハイブリダイズすることを保証する。オリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の技法、例えば、Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)に記載されたような技法を用いて容易に合成される。

【０３９７】

ＤＮＡ鋳型は、バクテリオファージＭ１３ベクター（市販のＭ１３ｍｐ１８およびＭ１３ｍｐ１９ベクターが適している）、またはViera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)により記載されるような一本鎖ファージ複製起点を含有するベクターであるベクターにより生成される。したがって、突然変異化されるべきであるＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するために、これらのベクターの１つに挿入され得る。一本鎖鋳型の産生は、Sambrook et al.（上記）の第４．２１～４．４１章に記載されている。

【０３９８】

ネイティブＤＮＡ配列を変更するために、オリゴヌクレオチドは、適切なハイブリダイゼーション条件下で一本鎖鋳型とハイブリダイズされる。ＤＮＡ重合酵素、通常はＴ７ＤＮＡポリメラーゼまたはＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片が次に付加されて、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いて、鋳型の相補鎖を合成する。したがって、ＤＮＡの１つの鎖が突然変異型の遺伝子１をコードし、他方の鎖（元の鋳型）が

遺伝子１のネイティブ非変更配列をコードするよう、ヘテロ二重鎖分子が形成される。このヘテロ二重鎖分子は、次に、適切な宿主細胞、通常は原核生物、例えば大腸菌ＪＭ１０１で形質転換される。細胞の増殖後、それらはアガロースプレート上に載せられて、３２－ホスフェートで放射能標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングされて、突然変異化ＤＮＡを含有する細菌コロニーを特定する。

【０３９９】

直前に記載された方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異（単数または複数）を含有するホモ二重鎖分子が生成されるよう修飾され得る。修飾を、以下に示す：一本鎖オリゴヌクレオチドが上記のように一本鎖鋳型とアニーリングされる。３つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン（ｄＡＴＰ）、デオキシリボグアノシン（ｄＧＴＰ）およびデオキシリボチミジン（ｄＴＴ）の混合物が、ｄＣＴＰ－（ａＳ）（Amershamから入手可能）と呼ばれる修飾化チオデオキシリボシトシンと併合される。この混合物は、鋳型－オリゴヌクレオチド複合体に付加される。この混合物へのＤＮＡポリメラーゼの付加時に、突然変異化塩基以外は鋳型と同一であるＤＮＡの鎖が生成される。さらに、ＤＮＡのこの新規の鎖はｄＣＴＰの代わりにｄＣＴＰ－（ａＳ）を含入し、これは、制限エンドヌクレアーゼ消化からそれを保護するのに役立つ。二本鎖ヘテロ二重鎖の鋳型鎖が適切な制限酵素で切れ目を入れられた後、鋳型鎖は、突然変異化されるべき部位（単数または複数）を含有する領域の先を、ＥｘｏＩＩＩヌクレアーゼまたは別の適切なヌクレアーゼで消化され得る。次いで、反応が停止されて、一部分だけ一本鎖である分子が後に残る。次に、４つのデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート、ＡＴＰおよびＤＮＡリガーゼの全ての存在下で、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、完全二本鎖ＤＮＡホモ二重鎖が形成される。このホモ二重鎖分子は次に、適切な宿主細胞中で形質転換され得る。

【０４００】

前記のように、オリゴヌクレオチド組の配列は、鋳型核酸とハイブリダイズするのに十分な長さを有し、そして制限部位も含有する（しかし、必ずというわけではない）。ＤＮＡ鋳型は、バクテリオファージＭ１３ベクター、またはViera et al. Meth. Enzymol., 153:3 (1987)により記載されたような一本鎖ファージ複製起点を含有するベクターに由来するベクターにより生成され得る。したがって、突然変異化されるＤＮＡは、一本鎖鋳型を生成するために、これらのベクターの１つに挿入されなければならない。一本鎖鋳型の産生は、Sambrook et al.（上記）の第４．２１～４．４１章に記載されている。

【０４０１】

別の方法によれば、抗原結合は、修復された超可変領域の選択を介して抗体のヒト化中に回復され得る（出願番号１１／０６１，８４１（２００５年２月１８日出願）参照）。当該方法は、受容体フレームワーク上に非ヒト超可変領域を組み入れること、さらに、受容体フレームワーク配列を修飾せずに１つ以上の超可変領域に１つ以上のアミノ酸置換を導入することを包含する。代替的には、１つ以上のアミノ酸置換の導入は、受容体フレームワーク配列中の修飾により成し遂げられ得る。

【０４０２】

別の方法によれば、オリゴヌクレオチドの配列内に提供されるコドン組により確立される異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを各組が有する上流および下流オリゴヌクレオチド組を提供することにより、ライブラリーが生成され得る。上流および下流オリゴヌクレオチド組は、可変ドメイン鋳型核酸配列とともに、ポリメラーゼ連鎖反応に用いられて、ＰＣＲ産物の「ライブラリー」を生成する。ＰＣＲ産物は、それらが確立された分子生物学技法を用いて、他の関連または非関連核酸配列、例えばウイルス外殻タンパク質および二量体化ドメインと融合され得るので、「核酸カセット」として言及され得る。

【０４０３】

ＰＣＲプライマーの配列は、超可変領域中の溶媒露出および高多様性位置に冠する所望のコドン組のうちの１つ以上を包含する。上記のように、コドン組は、所望の変異体アミノ酸をコードするために用いられることなるヌクレオチド三つ組配列の一組である。

【０４０４】

なスクリーニング／選択ステップを介して選択される、所望の判定基準を満たす抗体選択体は、標準組換え技法を用いて単離され、クローン化され得る。

【０４０５】

さらに、抗原に対する高結合親和性およびその他の好ましい生物学的特性の保持を伴って抗体がヒト化されることが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列および種々の概念的ヒト化産物の分析のプロセスにより、ヒト化抗体が調製される。三次元免疫グロブリンモデルは市販されており、当業者に熟知されている。選択候補免疫グロブリン配列の見込みがある三次元立体配座構造を例証し、表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考え得る役割の分析、すなわち、その抗原と結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、所望の抗体特質、例えば標的抗原（単数または複数）に対する親和性増大が達成されるよう、レシピエントおよび輸入配列からＦＲ残基が選択され、組合され得る。概して、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼすことにおいて、直接的に且つ最も実質的に関与する。

【０４０６】

種々の型のヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体が意図される。例えば、ヒト化抗体は、免疫接合体を生成するために、１つ以上の細胞傷害剤（単数または複数）と任意に接合される抗体断片、例えばＦａｂであり得る。代替的には、ヒト化抗体は、無傷抗体、例えば無傷ＩｇＧ１抗体であり得る。

【０４０７】

ヒト化に代わるものとして、ヒト抗体が生成され得る。例えば今度は、免疫化時に、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、全レパートリーのヒト抗体を産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生の完全抑制を生じる、ということが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウス中へのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原投与時にヒト抗体の産生を引き起こす（例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)；米国特許第５，５４５，８０６号、第５，５６９，８２５号、第５，５９１，６６９号(全てGenPharm)；第５，５４５，８０７；およびＷＯ　９７／１７８５２参照）。

【０４０８】

代替的には、ファージ表示技法（McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]）を用いて、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーから、in vitroでヒト抗体および抗体断片を産生し得る。この技法によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子は、糸状バクテリオファージの大または小外殻タンパク質遺伝子、例えばＭ１３またはｆｄ中にイン・フレームでクローン化され、ファージ粒子の表面に機能性抗体断片として表示される。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するため、抗体の機能性に基づいた選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をももたらす。したがって、ファージは、Ｂ細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージ表示は、種々の形態で実施され得る（例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)で再検討されている）。Ｖ－遺伝子セグメントのいくつかの供給源が、ファージ表示のために用いられ得る。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓由来のＶ遺伝子の小型無作為組合せライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。非免疫化ヒトドナーからのＶ遺伝子のレパートリーが構築され、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体が、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)またはGriffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)により記載された技法に本質的に従って、単離され得る。米国特許第５，５６５，３３２号および第５，５７３，９０５号も参照されたい。

【０４０９】
上記のように、ヒト抗体は、in vitro活性化Ｂ細胞によっても生成され得る（米国特許第５，５６７，６１０号および第５，２２９，２７５号参照）。
【０４１０】
４．　抗体断片
ある状況では、全抗体というよりむしろ、抗体断片を用いることに利点がある。サイズの小さい断片は迅速なクリアランスを可能にし、固形腫瘍への接近改良をもたらし得る。
【０４１１】
抗体断片の産生のために、種々の技法が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解的消化により得られた（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)参照）。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞により直接産生され得る。Ｆａｂ、ＦｖおよびＳｃＦｖ抗体断片は、全て、大腸菌中で発現され、それから分泌されることができ、したがって、大量のこれらの断片の手軽な産生を可能にする。抗体断片は、上記の抗体ファージライブラリーから単離され得る。代替的には、Ｆａｂ’－ＳＨ断片は大腸菌から直接回収され、化学的にカップリングされて、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を形成し得る（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。別のアプローチによれば、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、組換え宿主細胞培養から直接単離され得る。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含むin vivo半減期増大を示すＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$断片は、米国特許第５，８６９，０４６号に記載されている。抗体断片の産生のための他の技法は、当業者には明らかとなろう。他の実施形態では、えりすぐりの抗体は、一本鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である（ＷＯ　９３／１６１８５；米国特許第５，５７１，８９４号；および米国特許第５，５８７，４５８号参照）。ＦｖおよびｓＦｖは、定常領域を欠く無傷結合部位を有する唯一の種である；したがって、それらは、ｖｉｖｏ使用中の非特異的結合低減に適している。ｓＦｖ融合タンパク質は、ｓＦｖのアミノまたはカルボキシ末端でのエフェクタータンパク質の融合を生じるよう構築され得る（Antibody Engineering, ed. Borrebaeck（上記）参照）。抗体断片は、例えば米国特許第５，６４１，８７０号に記載されているように、「線状抗体」でもあり得る。このような線状抗体断片は、一重特異性または二重特異性であり得る。
【０４１２】
５．　二重特異性抗体
二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例となる二重特異性抗体は、本明細書中に記載されるようなＦｃＲＨ５タンパク質の２つの異なるエピトープと結合し得る。他のこのような抗体は、別のタンパク質に対する結合部位を有するＦｃＲＨ５結合部位を併有し得る。代替的には、抗ＦｃＲＨ５アームは、ＦｃＲＨ５発現細胞に細胞性防御機序を集中し、限局するために、Ｔ細胞受容体分子（例えば、ＣＤ３）、あるいはＩｇＧに対するＦｃ受容体（ＦｃγＲ）、例えばＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）のような白血球上のトリガー分子と結合するアームと組合され得る。二重特異性抗体は、ＦｃＲＨ５を発現する細胞に細胞傷害剤を限局するためにも用いられ得る。これらの抗体は、ＦｃＲＨ５結合アーム、ならびに細胞傷害剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン－α、ビンカアルカロイド、シリンＡ鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン）に結合するアームを有する。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えばＦ（ａｂ‘）$_2$二重特異性抗体）として調製することができる。
【０４１３】
ＷＯ　９６／１６６７３は二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩＩＩ抗体を記載し、米国特許第５，８３７，２３４号は二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩ抗体を開示する。二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗Ｆｃα抗体は、ＷＯ９８／０２４６３に示されている。米国特許第５，８２１，３３７号および第６，４０７，２１３号は、二重特異性抗ＥｒｂＢ２／抗ＣＤ３抗体を教示する。ＣＤ３抗原上のエピトープおよび第二エピトープと結合

する付加的二重特異性抗体が記載されている。例えば、米国特許第５，０７８，９９８号（抗－ＣＤ３／腫瘍細胞抗原）；第５，６０１，８１９号（抗－ＣＤ３／ＩＬ－２Ｒ；抗－ＣＤ３／ＣＤ２８；抗－ＣＤ３／ＣＤ４５）；第６，１２９，９１４号（抗－ＣＤ３／悪性疾患Ｂ細胞抗原）；第７，１１２，３２４号（抗－ＣＤ３／ＣＤ１９）；第６，７２３，５３８号（抗－ＣＤ３／ＣＣＲ５）；第７，２３５，６４１号（抗－ＣＤ３／ＥｐＣＡＭ）；第７，２６２，２７６号（抗－ＣＤ３／卵巣腫瘍抗原）；および第５，７３１，１６８号（抗－ＣＤ３／ＣＤ４ＩｇＧ）を参照されたい。

【０４１４】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該技術分野で既知である。全長二重特異性抗体の伝統的産生は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づいており、ここで、２つの鎖は異なる特異性を有する（Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)）。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為組合せのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は１０の異なる抗体分子の潜在的混合物を産生し、そのうち、１つだけが正しい二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィー段階により実行される正しい分子の精製は、かなり厄介であり、その生成収率は低い。類似の手順は、ＷＯ　９３／０８８２９に、そしてTraunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【０４１５】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。好ましくは、融合は、ヒンジ、C_H2およびC_H3領域の少なくとも一部を含むＩｇ重鎖定常ドメインを伴う。融合の少なくとも１つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する第一重鎖定常領域（C_H1）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合を、そして所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡが、別個の発現ベクター中に挿入され、適切な宿主に同時トランスフェクトされる。これは、構築に用いられる不等比の３つのポリペプチド鎖が所望の二重特異性抗体の最適産生を提供する場合の実施形態において３つのポリペプチド断片の相互割合を調整するに際して、より大きな柔軟性を提供する。しかしながら、等しい比率での少なくとも２つのポリペプチド鎖の発現が高収率を生じる場合、あるいは所望の鎖の組合せの収率に比率が有意の影響を及ぼさない場合、単一発現ベクター中に３つのポリペプチド鎖のうちの２つまたは全てに関するコード配列を挿入することが可能である。

【０４１６】

このアプローチの好ましい一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームに第一結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、ならびに他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対（第二結合特異性を提供する）からなる。二重特異性分子の半分だけに免疫グロブリン軽鎖が存在することが分離の容易な方法を提供するので、この不斉構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促す、ということが判明した。このアプローチは、ＷＯ　９４／０４６９０に開示されている。二重特異性抗体の生成についてのさらなる詳細に関しては、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)を参照されたい。

【０４１７】

米国特許第５，７３１，１６８号に記載された別のアプローチによれば、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にするよう操作され得る。好ましい界面は、C_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの１つ以上の小アミノ酸側鎖が、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えられる。大型アミノ酸側鎖をより小さいもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置き換えることにより、大きい側鎖（単数または複数）と同一または類似のサイズの代償性「空洞」が第二抗体分子の界面上に作られる。これは、ホモ二量体のような他の望ましくない最終産物に対してヘテロ二量体の産生を増大するための機序を提供する。このアプローチに従って産生される二重特異性抗体は、本明細書中では「空洞への隆起」抗体として言及される。

【０４１８】
二重特異性抗体には、架橋または「ヘテロ接合体」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ接合体での抗体の一方はアビジンと、他方はビオチンと結合され得る。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に向けることが（米国特許第４，６７６，９８０号）、ならびにＨＩＶ感染の治療のために（ＷＯ　９１／００３６０、ＷＯ　９２／２００３７３およびＥＰ　０３０８９）、提案されている。ヘテロ接合体は、任意の便利な架橋法を用いて作製され得る。適切な架橋剤は当該技術分野で周知であり、多数の架橋技法とともに米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０４１９】
抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技法も、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製され得る。Brennan et al., Science 229:81 (1985)は、無傷抗体がタンパク質分解的に切断されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を生成する手法を記載する。これらの断片は、ジチオール錯化剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止する。生成されたＦａｂ’断片は次に、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に転化される。次いで、Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体のうちの１つは、メルカプトエチルアミンを用いた還元によりＦａｂ’－チオールに再転化され、等モル量の他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定のための作用物質として用いられ得る。

【０４２０】
近年の進歩は、二重特異性抗体を形成するために化学的に結合され得る大腸菌からのＦａｂ’－ＳＨ断片の直接的回収を助長した。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)は、完全ヒト化二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の生成を記載している。各Ｆａｂ’断片は、大腸菌から別々に分泌され、in vitroで指向性化学結合を施されて、二重特異性抗体を形成した。このようにして形成された二重特異性抗体は、ＥｒｂＢ２受容体を過剰発現する細胞および正常ヒトＴ細胞と結合し、ならびにヒト乳癌標的に対してヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【０４２１】
組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し、単離するための種々の技法も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生されている（Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーは、遺伝子融合により、２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結された。抗体ホモ二量体はヒンジ領域で還元されて単量体を形成し、次いで、再酸化されて、抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生のためにも利用され得る。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)により記載された「ダイアボディ」技法は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的機序を提供している。断片は、同一鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーによりV_Lに連結されたV_Hを含む。したがって、一断片のV_HおよびV_Lドメインは別の断片の相補的V_LおよびV_Hと強いて対合され、それにより２つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も、報告されている（Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)参照）。

【０４２２】
２より大きい結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る（Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)）。

【０４２３】
６．　ヘテロ接合体抗体
ヘテロ接合体抗体も、本発明の範囲内である。ヘテロ接合体抗体は、２つの共有結合抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に向けることが（米国特許第４，６７６，９８０号）、ならびにＨＩＶ感染の治療のために（ＷＯ　９１

／００３６０、ＷＯ　９２／２００３７３およびＥＰ　０３０８９）、提案されている。抗体は、架橋剤が関与するものも含めて、合成タンパク質化学における既知の方法を用いて、in vitroで調製され得る。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合を形成することにより、構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル－４－メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第４，６７６，９８０号に開示されたものが挙げられる。

【０４２４】

７．　多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体より速く内在化（および／または異化）され得る。本発明の抗体は、３つ以上の抗原結合部位（例えば、四価抗体）を有する多価抗体（ＩｇＭクラス以外）であり得、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に産生され得る。多価抗体は、二量体化ドメインおよび３つ以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Ｆｃ領域またはヒンジ領域を含む（またはそれらからなる）。このシナリオでは、抗体は、Ｆｃ領域、ならびにＦｃ領域に対してアミノ末端である３つ以上の抗原結合部位を含む。好ましい多価抗体は、本明細書中では、３～約８、しかし好ましくは４つの、抗原結合部位を含む（またはそれらからなる）。多価抗体は、少なくとも１つのポリペプチド鎖（好ましくは２つのポリペプチド鎖）を含み、ここで、ポリペプチド鎖（単数または複数）は、２つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－（Ｘ２）$_n$－Ｆｃを含み得、式中、ＶＤ１は第一可変ドメインであり、ＶＤ２は第二可変ドメインであり、ＦｃはＦｃ領域の一ポリペプチド鎖であり、Ｘ１およびＸ２はアミノ酸またはポリペプチドを表し、そしてｎは０または１である。例えば、ポリペプチド鎖（単数または複数）は、ＶＨ－ＣＨ１－可動性リンカー－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖；またはＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ領域鎖を含み得る。多価抗体は、本明細書中では、好ましくは、少なくとも２つ（好ましくは４つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含む。多価抗体は、本明細書中では、例えば、約２～約８つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書中で意図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意にＣＬドメインをさらに含む。

【０４２５】

８．　エフェクター機能操作

例えば、抗体の抗源依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）および／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾することが望ましい。これは、抗体のＦｃ領域に１つ以上のアミノ酸置換を導入することにより達成され得る。代替的には、または付加的に、システイン残基（単数または複数）をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にし得る。このようにして生成されるホモ二量体抗体は、内在化能力が改良され得、および／または補体媒介性細胞殺害および抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を増大し得る（Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)およびShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)参照）。抗腫瘍活性増強を示すホモ二量体抗体は、Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されるようなヘテロ二官能性架橋剤を用いても調製され得る。代替的には、抗体は操作され、これは、二元性Ｆｃ領域を有し、それにより、増強された補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有し得る（Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)参照）。抗体の血清半減期を増大するために、例えば、米国特許第５，７３９，２７７号に記載されたような抗体（特に抗体断片）中にサルベージ受容体結合エピトープを組み入れ得る。本明細書中で用いる場合、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、ＩｇＧ分子のin vivo血清半減期を増大するのに関与するＩｇＧ分子（例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$またはＩｇＧ$_4$）のＦｃ領域のエピトープを指す。

【０４２６】

９．　免疫接合体

本発明は、細胞傷害剤、例えば化学療法薬、増殖阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素、あるいはその断片）、あるいは放射性同位体（すなわち、放射性接合体）と接合された抗体を含む免疫接合体（「抗体－薬剤接合体」、または「ＡＤＣ」として互換的に言及される）にも関する。

【０４２７】

ある実施形態では、免疫接合体は、抗体および化学療法薬またはその他の毒素を含む。このような免疫接合体の生成に有用な化学療法薬は、上で説明されている。用いられ得る酵素的活性毒素およびその断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ鎖（緑膿菌から）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、α－サルシン、シナアブラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolaca americana）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ（momordica charantia）阻害剤、クルシン、クロチン、サポンソウ（sapaonaria officinalis）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンが挙げられる。種々の放射性核種が、放射性接合抗体の産生のために利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙおよび^{186}Ｒｅが挙げられる。抗体および細胞傷害剤の接合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート　ＨＣＬ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン２，６－ジイソシアネート）およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)に記載されたように調製され得る。炭素－１４－標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性核種と抗体との接合のためのキレート剤の一例である（ＷＯ９４／１１０２６参照）。

【０４２８】

抗体、ならびに１つ以上の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、アウリスタチンペプチド、例えばモノメチルアウリスタチン（ＭＭＡＥ）（ドラスタチンの合成類似体）、マイタンシノイド、例えばＤＭ１、トリコテセンおよびＣＣ１０６５、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体との接合体も、本明細書中で意図される。

例となる免疫接合体－抗体－薬剤接合体

【０４２９】

本発明の免疫接合体（または「抗体－薬剤接合体」（「ＡＤＣ」））は、以下の式Ｉを有し、ここで、抗体は、任意のリンカー（Ｌ）を介して１つ以上の薬剤部分（Ｄ）と接合（すなわち、共有的に結合）される。

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

【０４３０】

したがって、抗体は、直接的にまたはリンカーを介して、薬剤と接合され得る。式Ｉにおいて、ｐは抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、これは、例えば約１～約２０薬剤部分／抗体であり、ある実施形態では、１～約８薬剤部分／抗体である。本発明は、平均薬剤負荷／抗体が約２～約５、または約３～約４である式Ｉの抗体－薬剤化合物の混合物を含む組成物を包含する。

【０４３１】

ａ．　例となるリンカー

リンカーは、１つ以上のリンカー構成成分を含み得る。例となるリンカー構成成分としては、６－マレイミドカプロイル（「ＭＣ」）、マレイミドプロパノイル（「ＭＰ」）、

バリン－シトルリン（「ｖａｌ－ｃｉｔ」または「ｖｃ」）、アラニン－フェニルアラニン（「ａｌａ－ｐｈｅ」）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「ＰＡＢ」）およびリンカー試薬との接合に起因するもの：Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート形成リンカー部分　４－メルカプトペンタン酸（「ＳＰＰ」）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート形成リンカー部分　４－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）メチル）シクロヘキサンカルボン酸（「ＳＭＣＣ」、本明細書中では「ＭＣＣ]とも呼ばれる）、２，５－ジオキソピロリジン－１－イル４－（ピリジン－２－イルジスルファニル）ブタノエート形成リンカー部分　４－メルカプトブタン酸（「ＳＰＤＢ」）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（「ＳＩＡＢ」）、エチレンオキシ－CH_2CH_2Ｏ－（１つ以上の反復単位として）（「ＥＯ」または「ＰＥＯ」）が挙げられる。さらなるリンカー構成成分は当該技術分野で既知であり、いくつかは本明細書中に記載される。

【０４３２】

リンカーは、「開裂可能リンカー」であって、細胞中の薬剤の放出を助長し得る。例えば、酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン）、プロテアーゼ感受性（例えば、ペプチダーゼ感受性）リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー（Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)；米国特許第５，２０８，０２０号）が用いられ得る。

【０４３３】

ある実施形態では、リンカーは、以下の式ＩＩで示されるようなリンカーである：

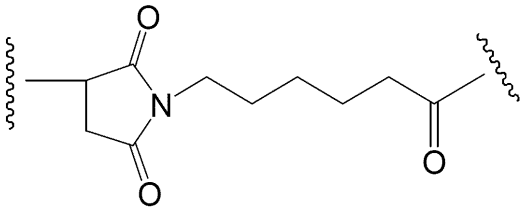
$$-A_a-W_w-Y_y-$$

II

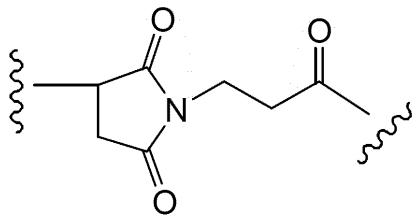
式中、Ａはストレッチャー単位であり、ａは０～１の整数であり；Ｗはアミノ酸単位であり、そしてｗは０～１２の整数であり；Ｙはスペーサー単位であり、ｙは０、１または２であり；Ａｂ、Ｄおよびｐは式Ｉに関して上で説明したのと同様に定義される。このようなリンカーの例となる実施形態は、ＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１に記載されており、この記載内容は、参照により本明細書中で援用される。

【０４３４】

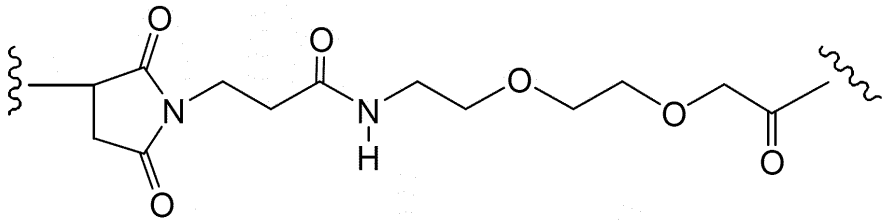
いくつかの実施形態では、リンカー構成成分は、抗体を別のリンカー構成成分に、あるいは薬剤部分に連結する「ストレッチャー単位」を含み得る。例となるストレッチャー単位は、以下に示され、ここで、波線は抗体との共有結合の部位を示す：



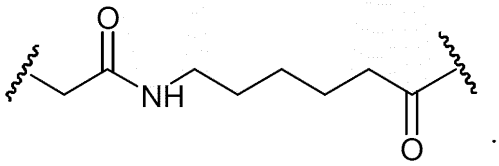
MC



MP



MPEG



【０４３５】

いくつかの実施形態では、リンカー構成成分はアミノ酸単位を含み得る。このような一実施形態では、アミノ酸単位はプロテアーゼによるリンカーの開裂を可能にし、それにより、細胞内プロテアーゼ、例えばリソソーム酵素への曝露時に免疫接合体からの薬剤の放出を助長する（例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784参照）。例となるアミノ酸単位としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドおよびペンタペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。例となるジペプチドとしては、以下のものが挙げられる：バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）；フェニルアラニン－リシン（ｆｋまたはｐｈｅ－ｌｙｓ）；あるいはＮ－メチル－バリン－シトルリン（Ｍｅ－ｖａｌ－ｃｉｔ）。例となるトリペプチドとしては、以下のものが挙げられる：グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）。アミノ酸単位は、天然で生じるアミノ酸残基、ならびに小アミノ酸および非天然アミノ酸類似体、例えばシトルリンを含み得る。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、ＣおよびＤ、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的開裂のために、設計され、それらの選択性を最適化され得る。

【０４３６】

いくつかの実施形態では、リンカー構成成分は、直接的に、またはストレッチャー単位および／またはアミノ酸単位により、抗体を薬剤部分に連結する「スペーサー」単位を含み得る。スペーサー単位は、「自壊的」または「非自壊的」であり得る。「非自壊的」スペーサー単位は、スペーサー単位の一部または全部が、ＡＤＣの酵素的（例えば、タンパク質分解的）開裂時に薬剤部分と結合されたままであるものである。非自壊的スペーサー単位の例としては、グリシンスペーサー単位およびグリシン－グリシンスペーサー単位が

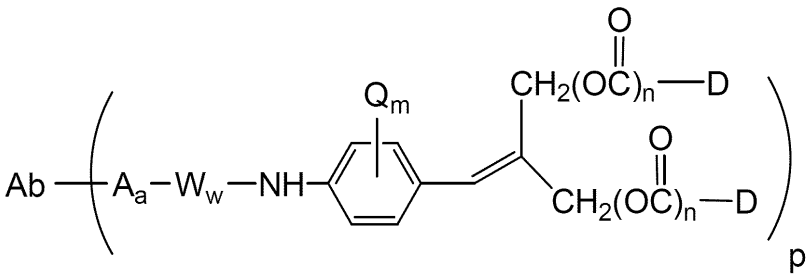
挙げられるが、これらに限定されない。配列特異的酵素的開裂を受け易いペプチドスペーサーの他の組合せも意図される。例えば、腫瘍細胞関連プロテアーゼによるグリシン－グリシンスペーサー単位を含有するＡＤＣの酵素的開裂は、残りのＡＤＣからのグリシン－グリシン－薬剤部分の放出を生じる。このような一実施形態では、グリシン－グリシン－薬剤部分は、次に、腫瘍細胞中で別個の加水分解ステップに付され、したがって、薬剤部分からグリシン－グリシンスペーサー単位を開裂する。

【０４３７】

「自壊的」スペーサー単位は、別個の加水分解ステップなしに、薬剤部分の放出を可能にする。ある実施形態では、リンカーのスペーサー単位は、ｐ－アミノベンジル単位を含む。このような一実施形態では、ｐ－アミノベンジルアルコールは、アミド結合によりアミノ酸単位と結合され、そしてカルバメート、メチルカルバメートまたはカルボネートがベンジルアルコールと細胞傷害剤との間に作られる（例えば、Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103参照）。一実施形態では、スペーサー単位はｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）である。ある実施形態では、ｐ－アミノベンジル単位のフェニレン部分はＱｍで置換され、ここで、Ｑは－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロまたは－ｃｙａｎｏであり；そしてｍは０～４の範囲の整数である。自壊的スペーサー単位の例としては、さらに、ｐ－アミノベンジルアルコールと電子的に類似する芳香族化合物（例えばＵＳ　２００５／０２５６０３０　Ａ１参照）、例えば２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体(Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)およびオルト－またはパラ－アミノベンジルアセタルが挙げられるが、これらに限定されない。置換および非置換４－アミノ酪酸アミド（Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223）；適切に置換されたビシクロ［２．２．１］およびビシクロ［２．２．２］環系（Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815）；および２－アミノフェニルプロピオン酸アミド（Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867）のような、アミド結合加水分解時に環化を受けるスペーサーが用いられ得る。グリシンのａ－位置で置換されるアミン含有薬剤の排除（Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447）も、ＡＤＣに有用な自壊的スペーサーの例である。

【０４３８】

一実施形態では、スペーサー単位は、下記のような分枝鎖ビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）単位であって、これは、複数の薬剤を組み入れ、放出するために用いられ得る。



酵素的開裂

２つの薬剤

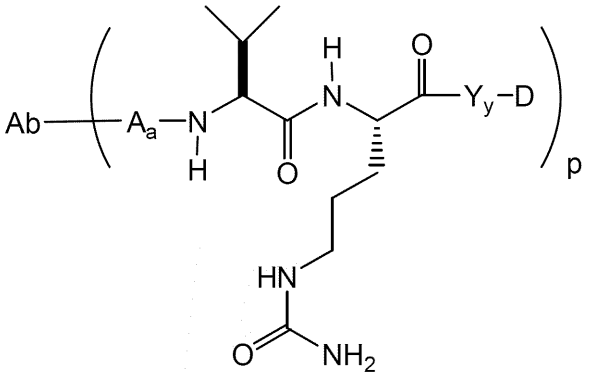
式中、Ｑは－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロまたは－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；ｎは０または１であり；そしてｐは１～約２０の範囲である。

【０４３９】

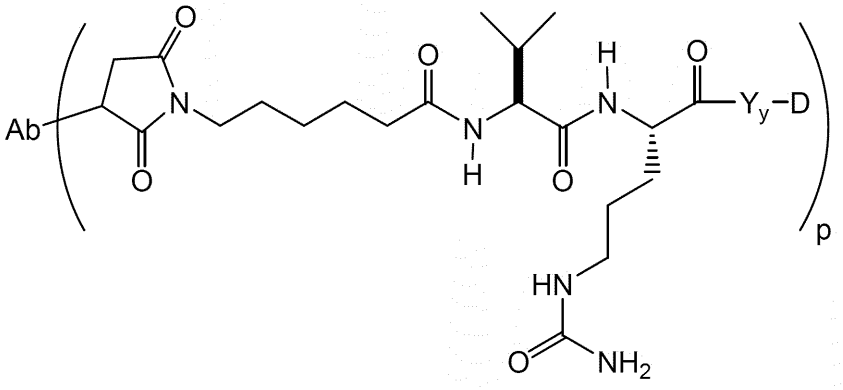
別の実施形態では、リンカーＬは、分枝鎖多機能性リンカー部分を介して１つより多い薬剤部分を抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る（Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768）。樹状リンカーは、薬剤対抗体のモル比、すなわち負荷を増大し、これは、ＡＤＣの効能と関連する。したがって、システイン操作された抗体が１つの反応性システインチオール基のみを保有する場合、複数の薬剤部分が樹状リンカーを介して結合され得る。

【０４４０】

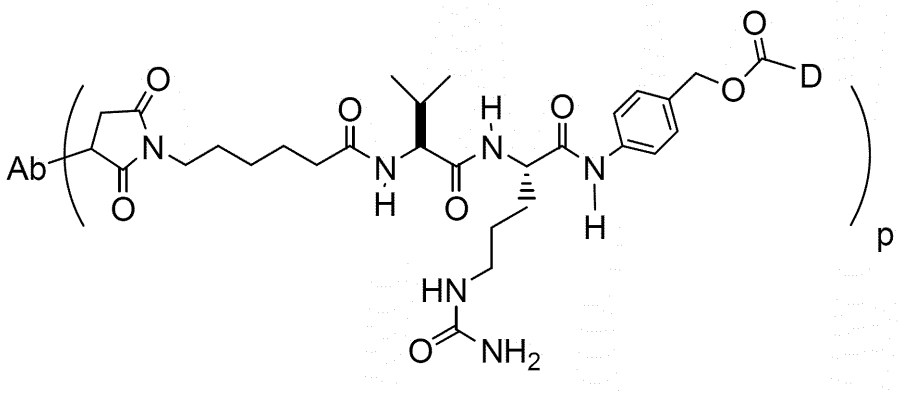
例となるリンカー構成成分およびその組合せは、式ＩＩのＡＤＣの状況で以下に示される：



Val-Citまたは VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

【０４４１】

リンカー構成成分、例えばストレッチャー、スペーサーおよびアミノ酸単位は、当該技術分野で知られている方法、例えばＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１に記載された

方法により、合成され得る。

【０４４２】

ｂ．　例となる薬剤部分

（１）マイタンシンおよびマイタンシノイド

いくつかの実施形態では、免疫接合体は、１つ以上のマイタンシノイド分子と接合される抗体を含む。マイタンシノイドは、チューブリン重合を抑制することにより作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカの低木であるマイテヌス・セラッタ（Maytenus serrata）から最初に単離された（米国特許第３８９６１１１号）。その後、ある微生物もマイタンシノイド、例えばマイタンシノールおよびＣ－３マイタンシノールエステルを産生する、ということが発見された（米国特許第４，１５１，０４２号）。合成マイタンシノール、ならびにその誘導体および類似体は、例えば米国特許第４，１３７，２３０号；第４，２４８，８７０号；第４，２５６，７４６号；第４，２６０，６０８号；第４，２６５，８１４号；第４，２９４，７５７号；第４，３０７，０１６号；第４，３０８，２６８号；第４，３０８，２６９号；第４，３０９，４２８号；第４，３１３，９４６号；第４，３１５，９２９号；第４，３１７，８２１号；第４，３２２，３４８号；第４，３３１，５９８号；第４，３６１，６５０号；第４，３６４，８６６号；第４，４２４，２１９号；第４，４５０，２５４号；第４，３６２，６６３号；および第４，３７１，５３３号に開示されている。

【０４４３】

マイタンシノイド薬剤部分は、（ｉ）発酵産物の発酵または化学的修飾または誘導体化により調製するために比較的に接触可能であり、（ｉｉ）ジスルフィドおよび非ジスルフィドリンカーを介して抗体と接合するのに適した官能基での誘導体化が容易であり、（ｉｉｉ）血漿中で安定であり、ならびに（ｉｖ）種々の腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体－薬剤接合体中の魅力的薬剤部分である。

【０４４４】

マイタンシノイド薬剤部分として用いるのに適したマイタンシン化合物は当該技術分野で周知であり、既知の方法に従って天然供給源から単離され得るし、あるいは遺伝子操作および発酵技法を用いて産生され得る（ＵＳ６７９０９５２；ＵＳ２００５／０１７０４７５；Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973）。マイタンシノールおよびマイタンシノール類似体も、既知の方法に従って合成的に調製され得る。

【０４４５】

例となるマイタンシノイド薬剤部分としては、修飾芳香族環を有するもの、例えば：Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４２５６７４６号）（アンサミトシンＰ２の水素化アルミニウムリチウム還元により調製）；Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－デメチル）±Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４３６１６５０号および第４３０７０１６号）（ストレプトミセスまたはアクチノミセスを用いた脱メチル化、またはＬＡＨを用いた脱塩素化により調製）；およびＣ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－デクロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（塩化アシルを用いたアシル化により調製）ならびに他の位置に修飾を有するものが挙げられる。

【０４４６】

例となるマイタンシノイド薬剤部分としては、修飾を有するもの、例えば：Ｃ－９－ＳＨ（米国特許第４４２４２１９号）（マイタンシノールとＨ$_2$ＳまたはＰ$_2$Ｓ$_5$との反応により調製）；Ｃ－１４－アルコキシメチル（デメトキシ／ＣＨ$_2$ＯＲ）（米国特許第４３３１５９８号）；Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（ＣＨ$_2$ＯＨまたはＣＨ$_2$ＯＡｃ）（米国特許第４４５０２５４号）（ノカルジア属から調製）；Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（米国特許第４３６４８６６号）（ストレプトミセスによるマイタンシノールの転化により調製）；Ｃ－１５－メトキシ（米国特許第４３１３９４６号および第４３１５９２９号）（トレウィア・ヌドロフローラ（Trewia nudlflora）から単離される）；Ｃ－１８－Ｎ－デメチル（米国特許第４３６２６６３号および第４３２２３４８号）（ストレプトミセスによるマイタンシノールの脱メチル化により調製）；

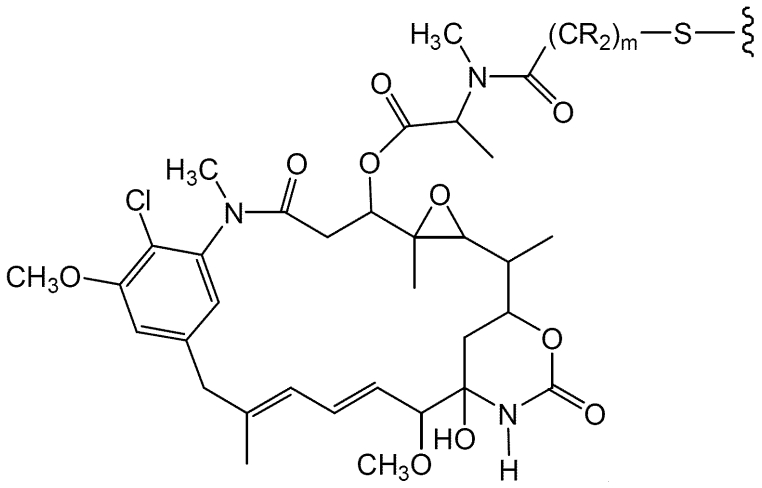
および４，５－デオキシ（米国特許第４３７１５３３号）（マイタンシノールの三塩化チタン／ＬＡＨ還元により調製）も挙げられる。

【０４４７】

マイタンシン化合物上の多数の位置は、連結の型に依存して、結合位置として有用であることが知られている。例えば、エステル結合を形成するためには、ヒドロキシル基を有するＣ－３位置、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ－１４位置、ヒドロキシル基で修飾されたＣ－１５位置、およびヒドロキシル基を有するＣ－２０位置は、全て適している（ＵＳ　５２０８０２０；ＵＳ　ＲＥ３９１５１；ＵＳ　６９１３７４８；ＵＳ　７３６８５６５；ＵＳ　２００６／０１６７２４５；ＵＳ　２００７／００３７９７２）。

【０４４８】

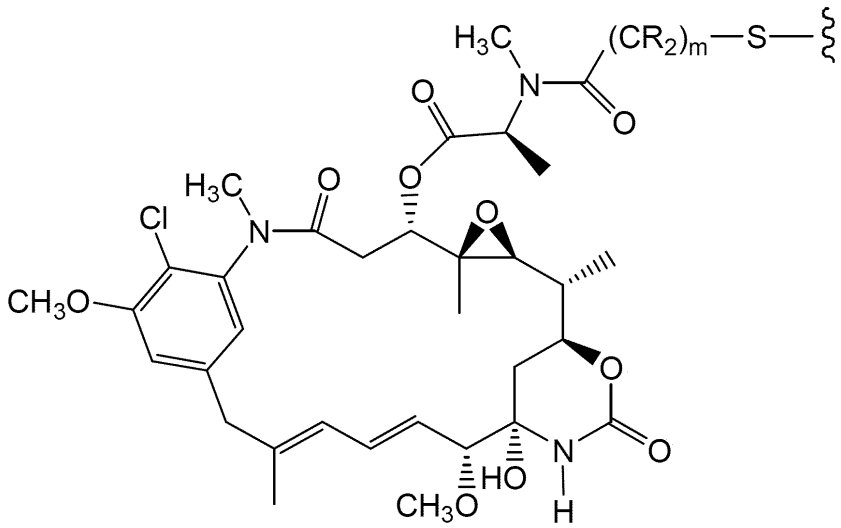
マイタンシノイド薬剤部分としては、以下の構造を有するものが挙げられる：



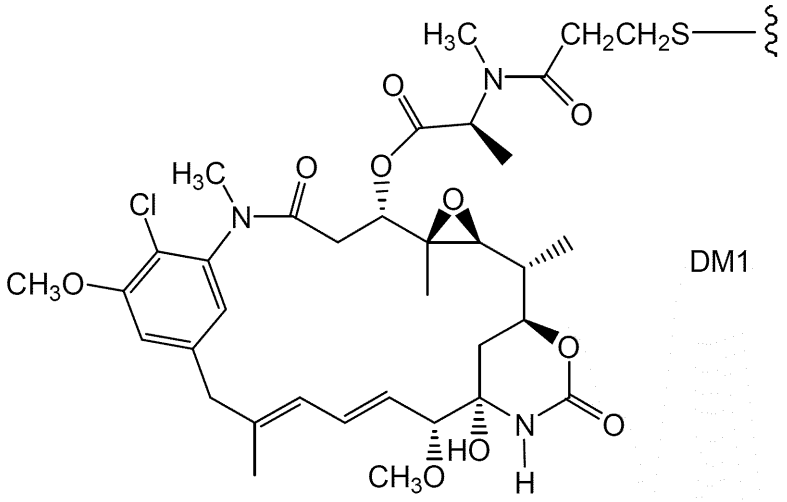
式中、波線はマイタンシノイド薬剤部分とＡＤＣのリンカーとの共有結合を示す。Ｒは、独立して、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルであり得る。アミド基をイオウ原子と結合するアルキレン鎖は、メチル、エチルまたはプロピルであり得、すなわち、ｍは１、２または３である（米国特許第６３３４１０号；米国特許第５２０８０２０号；米国特許第７２７６４９７号；Chari et al (1992) Cancer Res. 52:127-131；Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623)。

【０４４９】

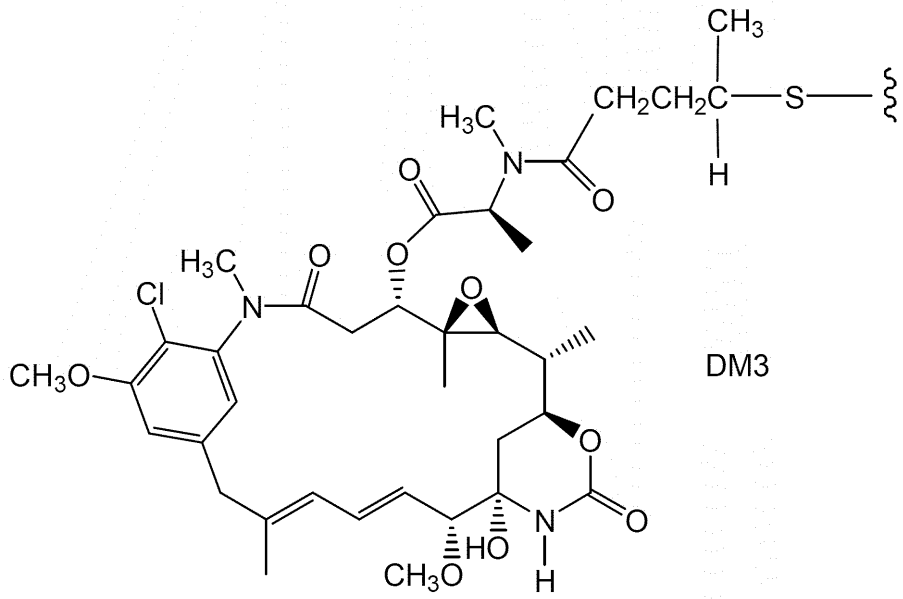
マイタンシノイド薬剤部分の全ての立体異性体、すなわち、Ｄのキラル炭素でのＲおよびＳ立体は位置の任意の組合せが、本発明の化合物に関して意図される。一実施形態では、マイタンシノイド薬剤部分は、以下の立体化学構造を有する：



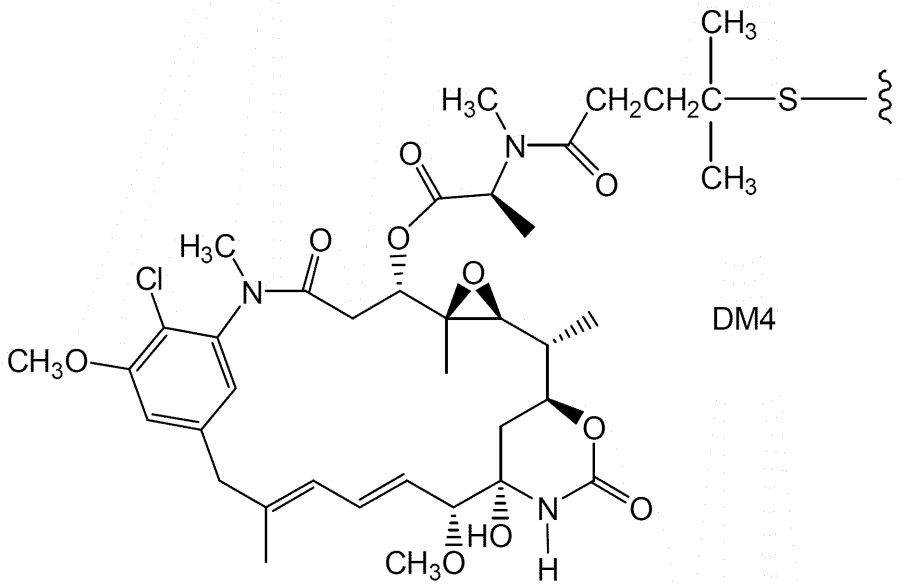
【０４５０】
マイタンシノイド薬剤部分の例となる実施形態としては、以下の構造を有するＤＭ１；ＤＭ３およびＤＭ４が挙げられる：



DM1



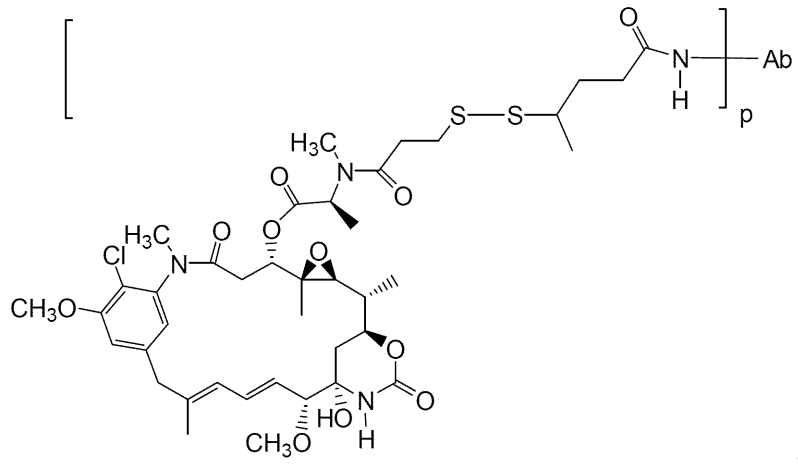
DM3



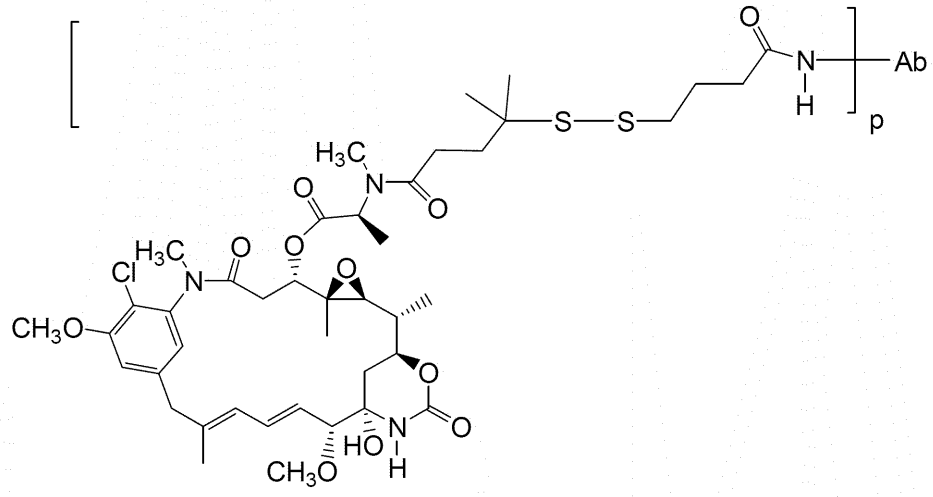
DM4

式中、波線は、抗体－薬剤接合体の薬剤のイオウ原子とリンカー（Ｌ）との共有結合を示す（ＷＯ　２００５／０３７９９２；ＵＳ　２００５／０２７６８１２　Ａ１）。

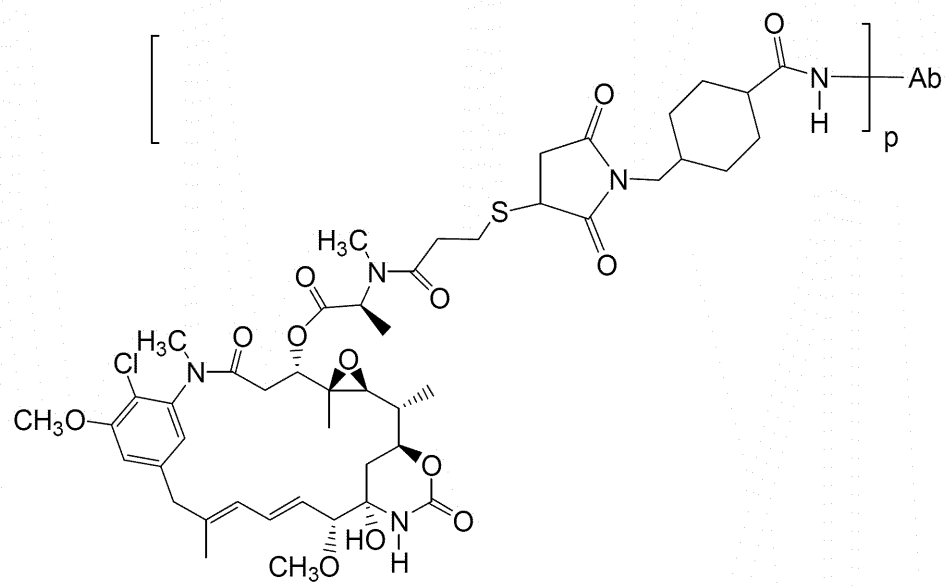
【０４５１】
他の例となるマイタンシノイド抗体－薬剤接合体は、以下の構造および略号を有し、式中、Ａｂは抗体であり、ｐは１～約８である：



Ab -SPP-DM1



Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

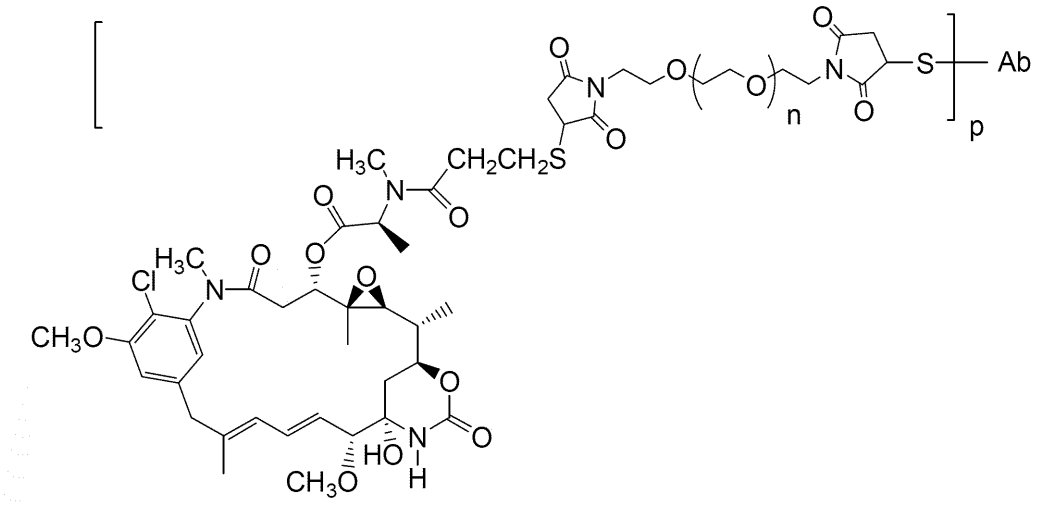
【０４５２】

一実施形態では、ＤＭ４がＳＰＤＢリンカーを介して抗体のチオール基に連結される抗

体－薬剤接合体が形成される（米国特許第６９１３７４８号および第７２７６４９７号参照、これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）。

【０４５３】

ＤＭ１がＢＭＰＥＯリンカーを介して抗体のチオール基に連結される例となる抗体－薬剤接合体は、以下の構造および略号を有する：



式中、Ａｂは抗体であり；ｎは０、１または２であり；そしてｐは１、２、３または４である。

【０４５４】

マイタンシノイドを含有する免疫接合体、その製造方法、およびそれらの治療的使用は、例えば、Erickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433；米国特許第５，２０８，０２０号、第５，４１６，０６４号、ＵＳ　２００５／０２７６８１２　Ａ１および欧州特許ＥＰ　０　４２５　２３５　Ｂ１に開示されており、これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される。

【０４５５】

抗体－マイタンシノイド接合体は、抗体またはマイタンシノイドの生物学的活性を有意に減少させることなく、マイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合することにより、抗体－マイタンシノイド接合体が調製される（例えば、米国特許第５，２０８，０２０号参照（この記載内容は参照により本明細書中で援用される））。マイタンシノイドは、既知の技法により合成され、あるいは天然供給源から単離され得る。適切なマイタンシノイド、例えばマイタンシノール、ならびにマイタンシノール分子の芳香族環中で、または他の位置で修飾されたマイタンシノール類似体、例えば種々のマイタンシノールエステルは、例えば米国特許第５，２０８，０２０号に、ならびに本明細書中の上記で言及された他の特許および非特許出版物に開示されている。

【０４５６】

抗体－マイタンシノイド接合体、例えば米国特許第５２０８０２０号または欧州特許第０　４２５　２３５　Ｂ１号；Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)；およびＵＳ　２００５／０１６９９３　Ａ１（これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）に開示されたものを製造するための、当該技術分野で既知の多数の連結基が存在する。リンカー構成成分ＳＭＣＣを含む抗体－マイタンシノイド接合体は、ＵＳ　２００５／０２７６８１２　Ａ１（“Antibody-drug conjugates and Methods.”）に開示されたように調製され得る。リンカーは、上記特許に開示されたようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基またはエステラーゼ不安定基を含む。さらなるリンカーは、本明細書中に記載され、例示されている。

【０４５７】

抗体とマイタンシノールの接合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、ス

クシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート　ＨＣｌ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン２，６－ジイソシアネート）およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製され得る。ある実施形態では、カップリング剤は、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）（Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)）またはＮ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルジチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）であって、ジスルフィド結合を提供する。

【０４５８】

リンカーは、連結の型によって、種々の位置でマイタンシノイド分子と結合され得る。例えば、エステル結合は、慣用的カップリング技法を用いて、ヒドロキシル基との反応により形成され得る。反応は、ヒドロキシル基を有するＣ－３位置、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ－１４位置、ヒドロキシル基で修飾されたＣ－１５位置、およびヒドロキシル基を有するＣ－２０位置で起こり得る。一実施形態では、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類似体のＣ－３位置に形成される。

【０４５９】

（２）アウリスタチンおよびドラスタチン

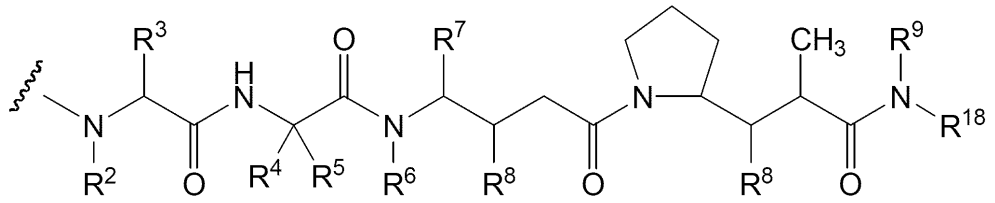
いくつかの実施形態では、免疫接合体は、ドラスタチンまたはドラスタチンペプチド類似体または誘導体、例えばある理スタチンと接合された抗体を含む（米国特許第５６３５４８３号；第５７８０５８８号）。ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管動力学、ＧＴＰ加水分解、ならびに核および細胞分裂を妨げ（Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584）、抗癌（米国特許第５６６３１４９号）および抗真菌活性（Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965）を有することが示されている。ドラスタチンまたはアウリスタチン薬剤部分は、ペプチド薬剤部分のＮ（アミノ）末端またはＣ（カルボキシル）末端を介して抗体と結合され得る（ＷＯ　０２／０８８１７２）。

【０４６０】

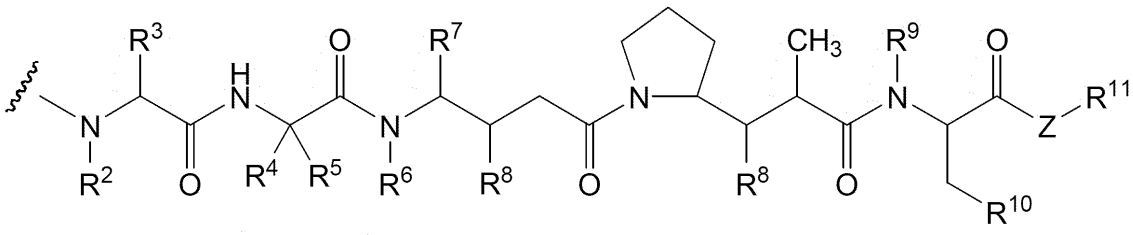
例となるアウリスタチン実施形態としては、Ｎ末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分ＤＥおよびＤＦが挙げられる（ＵＳ　２００５／０２３８６４９、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004に開示）（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）。

【０４６１】

ペプチド薬剤部分は、以下の式D_EおよびD_Fから選択され得る：



D_E



D_F

式中、D_EおよびD_Fの波線は、抗体または抗体－リンカー構成成分との、各位置で独立した、共有結合を示し；

R^2は、HおよびC_1～C_8ａｌｋｙｌから選択され；

R^3は、H、C_1～C_8アルキル、アルキル、C_3～C_8炭素環、アリール、C_1～C_8アルキル－アリール、C_1～C_8アルキル－（C_3～C_8炭素環）、C_3～C_8複素環およびC_1～C_8アルキル－（C_3～C_8複素環）から選択され；

R^4は、H、C_1～C_8アルキル、C_3～C_8炭素環、アリール、C_1～C_8アルキル－アリール、C_1～C_8アルキル－（C_3～C_8炭素環）、C_3～C_8複素環およびC_1～C_8アルキル－（C_3～C_8複素環）から選択され；

R^5は、Hおよびメチルから選択され；

あるいは、R^4およびR^5は、一緒になって炭素環式環を形成し、そして式－（CR^aR^b）$_n$－（ここで、R^aおよびR^bは、独立して、H、C_1～C_8アルキルおよびC_3～C_8炭素環から選択され、ｎは２、３、４、５および６から選択される）を有し；

R^6は、HおよびC_1～C_8アルキルから選択され；

R^7は、H、C_1～C_8アルキル、C_3～C_8炭素環、アリール、C_1～C_8アルキル－アリール、C_1～C_8アルキル－（C_3～C_8炭素環）、C_3～C_8複素環およびC_1～C_8アルキル－（C_3～C_8複素環）から選択され；

R^8は、各々独立して、H、ＯH、C_1～C_8アルキル、C_3～C_8炭素環およびＯ－（C_1～C_8アルキル）から選択され；

R^9は、HおよびC_1～C_8アルキルから選択され；

R^{10}は、アリールまたはC_3～C_8複素環から選択され；

Ｚは、Ｏ、Ｓ、ＮＨまたはＮR^{12}（ここで、R^{12}はC_1～C_8アルキルである）であり；

R^{11}は、H、C_1～C_{20}アルキル、アリール、C_3～C_8複素環、－（$R^{13}O$）$_m$－R^{14}または－（$R^{13}O$）$_m$－ＣＨ（R^{15}）$_2$から選択され；

ｍは、１～１０００の範囲の整数であり；

R^{13}は、C_2～C_8アルキルであり；

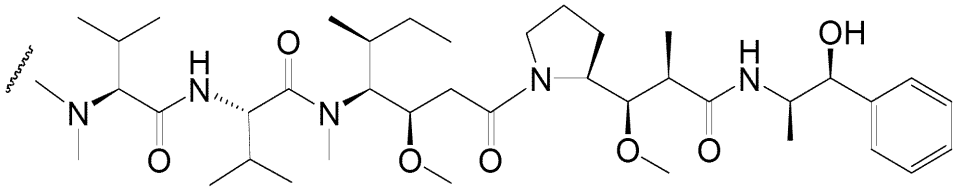
R^{14}は、HまたはC_1～C_8アルキルであり；

R^{15}の各出現は、独立して、H、ＣＯＯＨ、-（CH_2）$_n$－Ｎ（R^{16}）$_2$、-（CH_2）$_n$－ＳＯ$_3$Hまたは-（CH_2）$_n$－ＳＯ$_3$－C_1～C_8アルキルであり；

R^{16}の各出現は、独立して、H、C_1～C_8アルキルまたは－（CH_2）$_n$－ＣＯＯＨであり；

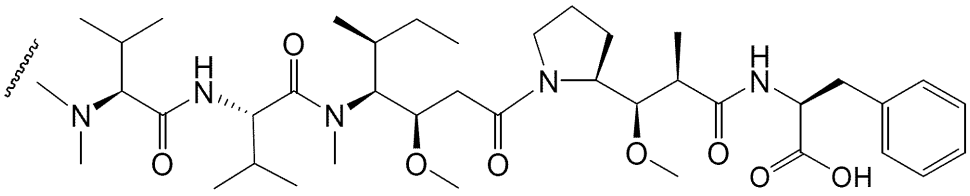
R^{18}は、-Ｃ（R^8）$_2$-Ｃ（R^8）$_2$-ａｒｙｌ、-Ｃ（R^8）$_2$-Ｃ（R^8）$_2$-（Ｃ$_3$－Ｃ$_8$複素環）および-Ｃ（R^8）$_2$-Ｃ（R^8）$_2$-（C_3～C_8炭素環）から

選択され；
nは、０～６の範囲の整数である。
【０４６２】
一実施形態では、R^3、R^4およびR^7は、独立して、イソプロピルまたはｓｅｃ－ブチルであり、R^5は－Ｈまたはメチルである。例となる一実施形態では、R^3およびR^4は、各々、イソプロピルであり、R^5は－Ｈであり、R^7はｓｅｃ－ブチルである。
【０４６３】
さらに別の実施形態では、R^2およびR^6は、各々、メチルであり、R^9は－Ｈである。
【０４６４】
さらに別の実施形態では、R^8の各出現は$-OCH_3$ある。
【０４６５】
例となる一実施形態では、R^3およびR^4は、各々、イソプロピルであり、R^2およびR^6は、各々、メチルであり、R^5は－Ｈであり、R^7はｓｅｃ－ブチルであり、R^8の各存在は$-OCH_3$であり、そしてR^9は－Ｈである。
【０４６６】
一実施形態では、Ｚは－Ｏ－または－ＮＨ－である。
【０４６７】
一実施形態では、R^{10}はアリールである。
【０４６８】
例となる一実施形態では、R^{10}は－フェニルである。
【０４６９】
例となる一実施形態では、Ｚが－Ｏ－である場合、R^{11}は－Ｈ、メチルまたはｔ－ブチルである。
【０４７０】
一実施形態では、Ｚが－ＮＨである場合、R^{11}は$-CH(R^{15})_2$であり、ここで、R^{15}は$-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$であり、R^{16}は$-C_1$～C_8アルキルまたは$-(CH_2)_n-COOH$である。
【０４７１】
別の実施形態では、Ｚが－ＮＨである場合、R^{11}は$-CH(R^{15})_2$であり、ここで、R^{15}は$-(CH_2)_n-SO_3H$である。
【０４７２】
式D_Eの例となるアウリスタチン実施形態は、ＭＭＡＥであるり式中、波線は、抗体－薬剤接合体のリンカー（Ｌ）との共有結合を示す：



MMAE

【０４７３】
式D_Fの例となるアウリスタチン実施形態は、ＭＭＡＦであり、式中、波線は、抗体－薬剤接合体のリンカー（Ｌ）との共有結合を示す（ＵＳ２００５／０２３８６４９およびDoronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124参照）：



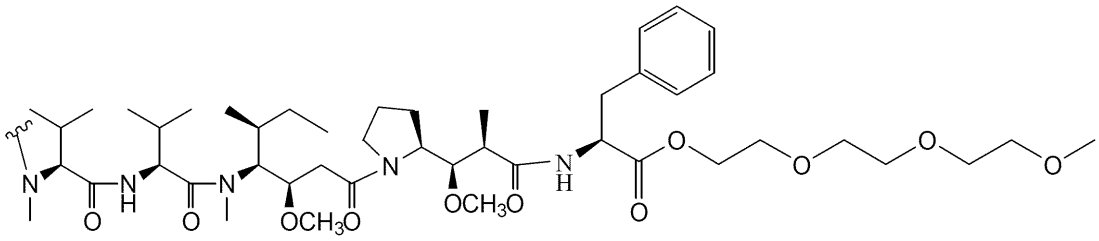
MMAF

【０４７４】

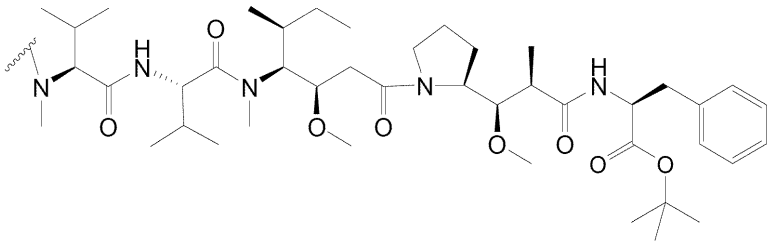
他の例となる実施形態としては、ペンタペプチドアウリスタチン薬剤部分のＣ末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物（ＷＯ　２００７／００８８４８）、およびペンタペプチドアウリスタチン薬剤部分のＣ末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルバリン化合物（ＷＯ　２００７／００８６０３）が挙げられる。

【０４７５】

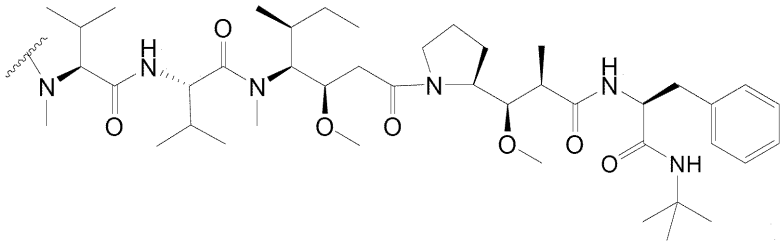
他の薬剤部分としては、以下のＭＭＡＦ誘導体が挙げられ、式中、波線は、抗体－薬剤接合体のリンカー（Ｌ）への共有結合を示す：



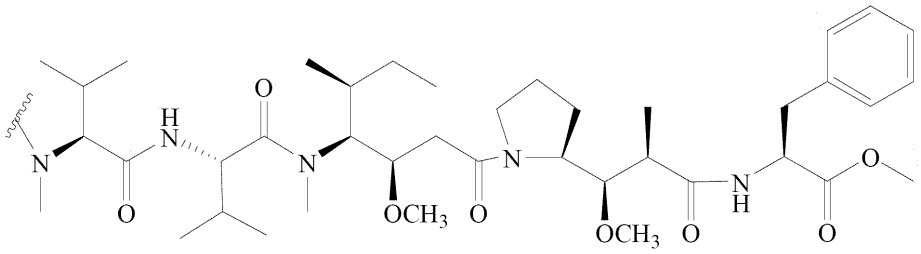
，



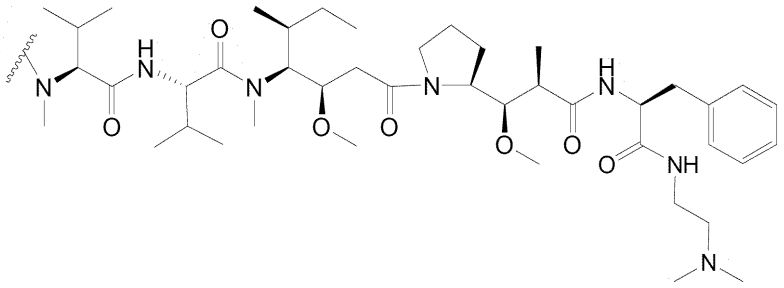
,



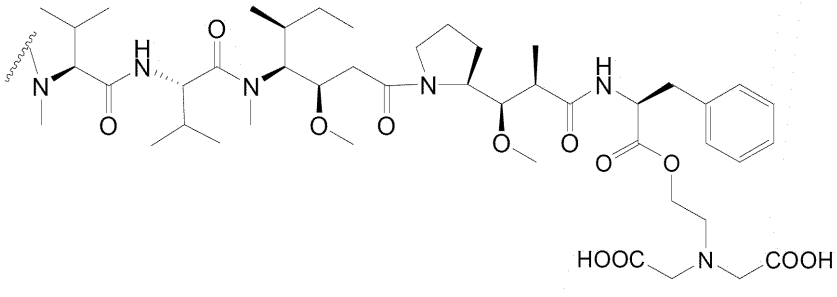
,



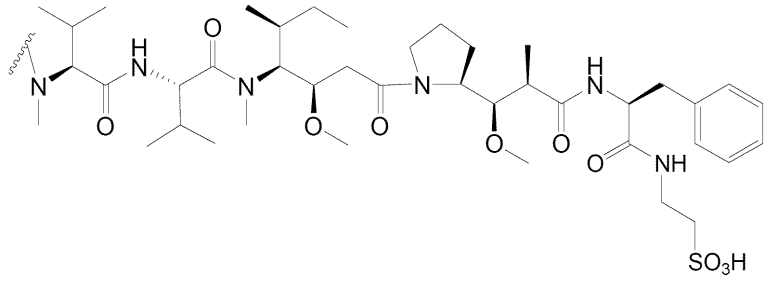
,



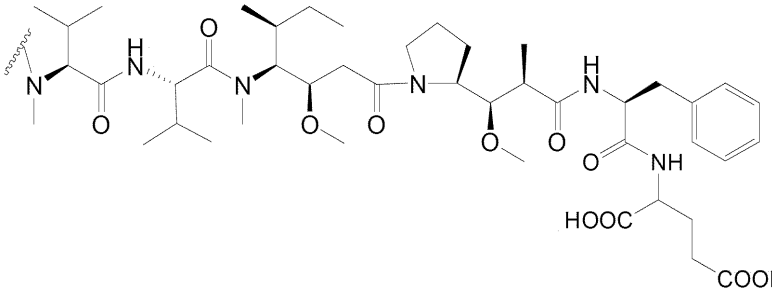
,



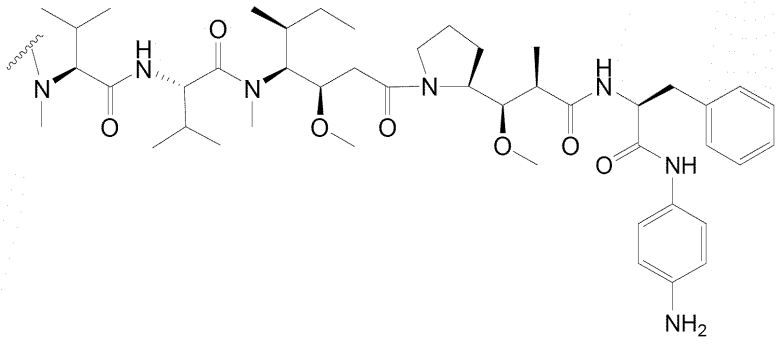
,



、



、および

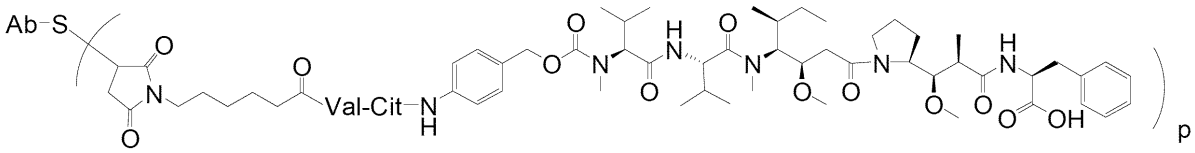


【０４７６】

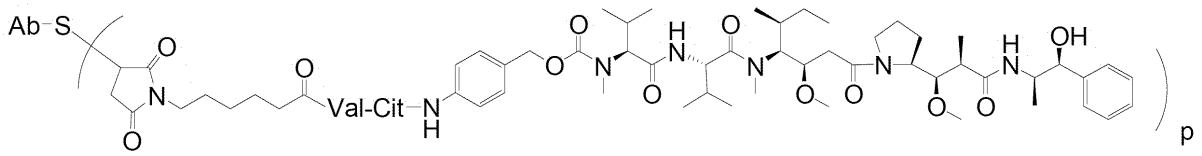
一態様では、上記のようなトリエチレングリコールエステル（ＴＥＧ）を含むが、それらに限定されない親水性基は、Ｒ１１で薬剤部分と結合され得る。任意の特定の理論に縛られることなく、親水性基は、薬剤部分のインターナライゼーションおよび非凝集を支援する。

【０４７７】

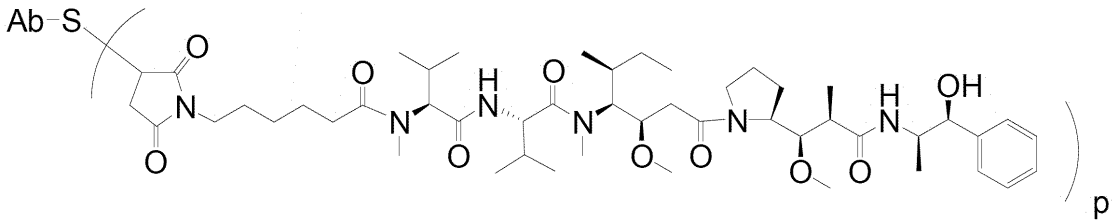
アウリスタチン／ドラスタチンまたはその誘導体を含む式ＩのＡＤＣの例となる実施形態は、ＵＳ　２００５－０２３８６４９およびDoronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されており、これらの記載内容は参照により本明細書中に明示的に援用される。ＭＭＡＥまたはＭＭＡＦおよび種々のリンカー構成成分を含む式ＩのＡＤＣの例となる実施形態は、以下の構造および略号を有し、そこで「Ａｂ」は抗体であり；ｐは１～約８で有り、「Ｖａｌ－Ｃｉｔ」または「ｖｃ」はバリン－シトルリン・ジペプチドであり；そして「Ｓ」はイオウ原子である。本明細書中のイオウ連結ＡＤＣのある構造説明において、抗体は、イオウ連結特徴を示し、そして特定のイオウ原子が多重リンカー－薬剤部分を保有するということを示さないために単に「Ａｂ－Ｓ」として表される、ということに留意する。以下の構造の左括弧はさらにまた、ＡｂおよびＳ間のイオウ原子の左に置かれ得、これは、本明細書全体を通して記載される本発明のＡＤＣについても同じ説明である。



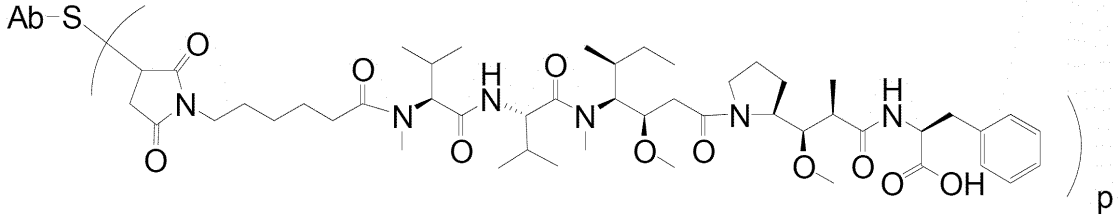
Ａｂ-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＦ



Ａｂ-ＭＣ-ｖｃ-ＰＡＢ-ＭＭＡＥ



Ａｂ-ＭＣ-ＭＭＡＥ



Ａｂ-ＭＣ-ＭＭＡＦ

【０４７８】

ＭＭＡＦおよび種々のリンカー構成成分を含む式ＩのＡＤＣの例となる実施形態としては、さらに、Ａｂ－ＭＣ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦおよびＡｂ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦが挙げられる。興味深いことに、タンパク質分解的に開裂可能でないリンカーにより抗体と結合されるＭＭＡＦを含む免疫接合体は、タンパク質分解的に開裂可能なリンカーにより抗体に結合されたＭＭＡＦを含む免疫接合体に匹敵する活性を保有することが示されている（Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124参照）。このような場合、薬剤放出は、細胞中での抗体分解により実行されると考えられる（同上）。

【０４７９】

典型的には、ペプチドベースの薬剤部分は、２つ以上のアミノ酸および／またはペプチド断片間にペプチド結合を形成することにより調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成法（E. Schroder and K. Lubke, “The Peptides”, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press参照）によって調製され得る。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分は、以下の方法に従って調製され得る：ＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１；米国特許第５６３５４８３号；米国特許第５７８０５８８号；Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 7

19-725；Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；およびDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。

【０４８０】

特に、式D_Fのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばＭＭＡＦおよびその誘導体は、ＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１およびDoronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載された方法を用いて調製され得る。式D_Eのアウリスタチン／ドラスタチン薬剤部分、例えばＭＭＡＥおよびその誘導体は、Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載された方法を用いて調製され得る。薬剤－リンカー部分ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦおよびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥは、例えばDoronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784および特許出願公開番号ＵＳ２００５／０２３８６４９Ａ１に記載されたような慣例的方法により好都合に合成され、次いで、当該抗体と接合され得る。

【０４８１】

（３）カリケアマイシン

他の実施形態では、免疫接合体は、１つ以上のカリケアマイシン分子に接合された抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗体は、ピコモル未満の濃度で二本鎖ＤＮＡ切断を生じ得る。カリケアマイシンファミリーの接合体の調製に関しては、米国特許第５，７１２，３７４号、第５，７１４，５８６号、第５，７３９，１１６号、第５，７６７，２８５号、第５，７７０，７０１号、第５，７７０，７１０号、第５，７７３，００１号、第５，８７７，２９６号(全て、American Cyanamid Company)を参照されたい。用いられ得るカリケアマイシンの構造類似体としては、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、Ｎ－アセチル－γ_1^I、ＰＳＡＧおよびθ^I_1が挙げられるが、これらに限定されない(Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)およびAmerican Cyanamidに対する上記の米国特許)が挙げられるが、これらに限定されない。抗体が接合される別の抗腫瘍薬はＱＦＡであって、これは抗葉酸剤である。カリケアマイシンおよびＱＦＡはともに、作用の細胞内部位を有し、原形質膜と容易に交差しない。したがって、抗体媒介性内在化を介したこれらの作用物質の細胞取込みは、それらの細胞傷害作用を大いに増強する。

【０４８２】

ｃ．　他の細胞傷害性物質

抗体と接合され得るその他の抗腫瘍薬としては、ＢＣＮＵ、ストレプトゾシン、ビンクリスチンおよび５－フルオロウラシル、米国特許第５，０５３，３９４号、第５，７７０，７１０号に記載されたＬＬ－Ｅ３３２８８複合体として集合的に知られている作用物質のファミリー、ならびにエスペラミシン（米国特許第５，８７７，２９６号）が挙げられる。

【０４８３】

用いられ得る酵素的に活性名毒素およびその断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ鎖（緑膿菌から）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、α－サルシン、シナアブラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolaca americana）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ（momordica charantia）阻害剤、クルシン、クロチン、サポンソウ（sapaonaria officinalis）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンが挙げられる（例えばＷＯ　９３／２１２３２（１９９３年１０月２８日公開））。

【０４８４】

本発明はさらに、抗体と、核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼまたはＤＮＡエンドヌクレアーゼ、例えばでオキシリボヌクレアーゼ；ＤＮアーゼ）との間に形成される免疫接合体を意図する。

【０４８５】

ある実施形態では、免疫接合体は、高放射性原子を含み得る。放射性接合抗体の産生の

ために、種々の放射性同位体が利用可能である。例としては、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}およびＬｕの放射性同位体が挙げられる。免疫接合体が検出のために用いられる場合、それは、シンチグラフィー試験のための放射性原子、例えばtc^{99m}またはI^{123}、あるいは核磁気共鳴（ＮＭＲ）画像処理（磁気共鳴画像処理　ｍｒｉとしても知られている）のためのスピン標識、例えばヨウ素－１２３、ヨウ素－１３１、インジウム－１１１、フッ素－１９、炭素－１３、窒素－１５、酸素－１７、ガドリニウム、マンガンまたは鉄を含み得る。

【０４８６】

放射性またはその他の標識は、既知の方法で免疫接合体中に組み入れられ得る。例えば、ペプチドは、生合成され得るし、あるいは適切なアミノ酸前駆体（例えば水素の代わりにフッ素－１９を含む）を用いた化学的アミノ酸合成により合成され得る。標識、例えばtc^{99m}またはI^{123}、Re^{186}、Re^{188}およびIn^{111}は、ペプチド中のシステイン残基を介して結合され得る。イットリウム－９０は、リシン残基を介して結合され得る。ＩＯＤＯＧＥＮ法(Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)は、ヨウ素－１２３を組み入れるために用いられ得る。「「免疫シンチグラフィーにおけるモノクローナル抗体（“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”）」(Chatal, CRC Press 1989)は、他の方法を詳細に記載する。

【０４８７】

ある実施形態では、免疫接合体は、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法薬、ＷＯ　８１／０１１４５参照）を活性薬剤、例えば抗癌薬に転化するプロドラッグ活性化酵素と接合される抗体を含み得る。このような免疫接合体は、抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法（「ＡＤＥＰＴ」）に有用である。抗体と接合され得る酵素としては、アルカリ性ホスファターゼ（これは、ホスフェート含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；アリールスルファターゼ（スルフェート含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；シトシンデアミナーゼ（非毒性５－フルオロシトシンを抗癌薬、５フルオロウラシルに転化するために有用である）；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（例えば、カテプシンＢおよびＬ）（ペプチド含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；Ｄ－アラニルカルボキシペプチダーゼ（Ｄ－アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを転化するために有用である）；炭水化物開裂酵素、例えばβ－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ（グリコシル化プロドラッグを遊離プロドラッグに転化するために有用である）；β－ラクタマーゼ（β－ラクタムで誘導体化される薬剤を遊離薬剤に転化するために有用である）；ならびにペニシリンアミダーゼ、例えばペニシリンＶアミダーゼおよびペニシリンＧアミダーゼ（それぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基によりそれらのアミン窒素で誘導体化される薬剤を遊離薬剤に転化するために有用である）が挙げられるが、これらに限定されない。酵素は、当該技術分野で周知の組換えＤＮＡ技法により抗体と共有結合され得る（例えば、Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)参照）。

【０４８８】

ｄ．　薬剤負荷

薬剤負荷は、式Ｉの分子中の抗体当たりの薬剤部分の平均数ｐにより表わされる。薬剤負荷は、１～２０薬剤部分（Ｄ）／抗体の範囲であり得る。式ＩのＡＤＣは、１～２０の一連の薬剤部分で接合される抗体のコレクションを包含する。接合反応からのＡＤＣの調製における薬剤部分の平均数／抗体は、慣用的手段、例えば質量分光分析、ＥＬＩＳＡ検定およびＨＰＬＣにより特徴づけられ得る。ｐについてのＡＤＣの定量的分布も確定される。いくつかの場合、他の薬剤負荷を伴うＡＤＣからの、ｐがある値である同種ＡＤＣの分離、精製および特徴づけは、逆相ＨＰＬＣまたは電気泳動のような手段により達成され得る。したがって、式Ｉ抗体－薬剤接合体の薬学的処方物は、このような接合体と、１、２、３、４またはそれ以上の薬剤部分と連結された抗体との異種混合物であり得る。

【０４８９】
いくつかの抗体－薬剤接合体に関しては、ｐは、抗体上の結合部位の数により限定され得る。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例となる実施形態における場合のように、抗体は、それを介してリンカーが結合され得る１つだけまたは数個のシステインチオール基を有し得るか、あるいは１つだけまたは数個の十分に反応性のチオール基を有し得る。ある実施形態では、薬剤負荷が高いほど、例えば、ｐ＞５であると、ある抗体－薬剤接合体の凝集、不溶性、毒性または細胞透過性損失を引き起こし得る。ある実施形態では、本発明のＡＤＣに関する薬剤負荷は、１～約８；約２～約６；または約３～約５の範囲である。実際、あるＡＤＣに関して、薬剤部分／抗体の最適比率は８未満であり、約２～約５であり得る、ということが示されている（ＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１参照）。

【０４９０】
ある実施形態では、接合反応中、理論的最大値より少ない薬剤部分が抗体と接合される。抗体は、以下で考察されるように、例えば、薬剤－リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリシン残基を含有し得る。一般的に、抗体は、薬剤部分と連結され得る多数の遊離および反応性システインチオール基を含有しない；実際、抗体中のほとんどのシステインチオール残基がジスルフィド架橋として存在する。ある実施形態では、抗体は、部分的または全体的還元条件下で、還元剤、例えばジチオトレイトール（ＤＴＴ）またはトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）で還元されて、反応性システインチオール基を生成し得る。ある実施形態では、抗体は変性条件に付されて、反応性求核性基、例えばリシンまたはシステインを現す。

【０４９１】
ＡＤＣの負荷（薬剤／抗体比）は、異なる方法で、例えば（ｉ）抗体に比してモル過剰量の薬剤－リンカー中間体またはリンカー試薬を限定し、（ｉｉ）接合反応時間または温度を限定し、ならびに（ｉｉｉ）システインチオール修飾のための還元条件を部分的にするかまたは限定することにより制御され得る。

【０４９２】
１つより多い求核性基が薬剤－リンカー中間体またはリンカー試薬と反応し、その後、薬剤部分試薬と反応する場合、その結果生じる生成物はＡＤＣ化合物の混合物であり、抗体と結合された１つ以上の薬剤部分の分布を示す、と理解されるべきである。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体に特異的であり且つ薬剤に特異的であるＥＬＩＳＡ抗体検定により混合物から算定され得る。個々のＡＤＣ分子は、質量分光分析により混合物中で特定され、ＨＰＬＣ、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分離され得る（例えば、McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307；Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070；Hamblett, K.J., et al. “Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate,” Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004；Alley, S.C., et al. “Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates,” Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004参照）。ある実施形態では、単一負荷値を有する同種ＡＤＣは、電気泳動またはクロマトグラフィーにより、接合混合物から単離され得る。

【０４９３】
ｅ．　免疫接合体を調製するためのある方法
式ＩのＡＤＣは、当業者に既知の有機化学反応、条件および試薬を用いるいくつかの経路により調製され得る：（１）抗体の求核性基を二価リンカー試薬と反応させて共有結合を介してＡｂ－Ｌを形成し、その後、薬剤部分と反応させる；ならびに（２）薬剤部分の求核性基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介してＤ－Ｌを形成し、その後、抗体の求核性基と反応させる。後者の経路により式ＩのＡＤＣを調製するための方法の例

は、ＵＳ　２００５－０２３８６４９　Ａ１（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載されている。

【０４９４】

抗体上の求核性基としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：（ｉ）Ｎ末端アミン基、（ｉｉ）側鎖アミン基、例えばリシン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えばシステイン、ならびに（ｉｖ）糖ヒドロキシルまたはアミノ基（この場合、抗体はグリコシル化される）。アミン、チオールおよびヒドロキシル基は、共有結合を形成するためにリンカー部分およびリンカー試薬の上の求電子性基、例えば：（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基と反応し得る。ある抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体が完全にまたは部分的に還元されるよう、抗体は、還元剤、例えばＤＴＴ（ジチオトレイトール）またはトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）で処理することにより、リンカー試薬との接合のために反応性にされ得る。したがって各システイン架橋は、理論的には２つの反応性チオール求核性基を形成する。リシン残基の修飾を介して、例えばリシン残基を２－イミノチオラン（トラウト試薬）と反応させて、チオールへのアミンの転化を生じることにより、追加の求核性基が抗体中に導入され得る。反応性チオール基は、１、２、３、４またはそれ以上のシステイン残基を導入することにより（例えば、１つ以上の非ネイティブシステインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製することにより）、抗体中に導入され得る。

【０４９５】

本発明の抗体－薬剤接合体は、抗体上の求電子性基、例えばアルデヒドまたはケトンカルボニル基と、リンカー試薬または薬剤上の求核性基との反応によっても生成され得る。リンカー試薬上の有用な求核性基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体は、リンカー試薬または薬剤上の求核性置換基と反応し得る求電子性部分を導入するよう修飾される。別の実施形態では、グリコシル化抗体の糖は、例えばペルオキシデート酸化試薬で酸化されて、アルデヒドまたはケトン基を形成し、これが、リンカー試薬または薬剤部分のアミン基と反応し得る。その結果生じるイミン・シッフ塩基基は、安定結合を形成し得、あるいは、例えば水素化ホウ素試薬により還元されて、安定アミン結合を形成し得る。一実施形態では、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼまたはナトリウムメタペリオデートとの反応は、抗体中にカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を生じ、これが薬剤上の適切な基と反応し得る（Hermanson, Bioconjugate Techniques）。別の実施形態では、Ｎ末端セリンまたはトレオニン残基を含有する抗体は、ナトリウムメタペリオデートと反応して、第一アミノ酸の代わりにアルデヒドを産生する（Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；米国特許第５３６２８５２号）。このようなアルデヒドは、薬剤部分またはリンカー求核性基と反応され得る。

【０４９６】

薬剤部分上の求核性基としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジド基。これらは、共有結合を形成するためにリンカー部分およびリンカー試薬の上の求電子性基、例えば：（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基と反応し得る。

【０４９７】

本発明の化合物は、特に、以下の架橋試薬を用いて調製されるＡＤＣを明示的に意図するが、これらに限定されない：ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、

スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣおよびスルホ－ＳＭＰＢ、ならびにＳＶＳＢ（スクシンイミジル－（４－ビニルスルホン）ベンゾエート）（市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから；Applications Handbook and Catalog; 467-498, 2003-2004参照)）。

【０４９８】

抗体および細胞傷害性物質を含む免疫接合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート　ＨＣｌ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン２，６－ジイソシアネート）およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いても作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されるように調製され得る。炭素－１４標識化１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性核種と抗体との接合のための例となるキレート剤である（ＷＯ９４／１１０２６参照）。

【０４９９】

代替的には、抗体および細胞傷害性物質を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技法またはペプチド合成により作製され得る。組換えＤＮＡ分子は、互いに隣接するかまたは接合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により分離される接合体の抗体および細胞傷害性部分をコードする領域を含み得る。

【０５００】

さらに別の実施形態では、抗体は、腫瘍前標的化に利用するために「受容体」（例えばストレプトアビジン）と接合され、ここでは、抗体－受容体接合体は患者に投与され、その後、清澄剤を用いて循環から非結合接合体が除去され、次いで、細胞傷害性物質（例えば放射性核種）と接合される「リガンド」（例えばアビジン）が投与される。

例となる免疫接合体　－　チオ－抗体薬剤接合体

【０５０１】

ａ．システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の調製

本発明のシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体および親抗ＦｃＲＨ５抗体のアミノ酸配列変異体をコードするＤＮＡは、種々の方法、例えば、ポリペプチドをコードする早期調製ＤＮＡの、天然供給源からの単離（天然アミノ酸配列変異体の場合）、部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介性）突然変異誘発による調製（Carter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443；Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59；Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488；Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260）、ＰＣＲ突然変異誘発（Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press；Ito et al (1991) Gene 102:67-70；Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132；およびVallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733）、ならびにカセット突然変異誘発（Wells et al (1985) Gene 34:315-323）（これらに限定されない）により調製される。突然変異誘発プロトコール、キットおよび試薬は、市販されている（例えば、クイックチェンジ（QuikChange）（登録商標）多部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene, La Jolla, CA)）。単一の突然変異は、ＰＣＲベースの突然変異誘発により鋳型として二本鎖プラスミドＤＮＡを用いるオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によっても生成される（Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition；Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500；Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500）。組換え抗体の変

異体は、制限断片操作により、または合成オリゴヌクレオチドを用いた重複伸長ＰＣＲによっても構築され得る。突然変異誘発性プライマーは、システインコドン置換（単数または複数）をコードする。標準突然変異誘発技法は、このような突然変異体システイン操作された抗体をコードするＤＮＡを生成するために用いられ得る（Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；およびAusubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993）。

【０５０２】

ファージ表示技法（McCafferty et al (1990) Nature 348:552-553）は、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーから、in vitroで抗ＦｃＲＨ５ヒト抗体および抗体断片を産生するために用いられ得る。この技法によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子は、糸状バクテリオファージの大または小外殻タンパク質遺伝子、例えばＭ１３またはｆｄ中にイン・フレームでクローン化され、ファージ粒子の表面に機能性抗体断片として表示される。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するため、抗体の機能性に基づいた選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も生じる。したがって、ファージは、Ｂ細胞の特性のいくつかを模倣する。（Johnson et al (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571；Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628；Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al (1993) EMBO J. 12:725-734；米国特許第５５６５３３２号；米国特許第５５７３９０５号；米国特許第５５６７６１０号；米国特許第５２２９２７５号）。

【０５０３】

抗ＦｃＲＨ５抗体は、既知のオリゴペプチド合成方法を用いて化学的に合成され得るし、あるいは組換え技法を用いて調製され、精製され得る。適切なアミノ酸配列またはその一部は、固相技法を用いて直接ペプチド合成により産生され得る（Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA；Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154）。in vitroタンパク質合成は、手動技法を用いて、または自動化により実施され得る。自動化固相合成は、例えば、ｔ－ＢＯＣまたはＦｍｏｃ保護化アミノ酸を用いて、ならびにメーカーの使用説明書を用いるApplied Biosystems ペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、成し遂げられ得る。抗ＦｃＲＨ５抗体またはＦｃＲＨ５ポリペプチドの種々の部分は、化学的または酵素的方法を用いて、別個に化学的に合成されて、組合されて、所望の抗ＦｃＲＨ５抗体またはＦｃＲＨ５ポリペプチドを産生し得る。

【０５０４】

抗体断片の産生のために、種々の技法が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解的消化により得られ（Morimoto et al. (1992), Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117；およびBrennan et al. (1985), Science, 229:81）、あるいは組換え宿主細胞により直接産生され得る。Ｆａｂ、ＦｖおよびＳｃＦｖ抗体断片は、全て、大腸菌中で発現され得、それから分泌され、したがって、大量のこれらの断片の手軽な産生を可能にする。抗体断片は、上記の抗体ファージライブラリーから単離され得る。代替的には、Ｆａｂ’－ＳＨ断片は大腸菌から直接回収され、化学的にカップリングされて、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を形成し得る（Carter et al. (1992), Bio/Technology 10:163-167）し、あるいは組換え宿主細胞培養から直接単離され得る。抗ＦｃＲＨ５抗体は、（ｓｃＦｖ）一本鎖Ｆｖ断片であり得る（ＷＯ　９３／１６１８５；米国特許第５，５７１，８９４号；および米国特許第５，５８７，４５８号）。抗ＦｃＲＨ５抗体断片は、「線状抗体」でもあり得る（米国特許第５，６４１，８７０号）。このような線状抗体断片は、一重特異性または二重特異性であり得る。

【０５０５】

以下の説明は、主に、抗ＦｃＲＨ５抗体コード核酸を含有するベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクトされた細胞を培養することによる抗ＦｃＲＨ５抗体の産生に関する。抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡは、抗ＦｃＲＨ５抗体ｍＲＮＡを保有し、

検出可能レベルでそれを発現すると考えられる組織から調製されるｃＤＮＡライブラリーから得られる。したがって、ヒト抗ＦｃＲＨ５抗体またはＦｃＲＨ５ポリペプチドＤＮＡは、ヒト組織から調製されるｃＤＮＡライブラリーから好都合に得られる。抗ＦｃＲＨ５抗体コード遺伝子は、ゲノムライブラリーから、あるいは既知の合成手法（例えば、自動核酸合成）によっても得られる。

【０５０６】

本発明の設計、選択および調製方法は、求電子性官能基と反応性であるシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を作動させる。これらの方法はさらに、抗体接合体化合物、例えば意図され、設計された、選択部位に薬剤分子を有する抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）化合物を作動させる。抗体表面上の反応性システイン残基は、マレイミドまたはハロアセチルのようなチオール反応基を介して薬剤部分を特異的に接合させることを可能にする。マレイミド基に対するＣｙｓ残基のチオール官能基の求核的反応性は、リシン残基のアミノ基、あるいはＮ末端アミノ基のようなタンパク質中の任意の他のアミノ酸官能基と比較して、約１０００倍高い。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬中のチオール特異的官能基はアミン基と反応し得るが、しかしより高いｐＨ（＞９．０）およびより長い反応時間が必要とされる（Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London）。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準エルマン検定により推定され得る。免疫グロブリンＭはジスルフィド結合五量体の一例であるが、一方、免疫グロブリンＧは、サブユニットを一緒に結合する内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の一例である。このようなタンパク質では、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）またはセレノール（Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-156）のような試薬によるジスルフィド結合の還元が、反応性遊離チオールを生成するために必要とされる。このアプローチは、抗体三次構造および抗原結合特異性の損失を生じ得る。

【０５０７】

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲ（反応性チオールの選択のためのファージＥＬＩＳＡ）検定は、ＥＬＩＳＡファージフォーマット中の抗体中の反応性システイン基の検出を可能にし、それによりシステイン操作された抗体の設計を支援する（Junutula, J.R. et al. (2008) Ｊ Immunol Methods 332:41-52；ＷＯ　２００６／０３４４８８；ＵＳ　２００７／００９２９４０）。システイン操作された抗体は、ウェル表面に被覆され、その後、ファージ粒子とともにインキュベートされ、ＨＲＰ標識化第二抗体を付加され、そして吸光度を検出される。ファージ上に表示される突然変異体タンパク質は、迅速な、堅牢且つ高処理量の方法で、スクリーニングされ得る。システイン操作された抗体のライブラリーは、抗体または他のタンパク質の無作為タンパク質－ファージライブラリーからの遊離Ｃｙｓ組入れの適切に反応性の部位を特定するための同一アプローチを用いて、産生され、結合選択に付され得る。この技法は、ファージ上に表示されるシステイン突然変異体タンパク質を、チオール反応性でもあるアフィニティー試薬またはレポーター基と反応させることを包含する。

【０５０８】

ＰＨＥＳＥＬＥＣＴＯＲ検定は、抗体中の反応性チオール基のスクリーニングを可能にする。この方法によるＡ１２１Ｃ変異体の特定は、例となるものである。全Ｆａｂ分子は、有効に検索されて、反応性チオール基を有するより多くのチオＦａｂを特定し得る。一つのパラメーターである分別的表面接近可能性は、ポリペプチド中のアミノ酸残基に対する溶媒の接近可能性を特定し、定量するために用いられた。表面接近可能性は、溶媒分子、例えば水により接触され得る表面積（Å^2）として表され得る。水の占有空間は、１．４　Å半径球として概算される。ソフトウェアは、既知のＸ線結晶学由来座標でタンパク質の各アミノ酸の表面接近可能性を算定するためのアルゴリズムを用いる結晶学プログラムのＣＣＰ４組（“The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography” (1994) Acta. Cryst. D50:760-763）として、自由に利用可能であるかまたはライセンス取得可能である（Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825、またはinternet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.htm

l）。表面接近可能性計算を実施する２つの例となるソフトウェアモジュールは、B.Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400のアルゴリズムに基づいた「ＡＲＥＡＩＭＯＬ」および「ＳＵＲＦＡＣＥ」である。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、それがタンパク質のファンデルワールス表面上を回転する際の、プローブ球面の中心の座（溶媒分子を表す）としてタンパク質の溶媒接近可能表面を定義する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、各原子の周りに拡張された球の上に表面点を作成し（原子およびプローブ半径の和と等しい原子中心からの距離で）、隣接原子と関連する等価の球内にあるものを除外することにより、溶媒接近可能表面積を算定する。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、ＰＤＢ座標ファイル中に原子の溶媒接近可能面積を見出し、残基による、鎖による、そして全分子に関する接近可能面積を要約する。個々の原子に関する接近可能面積（または面積差）は、偽ＰＤＢ出力ファイルに書き込まれ得る。ＡＲＥＡＩＭＯＬは、各元素に関する単一半径を想定し、限定数の異なる元素を認識するだけである。

【０５０９】

ＡＲＥＡＩＭＯＬおよびＳＵＲＦＡＣＥは、絶対接近可能性、すなわち平方オングストローム（Å）の数を報告する。分別表面接近可能性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関連する標準状態を参照することにより算定される。参照状態は、トリペプチドＧｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙ（ここで、Ｘは当該アミノ酸である）であり、参照状態は「拡大化」立体配座、すなわち、β鎖のものと同様であるべきである。拡大化立体配座は、Ｘの接近可能性を最大にする。算定接近可能面積を、Ｇｌｙ－Ｘ－Ｇｌｙトリペプチド参照状態における接近可能面積で割り、その商が、分別接近可能性である。接近可能性パーセントは、分別接近可能性に１００を掛けた値である。表面接近可能性を算定するための別の例となるアルゴリズムは、プログラムｘｓａｅ（Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel）のＳＯＬＶモジュールを基礎にしており、これは、ポリペプチドのＸ線座標に基づいた水球へのアミノ酸残基の分別接近可能性を算定する。抗体中の全てのアミノ酸に関する分別表面接近可能性は、利用可能な結晶構造情報を用いて算定され得る（Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995）。

【０５１０】

システイン操作された抗体をコードするＤＮＡは、慣用的手法を用いて（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）、容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの供給源として役立つ。一旦単離されると、ＤＮＡは、発現ベクター中に入れられて、これは次に、別の状況では抗体タンパク質を産生しない宿主細胞、例えば大腸菌、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはその他の哺乳類宿主細胞、例えば骨髄腫細胞中にトランスフェクトされて（米国特許第５８０７７１５号；ＵＳ　２００５／００４８５７２；ＵＳ　２００４／０２２９３１０）、組換え宿主細胞中でのモノクローナル抗体の合成を得る。

【０５１１】

設計および選択後、システイン操作された抗体、例えば、高反応性非対合Ｃｙｓ残基、「遊離システインアミノ酸」を有するＴｈｉＯＦａｂｓは、（ｉ）細菌、例えば大腸菌系（Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262；Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188）、または哺乳類細胞培養系（ＷＯ　０１／００２４５）、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）における発現；ならびに（ｉｉ）一般タンパク質精製技法（Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988）を用いた精製により産生され得る。

【０５１２】

操作されたＣｙｓチオール基は、求電子性リンカー試薬および薬剤－リンカー中間体と反応して、システイン操作された抗体薬剤接合体およびその他の標識化システイン操作された抗体を形成する。システイン操作された抗体の、そして親抗体中に存在するＣｙｓ残基（対合され、鎖間および鎖内ジスルフィド結合を形成する）は、（還元剤で処理されない限り）任意の反応性チオール基を有し、求電子性リンカー試薬または薬剤－リンカー中

間体と反応しない。新たに操作されたＣｙｓ残基は、非対合のままであり、求電子性リンカー試薬または薬剤－リンカー中間体、例えば薬剤－マレイミドと反応する、すなわち接合し得る。例となる薬剤－リンカー中間体としては、以下のものが挙げられる：ＭＣ－ＭＭＡＥ、ＭＣ－ＭＭＡＦ、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥおよびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ。重鎖および軽鎖の操作されたＣｙｓ残基の構造位置は、連続番号付けシステムに従って番号付けされる。この連続番号付けシステムは、カバト番号付けシステム（Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）と相関して、Ｎ末端で開始して、ａ、ｂ、ｃにより注を付けられた挿入によりカバト番号付けスキーム（最下行）と異なる。カバト番号付けシステムを用いて、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲまたはＣＤＲの短縮またはそれらへの挿入に対応するより少ないかまたは付加的なアミノ酸を含有し得る。システイン操作された重鎖変異体部位は、連続番号付けおよびカバト番号付けスキームにより特定される。

【０５１３】

一実施形態では、システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、以下を包含する工程により調製される：

（ａ）親抗ＦｃＲＨ５抗体の１つ以上のアミノ酸残基をシステインで置き換えること；そして

（ｂ）システイン操作された抗体をチオール反応性試薬と反応させることにより、システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体のチオール反応性を確定すること。

【０５１４】

システイン操作された抗体は、チオール反応性試薬に関して親抗体より反応性になり得る。

【０５１５】

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖または軽鎖中に、あるいは定常または可変ドメイン中に位置し得る。抗体断片、例えばＦａｂも、１つ以上のシステインアミノ酸で操作されて、抗体断片のアミノ酸を置き換えて、システイン操作された抗体断片を形成し得る。

【０５１６】

本発明の別の実施形態は、システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の調製（製造）方法であって、

（ａ）システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体を生成するために、親抗ＦｃＲＨ５抗体中に１つ以上のシステインアミノ酸を導入すること；

（ｂ）チオール反応性試薬とのシステイン操作された抗体のチオール反応性を確定することを包含する方法を提供するが、この場合、システイン操作された抗体は、チオール反応性試薬に関して親抗体より反応性である。

【０５１７】

システイン操作された抗体の調製方法のステップ（ａ）は、

（ｉ）システイン操作された抗体をコードする核酸配列を変異誘発すること；

（ｉｉ）システイン操作された抗体を発現すること；ならびに

（ｉｉｉ）システイン操作された抗体を単離し、精製すること

を包含し得る。

【０５１８】

システイン操作された抗体の調製方法のステップ（ｂ）は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン操作された抗体を発現することを包含し得る。

【０５１９】

システイン操作された抗体の調製方法のステップ（ｂ）は、

（ｉ）システイン操作された抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて、親和性標識化システイン操作された抗体を生成すること；ならびに

（ｉｉ）親和性標識化システイン操作された抗体と捕捉培地との結合を測定することも包含し得る。

【０５２０】

本発明の別の実施形態は、チオール反応性に関して高反応性非対合システインアミノ酸を有するシステイン操作された抗体をスクリーニングする方法であって、以下包含する方法である：

（ａ）システイン操作された抗体を生成するために、親抗体中に１つ以上のシステインアミノ酸を導入すること；

（ｂ）システイン操作された抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて親和性標識化システイン操作された抗体を生成すること；ならびに

（ｃ）親和性標識化システイン操作された抗体と捕捉培地との結合を測定すること；そして

（ｄ）チオール反応性試薬とのシステイン操作された抗体のチオール反応性を確定すること。

【０５２１】

システイン操作された抗体をスクリーニングする方法のステップ（ａ）は、

（ｉ）システイン操作された抗体をコードする核酸配列を変異誘発すること；

（ｉｉ）システイン操作された抗体を発現すること；ならびに

（ｉｉｉ）システイン操作された抗体を単離し、精製すること

を包含し得る。

【０５２２】

システイン操作された抗体のスクリーニング方法のステップ（ｂ）は、ファージまたはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン操作された抗体を発現することを包含し得る。

【０５２３】

システイン操作された抗体のスクリーニング方法のステップ（ｂ）は、

（ｉ）システイン操作された抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させて、親和性標識化システイン操作された抗体を生成すること；ならびに

（ｉｉ）親和性標識化システイン操作された抗体と捕捉培地との結合を測定することも包含し得る。

【０５２４】

ｂ．　抗ＦｃＲＨ５ＩｇＧ変異体のシステイン操作

システインを、本明細書中に記載されるシステイン操作方法により、重鎖１１８（ＥＵ番号付け）（連続番号付け重鎖位置１１８と同等）部位で、全長キメラ親モノクローナル抗ＦｃＲＨ５抗体中に、あるいは軽鎖２０５（カバト番号付け）（連続番号付け、軽鎖位置２０９と同等）部位で、全長キメラ親モノクローナル抗ＦｃＲＨ５抗体中に導入した。

【０５２５】

生成された重鎖１１８（ＥＵ番号付け）にシステインを有するシステイン操作された抗体は、（ａ）重鎖配列（配列番号４２）および軽鎖配列（配列番号４１）を有するチオ－ｈｕ１０Ａ８ｖ１－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）であった（図１２）。

【０５２６】

生成された軽鎖２０５（カバト番号付け）にシステインを有するシステイン操作された抗体は、（ａ）重鎖配列（配列番号４４）および軽鎖配列（配列番号４３）を有するチオ－ｈｕ１０Ａ８ｖ１－ＬＣ９（Ｖ２０５Ｃ）であった（図１３）。

【０５２７】

これらのシステイン操作されたモノクローナル抗体を、１ｍＭシステインを含有する培地中での一過性発酵により、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）細胞中で発現させた。

【０５２８】

ｃ．　標識化システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体

システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体は、チオール反応性試薬と部位特異的に且つ効率的にカップリングされ得る。チオール反応性試薬は、多官能性リンカー試薬、捕捉、すなわち親和性標識試薬（例えば、ビオチン－リンカー試薬）、検出標識（例えば、蛍光体試薬）、固相固定化試薬（例えば、セファロース（商標）、ポリスチレンまたはガラス）、または薬剤－リンカー中間体であり得る。チオール反応性試薬の一例は、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）である。例となる一実施形態では、ＴｈｉｏＦａｂとビオチン－リンカー試薬との反応はビオチニル化ＴｈｉｏＦａｂを提供し、これにより操作されたシステイン残基の存在および反応性が検出され、測定され得る。ＴｈｉｏＦａｂと多官能性リンカー試薬との反応は多官能性化リンカーを有するＴｈｉｏＦａｂを提供し、これはさらに薬剤部分試薬または他の標識と反応させ得る。ＴｈｉｏＦａｂと薬剤－リンカー中間体との反応は、ＴｈｉｏＦａｂ薬剤接合体を提供する。

【０５２９】

本明細書中に記載される例となる方法は、一般的に、抗体の特定および産生に、さらに一般的には、本明細書中に記載される設計およびスクリーニングステップの適用により他のタンパク質に適用され得る。

【０５３０】

このようなアプローチは、反応性基が、例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィドまたは他のチオール反応性接合相手である他のチオール反応性試薬の接合に適用され得る（Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.；Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2；Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London；Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2；Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671）。チオール反応性試薬は、薬剤部分、蛍光体、例えば蛍光染料、例えばフルオレセインまたはローダミン、画像処理のためのキレート剤または放射線治療用金属、ペプチジルまたは非ペプチジル標識または検出タグ、あるいはクリアランス改質剤、例えばポリエチレングリコールの種々の異性体、第三の構成成分と結合するペプチド、あるいは別の炭水化物または親油性物質であり得る。

【０５３１】

ｄ．　システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の使用

システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体およびその接合体は、治療薬および／または診断薬としての用途を見出し得る。本発明はさらに、Ｂ細胞関連障害を伴う１つ以上の症候を防止し、管理し、処置し、または改善する方法を提供する。特に本発明は、細胞増殖性障害、例えば癌、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫を伴う１つ以上の症候を防止し、管理し、処置し、または改善する方法を提供する。本発明はさらに、ＦｃＲＨ５関連障害またはこのような障害を発症する素因を診断するための方法、ならびにＢ細胞関連ＦｃＲＨ５ポリペプチドを優先的に結合する抗体および抗体の抗原結合断片を特定するための方法を提供する。

【０５３２】

本発明の別の実施形態は、Ｂ細胞関連障害に応答性である症状の処置に有用な医薬剤の調製のためのシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の使用に向けられる。

【０５３３】

ｅ．　システイン操作された抗体薬剤接合体（チオ－抗体薬剤接合体（ＴＤＣ））

本発明の別の態様は、システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体（Ａｂ）およびアウリスタチン薬剤部分（Ｄ）を含む抗体－薬剤接合体化合物であって、ここで、システイン操作された抗体は、リンカー部分（Ｌ）により、１つ以上の遊離システインアミノ酸を介して、式Ｉ：Ａｂ－（Ｌ－Ｄ）$_p$（式中、ｐは、１、２、３または４である）を有する化合物

であるＤと結合され；システイン操作された抗体は、親抗ＦｃＲＨ５抗体の１つ以上のアミノ酸残基を１つ以上の遊離システインアミノ酸で置き換えることを包含する方法により調製される。

【０５３４】

本発明の別の態様は、式Ｉの抗体－薬剤化合物の混合物を含む組成物であって、ここで、抗体当たりの平均薬剤負荷は約２～約５、または約３～約４である。

【０５３５】

システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体の考え得る利点としては、改良された安全性（より大きな治療指数）、改良されたＰＫパラメーター、抗体鎖間ジスルフィド結合が保持されて、これが接合体を安定化し、その活性結合立体配座を保持し得ること、薬剤接合体の部位が限定され、そして薬剤－リンカー試薬とのシステイン操作された抗体の接合からシステイン操作された抗体薬剤接合体が調製されることがより均質な生成物を生じること、が挙げられる。

【０５３６】

リンカー

「リンカー」、「リンカー単位」または「リンク」は、共有結合、または抗体を薬剤部分と共有的に結合する原子の鎖を含む化学的部分を意味する。種々の実施形態では、リンカーは、Ｌとして明記される。「リンカー」（Ｌ）は、１つ以上の薬剤部分（Ｄ）および抗体単位（Ａｂ）を連結して、式Ｉの抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）を形成するために用いられ得る二官能性または多官能性部分である。抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）は、薬剤との、および抗体との結合のために反応性官能性を有するリンカーを用いて好都合に調製され得る。システイン操作された抗体（Ａｂ）のシステインチオールは、リンカー試薬の求電子性官能基、薬剤部分または薬剤－リンカー中間体との結合を形成し得る。

【０５３７】

一態様では、リンカーは、抗体上に存在する求核性システインと反応性である求電子性基を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子性基と反応性であり、リンカーと共有結合を形成する。有用な求電子性基としては、マレイミドおよびハロアセトアミド基が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５３８】

リンカーとしては、二価ラジカル、例えばアルキルジイル、アリーレン、ヘテロアリーレン、以下のような部分：－（CR_2）$_n$Ｏ（CR_2）$_n$－、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、ＰＥＧ、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、ジェファミン（商標））の反復単位；ならびに二酸エステルおよびアミド、例えばスクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネートおよびカプロアミドが挙げられる。

【０５３９】

システイン操作された抗体は、Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773の７６６ページの接合方法に従って、求電子性官能基、例えばマレイミドまたはα－ハロカルボニルを有するリンカー試薬または薬剤－リンカー中間体と反応する。

【０５４０】

リンカーは、１つ以上のリンカー構成成分からなり得る。リンカー構成成分の例としては、６－マレイミドカプロイル（「ＭＣ」）、マレイミドプロパノイル（「ＭＰ」）、バリン－シトルリン（「ｖａｌ－ｃｉｔ」または「ｖｃ」）、アラニン－フェニルアラニン（「ａｌａ－ｐｈｅ」または「ａｆ」）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「ＰＡＢ」）、Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（「ＳＰＰ」）、Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（「ＳＭＣＣ」）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（「ＳＩＡＢ」）、エチレンオキシ－CH_2CH_2O－（１つ以上の反復単位として）（「ＥＯ」または「ＰＥＯ」）が挙げられる。追加のリンカー構成成分は当該技術分野で既知であり、いくつかは本明細書中に記載される。

【０５４１】
一実施形態では、ＡＤＣのリンカーＬは、次式を有する：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

式中、Ａは、抗体（Ａｂ）のシステインチオールと共有結合されるストレッチャー単位であり；
ａは０～１であり；
－Ｗ－は、各々独立して、アミノ酸単位であり、
ｗは、独立して、０～１２の整数であり；
－Ｙ－は、薬剤部分と共有結合されるスペーサー単位であり；
ｙは、０、１または２である。

【０５４２】
ストレッチャー単位
ストレッチャー単位（－Ａ－）は、存在する場合、抗体単位をアミノ酸単位（－Ｗ－）と連結し得る。この点で、抗体（Ａｂ）は、ストレッチャーの官能基との結合を形成し得る官能基を有する。天然にまたは化学的操作により抗体上に存在し得る有用な官能基としては、スルフヒドリル（－ＳＨ）、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、抗体官能基は、スルフヒドリルまたはアミノである。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元により生成され得る。代替的には、スルフヒドリル基は、２－イミノチオラン（トラウト試薬）または別のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリシン部分のアミノ基の反応により生成され得る。一実施形態では、抗体（Ａｂ）は、ストレッチャー単位の求電子性官能基と結合を形成し得る遊離システインチオール基を有する。式Ｉ接合体中の例となるストレッチャー単位は、式ＩＩおよびＩＩＩで示され、式中、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは上記の定義と同様であり、そしてR^{17}は、$(CH_2)_r$、C_3～C_8カルボシクリル、O-$(CH_2)_r$、アリーレン、$(CH_2)_r$-アリーレン、-アリーレン-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-（C_3～C_8カルボシクリル）、（C_3～C_8カルボシクリル）-$(CH_2)_r$、C_3～C_8ヘテロシクリル、$(CH_2)_r$-（C_3～C_8ヘテロシクリル）、-（C_3～C_8ヘテロシクリル）-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-、--$(CH_2)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-および-$(CH_2CH_2O)_r$C（O）$NR^b$$(CH_2)_r$-から選択される二価ラジカルであり；$R^b$は、Ｈ、$C_1$～$C_6$アルキル、フェニルまたはベンジルであり；そしてｒは、独立して、１～１０の範囲の整数である。

【０５４３】
アリーレンは、芳香族環系から２個の水素原子を除去することにより得られる炭素原子数６～２０の二価芳香族炭化水素ラジカルを包含する。典型的なアリーレン基としては、ベンゼン、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル等から得られるラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０５４４】
ヘテロシクリル基は、１つ以上の環原子が、異種原子、例えば窒素、酸素およびイオウである環系を包含する。ヘテロシクリルラジカルは、１～２０個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３個の異種原子を含む。複素環は、３～７個の環成員（２～６個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３個の異種原子）を有する単環、あるいは７～１０個の環成員（４～９個の炭素原子、ならびにＮ、Ｏ、ＰおよびＳから選択される１～３個の異種原子）を有する二環、例えばビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］または［６，６］系であり得る。複素環は、Paquette, Le

o A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1、3、4、6、7および9章；“The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950提供)、特に、Volumes 13、14、16、19および28；ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載されている。

【０５４５】

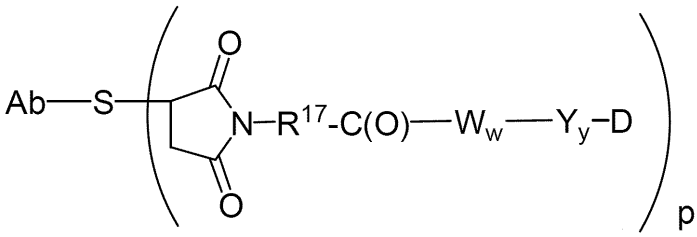
複素環式環の例としては、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル、（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、イオウ酸化テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、２－ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス－テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス－テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、６Ｈ－１，２，５－チアジアジニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、２Ｈ－ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、３Ｈ－インドリル、１Ｈ－インダゾリル、プリニル、４Ｈ－キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、４Ａｈ－カルバゾリル、カルバゾリル、β－カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニルおよびイサチノイルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０５４６】

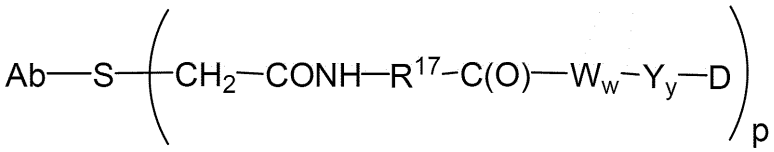
カルボシクリル基は、単環として３～７個の炭素原子、または二環として７～１２個の炭素原子を有する飽和または不飽和環を包含する。単環式炭素環は、３～６個の環原子、さらに典型的には５または６個の環原子を有する。二環式炭素環は、ビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］または［６，６］系として整列される７～１２個の環原子、あるいは［５，６］または［６，６］系として配置される９または１０個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキ－１－エニル、１－シクロヘキ－２－エニル、１－シクロヘキ－３－エニル、シクロヘプチルおよびシクロオクチルが挙げられる。

【０５４７】

式Ｉ　ＡＤＣのすべての例となる実施形態、例えばＩＩ～ＶＩから、特に示されない場合でも、操作されたシステイン残基の数に依存して、１～４の薬剤部分が抗体に連結される（ｐ＝１～４）、と理解されるべきである。



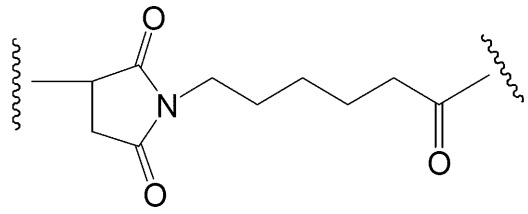
II



III

【０５４８】

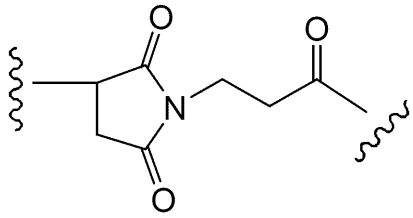
例証的な式ＩＩストレッチャー単位は、マレイミドーカプロイル（ＭＣ）から得られ、式中、Ｒ１７は－（ＣＨ２）５－である：



MC

【０５４９】

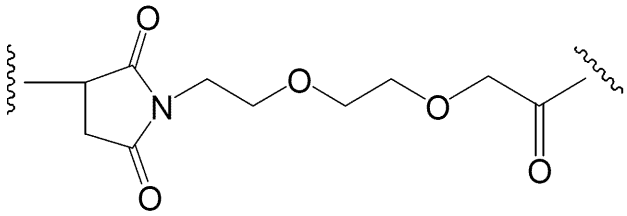
式ＩＩの例証的なストレッチャー単位は、マレイミドープロパノイル（ＭＰ）から得られ、式中、Ｒ１７は－（ＣＨ２）２－である：



MP

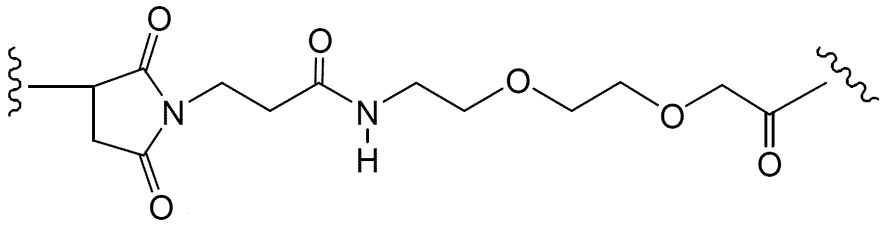
【０５５０】

式ＩＩの別の例証的なストレッチャー単位（式中、Ｒ１７は－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ－ＣＨ２－であり、ｒは２である）：



【０５５１】

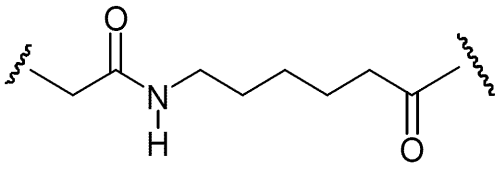
式ＩＩの別の例証的なストレッチャー単位（式中、Ｒ１７は-（ＣＨ２）ｒＣ（Ｏ）ＮＲｂ（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｒ-ＣＨ２-で、ここで、ＲｂはＨであり、ｒは２である）：



MPEG

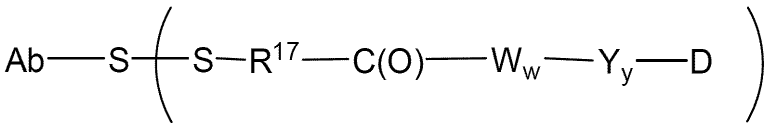
【０５５２】

式ＩＩＩの例証的なストレッチャー単位（式中、Ｒ^{17}は－（ＣＨ$_2$）$_5$－である）：



【０５５３】

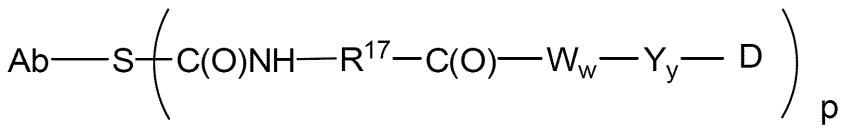
別の実施形態では、ストレッチャー単位は、抗体の操作されたシステインイオウ原子とストレッチャー単位のイオウ原子との間のジスルフィド結合を介してシステイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体と連結される。この実施形態の代表的ストレッチャー単位は、式ＩＶで示され、式中、Ｒ^{17}、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは上記の定義と同じである。



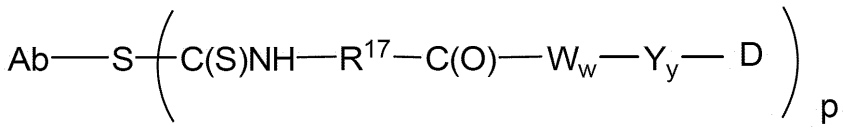
IV

【０５５４】

さらに別の実施形態では、ストレッチャーの反応性基は、遊離システインチオールと結合を形成し得るチオール反応性官能基を含有する。チオール反応性官能基の例としては、マレイミド、α－ハロアセチル、活性化エステル、例えばスクシンイミドエステル、４－ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、スルホニル塩化物、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられるが、これらに限定されない。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式Ｖ$_a$およびＶ$_b$で示され、式中、Ｒ^{17}、Ａｂ－、－Ｗ－、－Ｙ－、－Ｄ、ｗおよびｙは上記の定義と同じである：



Va



Vb

【０５５５】

別の実施形態では、リンカーは、分枝鎖多官能性リンカー部分を介して１つより多い薬

剤部分を抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る（Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768；King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990）。樹状リンカーは、薬剤対抗体のモル比、すなわち負荷を増大し、これは、ＡＤＣの効能に関連する。したがって、システイン操作された抗体が１つの反応性システインチオール基のみを保有する場合、多数の薬剤部が樹状リンカーを介して結合され得る。

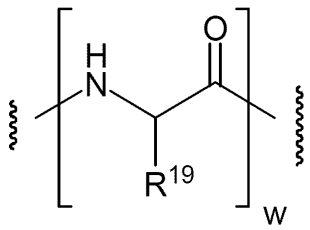
【０５５６】

アミノ酸単位

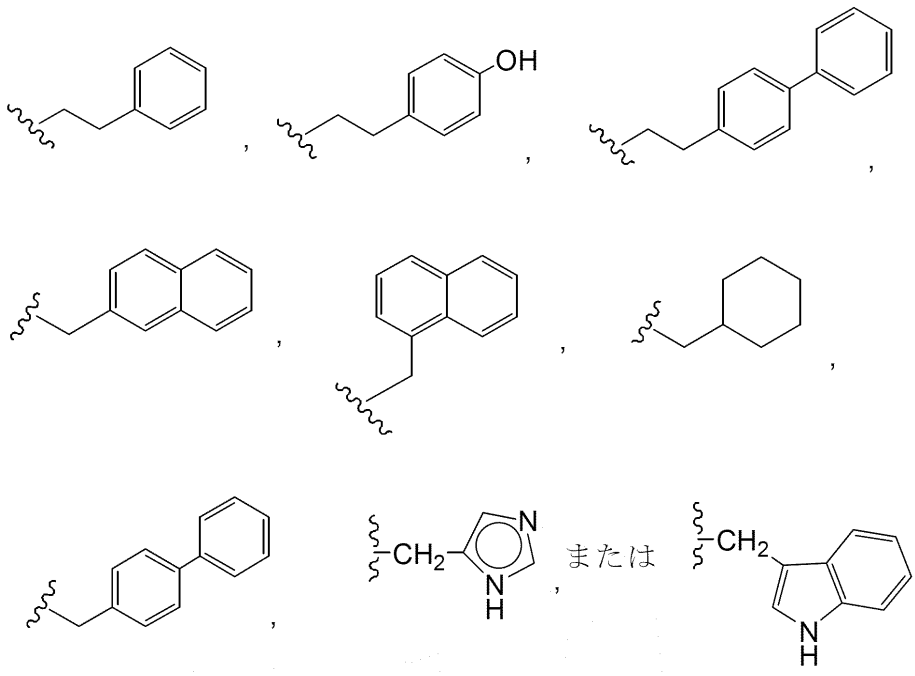
リンカーは、アミノ酸残基を含み得る。アミノ酸単位（－W_w－）は、存在する場合、抗体を、本発明のシステイン操作された抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）の薬剤部分（Ｄ）に連結する。

【０５５７】

－W_w－は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチド単位である。アミノ酸単位を含むアミノ酸残基は、天然のもの、ならびに小アミノ酸および非天然アミノ酸類似体、例えばシトルリンを包含する。－W－単位は、各々独立して、角括弧中の下記の式を有し、ｗは０～１２の範囲の整数である：



式中、R^{19}は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ベンジル、ｐ－ヒドロキシベンジル、－CH_2OH、－CH（OH）CH_3、－$CH_2CH_2SCH_3$、－CH_2CONH_2、－CH_2COOH、－$CH_2CH_2CONH_2$、－CH_2CH_2COOH、－$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、－$(CH_2)_3NH_2$、－$(CH_2)_3NHCOCH_3$、－$(CH_2)_3NHCHO$、－$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、－$(CH_2)_4NH_2$、－$(CH_2)_4NHCOCH_3$、－$(CH_2)_4NHCHO$、－$(CH_2)_3NHCONH_2$、－$(CH_2)_4NHCONH_2$、－$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、２－ピリジルメチル－、３－ピリジルメチル－、４－ピリジルメチル－、フェニル、シクロヘキシル、



である。

【０５５８】

Ｒ１９が水素以外である場合、Ｒ１９が結合される炭素原子はキラルである。Ｒ１９が結合される炭素原子は、各々独立して、（Ｓ）または（Ｒ）立体配置であるか、あるいはラセミ混合物である。したがって、アミノ酸単位は、エナンチオマー的に純粋であるか、ラセミであるかまたはジアステレオマー性であり得る。

【０５５９】

－Ｗｗ－アミノ酸単位の例としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが挙げられる。ジペプチドの例としては、以下のものが挙げられる：バリン－シトルリン（ｖｃまたはｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆまたはａｌａ－ｐｈｅ）。トリペプチドの例としては、以下のものが挙げられる：グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）およびグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）。アミノ酸リンカー構成成分を含むアミノ酸残基は、天然のもの、ならびに小アミノ酸および非天然アミノ酸類似体、例えばシトルリンを包含する。

【０５６０】

アミノ酸単位は、１つ以上の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼにより酵素的に開裂されて、薬剤部分（－Ｄ）を遊離し、これは、一実施形態では、放出時にin vivoでプロトン化されて、薬剤（Ｄ）を提供する。アミノ酸リンカーは、特定酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、ＣおよびＤ、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的開裂のために、それらの選択性で設計され、最適化され得る。

【０５６１】

スペーサー単位

スペーサー単位（－Ｙｙ－）は、存在する場合（ｙ＝１または２）、アミノ酸単位が存在すると（ｗ＝１～１２）、アミノ酸単位（－Ｗｗ－）を薬剤部分と連結する。代替的には、スペーサー単位は、アミノ酸単位が存在しない場合には、ストレッチャー単位を薬剤単位と連結する。スペーサー単位はさらにまた、アミノ酸単位とストレッチャー単位がともに存在しない場合（ｗ、ｙ＝０）、薬剤部分を抗体と連結する。スペーサー単位は、以下の２つの一般的型を有する：自壊的および非自壊的。非自壊的スペーサー単位は、スペーサー単位の一部または全部が、特に酵素的に、抗体－薬剤接合体または薬剤部分－リンカーからアミノ酸単位が開裂された後に、薬剤部分に結合されたままであるものである。グリシン－グリシンスペーサー単位またはグリシンスペーサー単位を含有するＡＤＣが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼまたはリンパ球関連プロテアーゼによ

る酵素的開裂を受ける場合、グリシン－グリシン－薬剤部分またはグリシン－薬剤部分はＡｂ－Ａ$_{a}$－Ｗ$_{w}$－から解離される。一実施形態では、個々の加水分解反応は標的細胞内で起きて、グリシン－薬剤部分結合を開裂し、薬剤を遊離する。

【０５６２】

別の実施形態では、－Ｙ$_{y}$－はｐ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）単位であって、そのフェニレン部分はＱ$_{m}$で置換され、ここで、ＱはＣ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロまたは－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数である。

【０５６３】

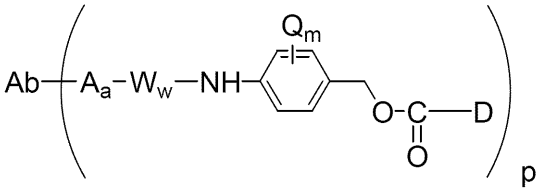
非自壊的スペーサー単位（－Ｙ－）の例となる実施形態は：－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－；－Ｇｌｙ－；－Ａｌａ－Ｐｈｅ－；－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－である。

【０５６４】

一実施形態では、スペーサー単位が存在しない（ｙ＝０）ＡＤＣの薬剤部分－リンカー、あるいはその製薬上許容可能な塩または溶媒和物が提供される。

【０５６５】

代替的には、自壊的スペーサー単位を含有するＡＤＣは、－Ｄを放出し得る。一実施形態では、－Ｙ－はＰＡＢ基であって、これは、ＰＡＢ基のアミノ窒素原子を介して－Ｗ$_{w}$－と連結され、そしてカルボネート、カルバメートまたは他の基を介して－Ｄに直接結合されるが、この場合、ＡＤＣは以下の例となる構造を有する：



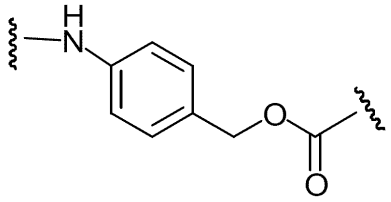
式中、Ｑは、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロまたは－シアノであり；そしてｍは０～４の範囲の整数であり、ｐは１～４の範囲である。

【０５６６】

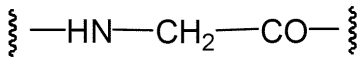
自壊的スペーサーの他の例としては、ＰＡＢ基と電子的に類似する芳香族化合物、例えば２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体(Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、複素環式ＰＡＢ類似体(ＵＳ　２００５／０２５６０３０)、β－グルクロニド(ＷＯ　２００７／０１１９６８)およびオルトまたはパラ－アミノベンジルアセタルが挙げられるが、これらに限定されない。置換および非置換４－アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビシクロ［２．２．１］およびビシクロ［２．２．２］環系(Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)ならびに２－アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867)のような、アミド結合加水分解時に環化を受けるスペーサーが用いられ得る。グリシンで置換されるアミン含有薬剤の除去（Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447）も、ＡＤＣに有用な自壊的スペーサーの例である。

【０５６７】

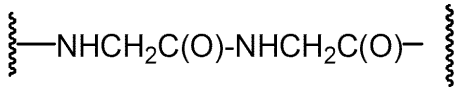
例となるスペーサー単位（－Ｙ$_{y}$－）は、式Ｘ～ＸＩＩで表される：



X



XI



XII

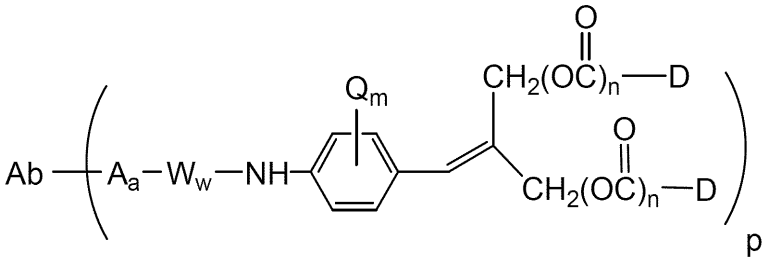
【０５６８】

樹状リンカー

別の実施形態では、リンカーＬは、分枝鎖多機能性リンカー部分を介して１つより多い薬剤部分を抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る（Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768）。樹状リンカーは、薬剤対抗体のモル比、すなわち負荷を増大し、これは、ＡＤＣの効能と関連する。したがって、システイン操作された抗体が１つの反応性システインチオール基のみを保有する場合、多数の薬剤部分は樹状リンカーを介して結合され得る。分枝鎖樹状リンカーの例となる実施形態としては、２，６－ビス（ヒドロキシメチル）－ｐ－クレゾールおよび２，４，６－トリス（ひどろきしっメチル）－フェノールデンドリマー単位が挙げられる（ＷＯ　２００４／０１９９３；Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689；Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731；Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499）。

【０５６９】

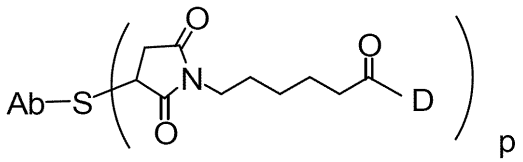
一実施形態では、スペーサー単位は、分枝鎖ビス（ヒドロキシメチル）スチレン（ＢＨＭＳ）であって、これは、多数の薬剤を組入れ、放出するために用いられ、以下の構造を有し：

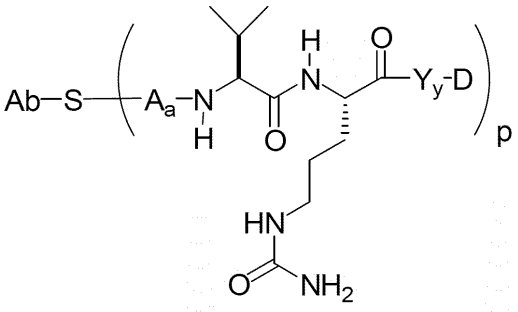


２－（４－アミノベンジリデン）プロパン－１，３－ジオール・デンドリマー単位（ＷＯ　２００４／０４３４９３；de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494)を含み、式中、Ｑは－Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル、－Ｏ－（Ｃ$_1$～Ｃ$_8$アルキル）、－ハロゲン、－ニトロまたは－シアノであり；ｍは０～４の範囲の整数であり；ｎは０または１であり；ｐは１～４の範囲である。

【０５７０】

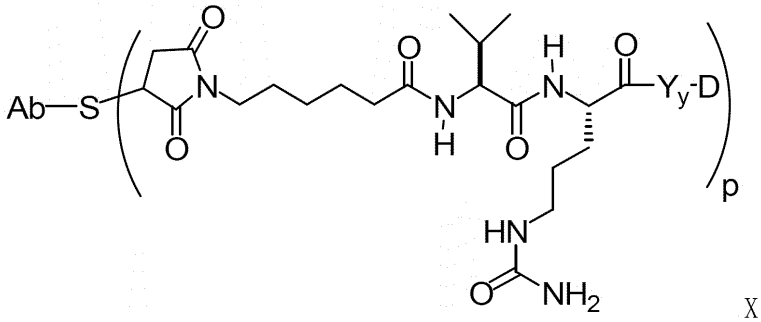
式Ｉ抗体－薬剤接合体化合物の例となる実施形態としては、ＸＩＩＩａ（ＭＣ）、ＸＩＩＩｂ（ｖａｌ－ｃｉｔ）、ＸＩＩＩｃ（ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ）およびＸＩＩＩｄ（ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢ）が挙げられる：



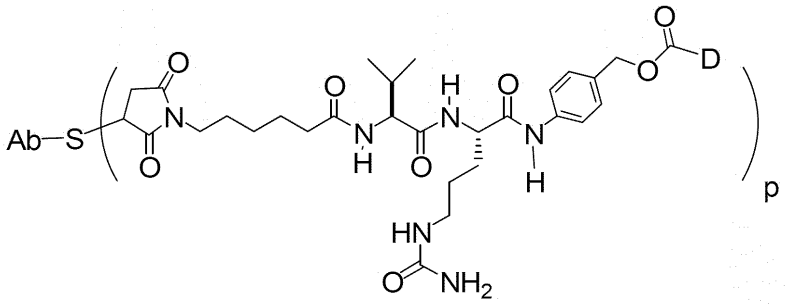


XIIIa

XIIIb



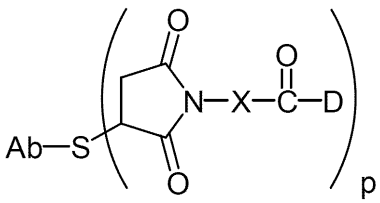
XIIIc



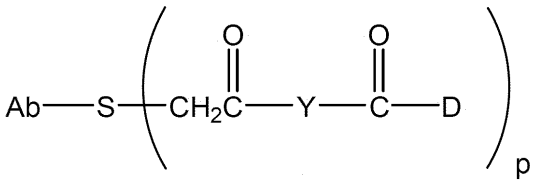
XIIId

【０５７１】

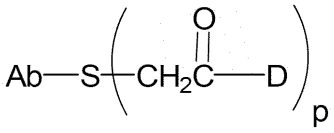
式Ｉａ抗体－薬剤接合体化合物の他の例となる実施形態としては、ＸＩＶａ～ｅが挙げられる：



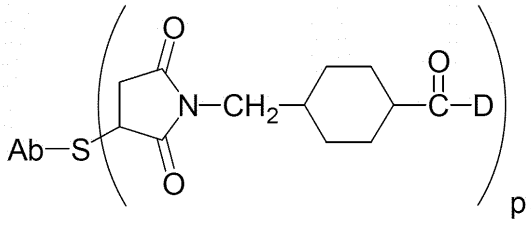
XIVa



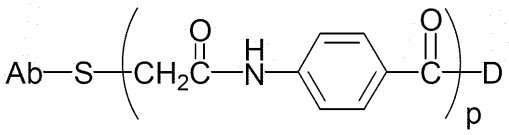
XIVb



XIVc

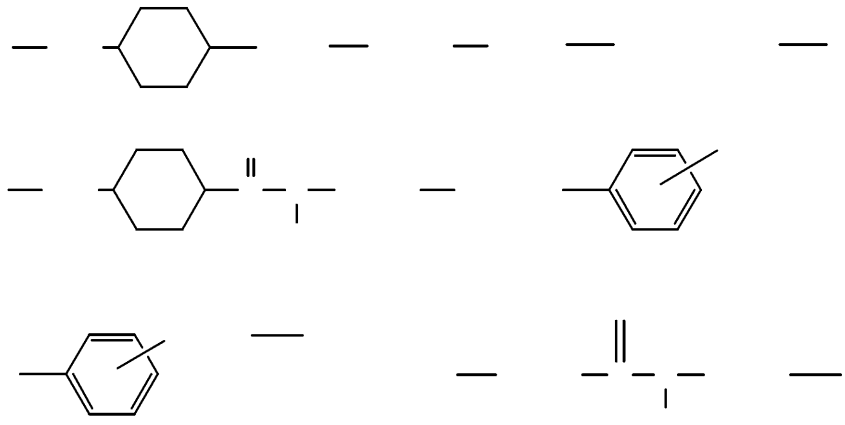


XIVd

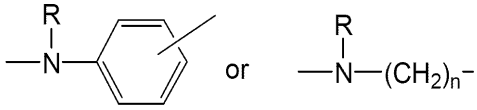


XIVe

式中、Ｘは以下のものであり：



Ｙは、以下のものであり：



Ｒは、独立して、ＸまたはＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルであり；ｎは、１～１２である。

【０５７２】

別の実施形態では、リンカーは、抗体上に存在する求電子性基と反応性である求核性基を有する反応性官能基を有する。抗体上の有用な求電子性基としては、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられるが、これらに限定されない。リンカーの求核性基の異種

原子は、抗体上の求電子性基と反応し、抗体単位と共有結合を形成し得る。リンカー上の有用な求核性基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。抗体上の求電子性基は、リンカーとの結合のための好都合な部位を提供する。

【０５７３】

典型的には、ペプチド型リンカーは、２つ以上のアミノ酸および／またはペプチド断片間にペプチド結合を形成することにより調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成法（E. Schroder and K. Lubke, “The Peptides”, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press）によって調製され得る。リンカー中間体は、スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸単位を含めた反応の任意の組合せまたは順序で組み立てられ得る。スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸単位は、求電子性、求核性または遊離ラジカルの性質を有する反応性官能基を用い得る。反応性官能基としては、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ－ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネートおよび脱離基、例えばＯ－メシル、Ｏ－トシル、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ；またはマレイミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【０５７４】

例えば、荷電置換基、例えばスルホネート（$-SO_3^-$）またはアンモニウムは、試薬の水溶性を増大し、リンカー試薬と抗体または薬剤部分とのカップリング反応を助長し、あるいは、ＡＤＣを調製するために用いられる合成経路によって、Ａｂ－Ｌ（抗体－リンカー中間体）とＤとの、またはＤ－Ｌ（薬剤－リンカー中間体）とＡｂとのカップリング反応を促し得る。

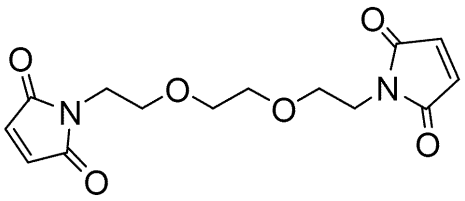
【０５７５】

リンカー試薬

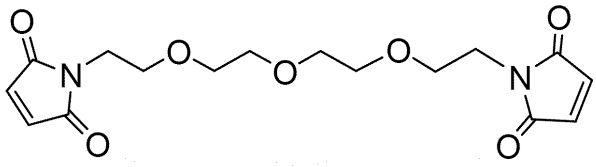
抗体およびアウリスタチンの接合体は、種々の二官能性リンカー試薬、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート　ＨＣｌ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン２，６－ジイソシアネート）およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を用いて作製され得る。

【０５７６】

抗体薬剤接合体は、リンカー試薬：ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣおよびスルホ－ＳＭＰＢ、ならびにＳＶＳＢ（スクシンイミジル－（４－ビニルスルホン）ベンゾエート）、ならびにビス－マレイミド試薬：ＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、１，８－ビス－マレイミドジエチレングリコール（$BM(PEO)_2$）および１，１１－ビス－マレイミドトリエチレングリコール（$BM(PEO)_3$）を含めて用いて調製され得る（これらは、市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL.およびその他の試薬供給元から）。ビス－マレイミド試薬は、システイン操作された抗体のチオール基を、チオール含有薬剤部分、標識またはリンカー中間体と、逐次または同時的に結合させる。システイン操作された抗体、薬剤部分、標識またはリンカー中間体のチオール基と反応性であるマレイミドの他の官能基としては、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルスルフィド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられる。



BM(PEO)$_2$



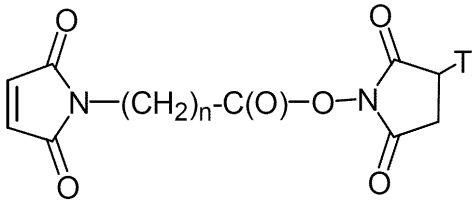
BM(PEO)$_3$

【０５７７】

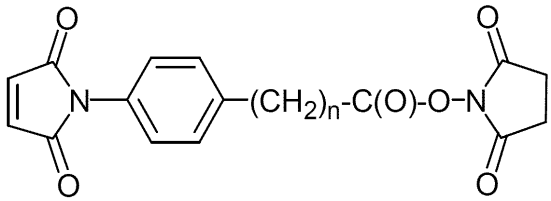
有用なリンカー試薬は、他の商業的供給元、例えばMolecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)により入手され得るし、あるいはToki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872；Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355；Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186；米国特許第６２１４３４５号；ＷＯ　０２／０８８１７２；米国特許第２００３１３０１８９号；米国特許第２００３０９６７４３号；ＷＯ　０３／０２６５７７；ＷＯ　０３／０４３５８３；およびＷＯ　０４／０３２８２８に記載された手法に従って合成され得る。

【０５７８】

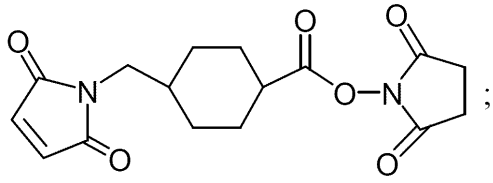
式（ＩＩＩａ）のストレッチャーは、以下のリンカー試薬とアミノ酸単位のＮ末端との反応により、リンカー中に導入され得る：

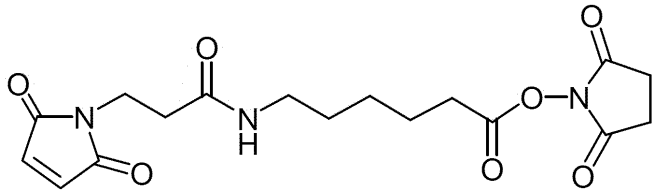


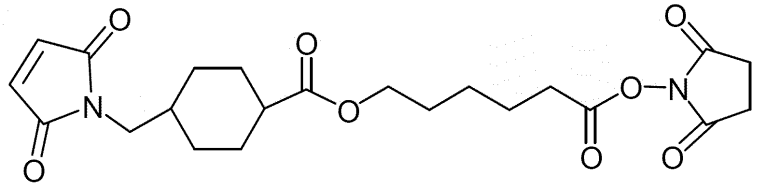
（式中、ｎは１～１０の範囲の整数であり、Ｔは－Ｈまたは－ＳＯ$_3$Ｎａである）；

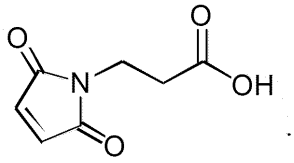


（式中、ｎは０～３の範囲の整数である）；


;

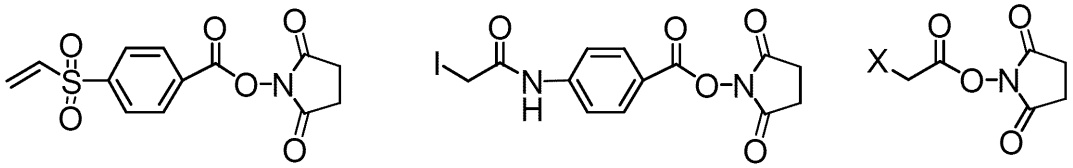

;

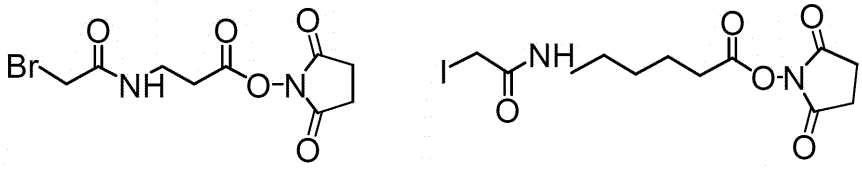

;および


.

【０５７９】

ストレッチャー単位は、以下の二官能性試薬をアミノ酸単位のＮ末端と反応させることによりリンカー中に導入され得る：

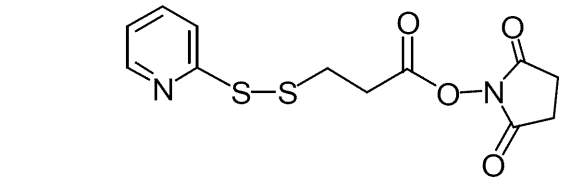


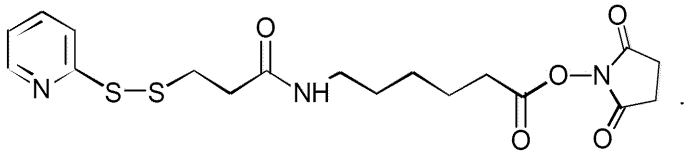


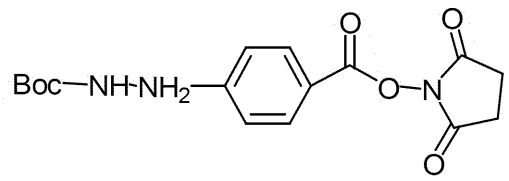
（式中、ＸはＢｒまたはＩである）。

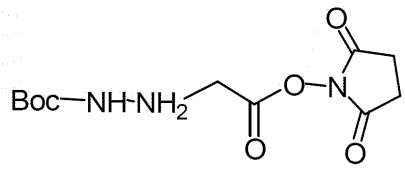
【０５８０】

式のストレッチャー単位は、以下の二官能性試薬をアミノ酸単位のＮ末端と反応させることによっても、リンカー中に導入され得る：



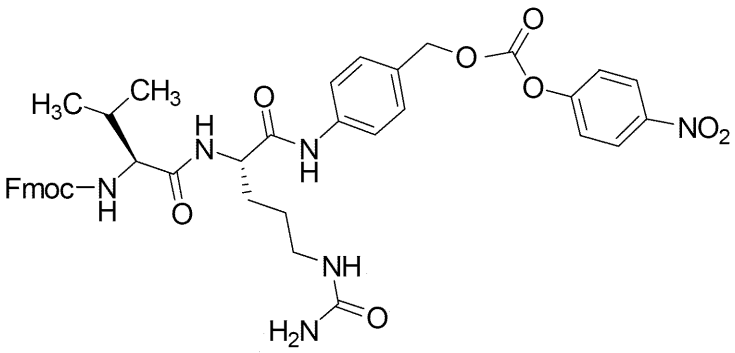






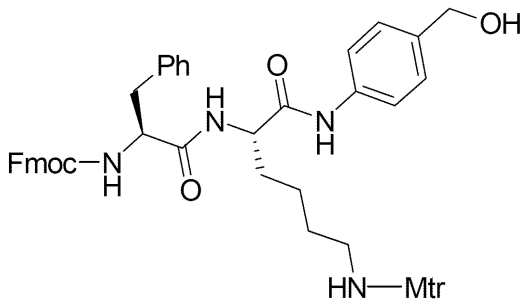
【０５８１】

マレイミドストレッチャーおよびパラ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）自壊的スペーサーを有する例となるバリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔまたはｖｃ）ジペプチドリンカー試薬は、以下の構造を有する：



【０５８２】

マレイミドストレッチャー単位およびＰＡＢ自壊的スペーサー単位を有する例となるｐｈｅ－ｌｙｓ（Ｍｔｒ、モノ－４－メトキシトリチル）ジペプチドリンカー試薬は、Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60に従って調製され得、以下の構造を有する：



【０５８３】

システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体－薬剤接合体の調製

式ＩのＡＤＣは、当業者に既知の有機化学反応、条件および試薬、例えば：（１）システイン操作された抗体のシステイン基とリンカー試薬を反応させて、共有結合により抗体－リンカー中間体Ａｂ－Ｌを形成し、その後、活性化薬剤部分と反応させること；ならびに（２）薬剤部分の求核性基をリンカー試薬と反応させて、共有結合により薬剤－リンカ

ー中間体Ｄ－Ｌを形成し、その後、システイン操作された抗体のシステイン基と反応させることを用いて、いくつかの経路により調製され得る。接合方法（１）および（２）は、種々のシステイン操作された抗体、薬剤部分およびリンカーとともに用いて、式Ｉの抗体－薬剤接合体を調製し得る。

【０５８４】

抗体システインチオール基は、求核性であり、リンカー試薬上の求電子性基および薬剤－リンカー中間体との共有結合、例えば：（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基；ならびに（ｉｖ）ジスルフィド、例えばピリジルジスルフィド（スルフィド交換による）を形成するよう反応し得る。薬剤部分上の求核性基としては、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性基と共有結合を形成するよう反応し得る以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジド基。

【０５８５】

システイン操作された抗体は、還元剤、例えばＤＴＴ（クレランド試薬、ジチオトレイトール）またはＴＣＥＰ（トリ（２－カルボキシエチル）ホスフィンヒドロクロリド；Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA）で処理し、その後、再酸化して、鎖間および鎖内ジスルフィド結合を再形成することによりリンカー試薬との接合のために反応性にされ得る（実施例５）。例えば、ＣＨＯ細胞中で発現される全長システイン操作されたモノクローナル抗体（チオＭａｂ）は、約５０倍モル過剰量のＴＣＥＰを用いて、３７℃で３時間還元されて、新規に導入されるシステイン残基と培地中に存在するシステインとの間に形成され得るシステイン付加物中のジスルフィド結合を還元する。還元チオＭａｂは、希釈され、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５中のＨｉＴｒａｐ　Ｓカラム上に載せられて、０．３Ｍ塩化ナトリウムを含有するＰＢＳで溶離される。ジスルフィド結合を、室温で一晩、希釈（２００ｎＭ）水性硫酸銅（$CuSO_4$）を用いて、親Ｍａｂ中に存在するシステイン残基間に再確立した。代替的には、デヒドロアスコルビン酸（ＤＨＡＡ）は、システイン付加物の還元的開裂後にシステイン操作された抗体の鎖内ジスルフィド基を再確立するための有効な酸化剤である。当該技術分野で既知の他の酸化剤すなわち酸化物質および酸化条件が、用いられ得る。周囲空気酸化も有効である。この低刺激性部分的再酸化工程は、高忠実度で効率的に鎖内ジスルフィドを形成し、そして新規に導入されるシステイン残基のチオール基を保存する。約１０倍過剰量の薬剤－リンカー中間体、例えばＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥが付加され、混合され、室温で約１時間静置されて、接合を実行し、抗ＦｃＲＨ５抗体－薬剤接合体を形成した。接合混合物は、ゲル濾過され、負荷され、ＨｉＴｒａｐ　Ｓカラムを通して溶離されて、過剰量の薬剤－リンカー中間体および他の不純物を除去した。

【０５８６】

接合のために細胞培養から発現されるシステイン操作された抗体を調製するための一般的工程を、以下に示す。細胞培地がシステインを含有する場合、ジスルフィド付加物は、新規導入システインアミノ酸と培地からのシステインとの間に形成され得る。例となるチオＭａｂで円として示されるこれらのシステイン付加物は、還元されて、接合に対して反応性であるシステイン操作された抗体を生成しなければならない。システイン付加物（おそらくは種々の鎖間ジスルフィド結合を伴う）は、還元剤、例えばＴＣＥＰを用いて還元的に開裂されて、還元型の抗体を生じる。対合システイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、ＤＨＡＡ、あるいは周囲酸素への曝露を用いて、部分酸化条件下で、再形成される。新規導入操作および非対合システイン残基は、本発明の抗体接合体を形成するためのリンカー試薬または薬剤－リンカー中間体との反応に依然として利用可能である。哺乳類細胞株中で発現されるチオＭａｂは、－Ｓ－Ｓ－結合形成により操作されたＣｙｓへの外部接合Ｃｙｓ付加物を生じる。それゆえ、精製チオＭａｂは還元および再酸化手順で

処理されて、反応性チオＭａｂを産生する。これらのチオＭａｂは、マレイミド含有細胞傷害性物質、蛍光体およびその他の標識と接合するために用いられる。

【０５８７】

１０．　免疫リポソーム

本明細書中に開示される抗ＦｃＲＨ５抗体は、免疫リポソームとしても処方され得る。「リポソーム」は、哺乳動物に薬剤を送達するために有用である種々の型の脂質、リン脂質および／または界面活性剤からなる小型小胞である。リポソームの構成成分は、一般に、生物学的膜の脂質配列と同様に、二重膜形成で配置される。抗体を含有するリポソームは、当該技術分野で既知の方法、例えばEpstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；米国特許第４，４８５，０４５号および第４，５４４，５４５号；およびＷＯ９７／３８７３１（１９９７年１０月２３日公開）に記載された方法により調製される。循環時間増大を示すリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０５８８】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発法により生成され得る。リポソームは、限定孔サイズのフィルターを通して押出されて、所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のＦａｂ’断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されたようなリポソームと接合され得る。化学療法薬は、任意に、リポソーム内に含有される（Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)参照）。

【０５８９】

Ｂ．　抗体製造のある種の方法

１．　所望の特性を有する抗ＦｃＲＨ５抗体のスクリーニング

ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合する抗体を生成するための技法を、上に説明した。さらに、所望される場合、ある種の生物学的特質を有する抗体を選択し得る。

【０５９０】

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体の増殖抑制作用は、当該技術分野で既知の方法により、例えば内因的に、またはＦｃＲＨ５遺伝子によるトランスフェクション後にＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現する細胞を用いて、査定され得る。例えば適切な腫瘍細胞株およびＦｃＲＨ５トランスフェクト化細胞は、種々の濃度の本発明の抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体で数日間（例えば、２～７日）、処理され、クリスタルバイオレットまたはＭＴＴで染色され、あるいはいくつかの他の比色検定により分析され得る。増殖を測定する別の方法は、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体の存在下または非存在下で処置された細胞による^{3}Ｈ－チミジン取込みを比較することによる。処理後、細胞は収穫され、ＤＮＡ中に組込まれた放射能の量が、シンチレーション計数器で定量される。適切な陽性対照は、その細胞株の増殖を抑制することが知られている増殖抑制抗体での選択細胞株の処理を包含する。in vivoでの腫瘍細胞の増殖抑制は、当該技術分野で既知の種々の方法で確定され得る。腫瘍細胞は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを過剰発現するものである。抗ＦｃＲＨ５抗体は、非処理腫瘍細胞と比較して、約２５～１００％、さらに好ましくは約３０～１００％、さらに好ましくは約５０～１００％または７０～１００％、一実施形態では、約０．５～３０μｇ／ｍｌの抗体濃度で、in vitroまたはin vivoでＦｃＲＨ５発現腫瘍細胞の細胞増殖を抑制する。増殖抑制は、細胞培養中に約０．５～３０μｇ／ｍｌまたは約０．５ｎＭ～２００ｎＭの抗体濃度で測定され得るが、この場合、増殖抑制は、抗体への腫瘍細胞の曝露後１～１０日目に測定される。約１μｇ／体重１ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇでの抗ＦｃＲＨ５抗体の投与が、抗体の最初の投与から約５日～３ヶ月以内、好ましくは約５～３０日以内に、腫瘍サイズの低減または腫瘍細胞増殖の低減を生じる場合、抗体はin vivoで増殖抑制性である。

【０５９１】

細胞死を誘導する抗ＦｃＲＨ５抗体に関して選択するために、例えばヨウ化プロピジウ

ム（ＰＩ）、トリパンブルーまたは７ＡＡＤ取込みにより示されるような膜完全性の損失が、対照に比して査定され得る。ＰＩ取込み検定は、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で実施され得る。ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現腫瘍細胞は、培地単独と、あるいは適切な抗ＦｃＲＨ５抗体（例えば、約１０μｇ／ｍｌで）を含有する培地とともにインキュベートされる。細胞は、３日間、インキュベートされる。各処理後、細胞は洗浄され、細胞凝集塊の除去のために、３５ｍｍ濾し蓋付き１２×７５管中にアリコート化（１ｍｌ／管、３管／処置群）する。次いで、管に、ＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を入れる。試料は、ＦＡＣＳＣＡＮ（登録商標）フローサイトメトリーおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（登録商標）ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Becton Dickinson）を用いて分析され得る。ＰＩ取込みにより確定されるような統計学的有意レベルの細胞死を誘導する抗ＦｃＲＨ５抗体は、細胞死誘導性抗ＦｃＲＨ５抗体として選択され得る。

【０５９２】

当該抗体により結合されるＦｃＲＨ５ポリペプチド上のエピトープと結合する抗体に関してスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような慣例的交差遮断検定が実施され得る。この検定は、試験抗体が、既知の抗ＦｃＲＨ５抗体と同一部位で結合するか、エピトープで結合するかを確定するために用いられ得る。代替的には、または付加的には、エピトープマッピングが、当該技術分野で既知の方法により実施され得る。例えば、抗体配列は、例えばアラニンスキャニングにより突然変異化されて、接触残基を特定し得る。突然変異体抗体は、最初に、ポリクローナル抗体との結合に関して試験されて、適正なフォールディングを保証する。異なる方法では、ＦｃＲＨ５ポリペプチドの異なる領域に対応するペプチドが、試験抗体との、または試験抗体および特性化または既知のエピトープを有する抗体との競合検定で用いられ得る。

【０５９３】

２．　ある種のライブラリースクリーニング方法

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、所望の単数または複数の活性を有する抗体に関してスクリーニングするための組合せライブラリーを用いることにより、作製され得る。例えば、ファージ表示ライブラリーを生成し、所望の結合特質を保有する抗体に関してこのようなライブラリーをスクリーニングするための、種々の方法が当該技術分野で知られている。このような方法は、Hoogenboom et al. (2001) in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ)に一般的に、ならびにある実施形態では、Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093に記載されている。

【０５９４】

原則として、合成抗体クローンは、ファージ外殻タンパク質と融合された抗体可変領域の種々の断片（Ｆｖ）を表示するファージを含有するファージライブラリーをスクリーンすることにより選択される。このようなファージライブラリーは、所望の抗原に対してアフィニティークロマトグラフィーによりパニングされる。所望の抗原と結合することができるＦｖ断片を発現するクローンは、抗原に吸着され、したがって、ライブラリー中の非結合クローンから分離される。結合クローンは、次に、抗原から溶離され、抗原吸着／溶離の追加のサイクルによりさらに濃化され得る。当該ファージクローンに関して選択するための適切な抗原スクリーニング手法を設計し、その後、当該ファージクローンからのＦｖ配列ならびにKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載された適切な定常領域（Ｆｃ）配列を用いて、全長抗ＦｃＲＨ５抗体クローンを構築することにより、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体のいずれかが得られる。

【０５９５】

ある実施形態では、抗体の抗原結合ドメインは、３つの超可変ループ（ＨＶＲ）または相補性決定領域（ＣＤＲ）をともに示す、各々、軽鎖（ＶＬ）および重鎖（ＶＨ）からの、約１１０アミノ酸の２つの可変（Ｖ）領域から形成される。可変ドメインは、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片（ＶＨおよびＶＬは短い、可動性ペプチドを介して共有結合される）

として、またはＦａｂ断片（各々、定常ドメインと融合され、非共有的に相互作用する）として、ファージ上に機能的に表示され得る（Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載）。本明細書中で用いる場合、ｓｃＦｖコードファージクローンおよびＦａｂコードファージクローンは、集合的に、「Ｆｖファージクローン」または「Ｆｖクローン」として言及される。

【０５９６】

ＶＨおよびＶＬ遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により別個にクローン化され、ファージライブラリー中で無作為に再び組合せられ、これは次に、抗原結合クローンに関して検索される（Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載）。免疫化供給源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に高親和性抗体を提供する。代替的には、ナイーブレパートリーがクローン化されて、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)に記載されたような如何なる免疫化も伴わずに、ヒト抗体の単一供給源を、広範囲の非自己抗原に、そして自己抗原にも提供する。最後に、ナイーブライブラリーは、幹細胞からの非整列Ｖ遺伝子セグメントをクローニングすることにより、そして無作為配列を含有するＰＣＲプライマーを用いて高度可変ＣＤＲ３領域をコードし、in vitroでの再整列を成し遂げることによっても、合成的に作製され得る（Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)記載）。

【０５９７】

ある実施形態では、小外殻タンパク質ｐＩＩＩとの融合により抗体断片を表示するために、糸状ファージが用いられる。抗体断片は一本鎖Ｆｖ断片として表示され、この場合、ＶＨおよびＶＬドメインは、可動性ポリペプチドスペーサーにより（例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載）、またはＦａｂ断片として、同一ポリペプチド上に連結され、この場合、一方の鎖はｐＩＩＩと融合され、他方は宿主細胞周縁質中に分泌され、ここで、Ｆａｂ－外殻タンパク質構造の集合体は、野生型タンパク質のいくつかを置き換えることによりファージ表面に表示されるようになる（例えばHoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)に記載）。

【０５９８】

概して、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒトまたは動物から採取された免疫細胞から得られる。抗ＦｃＲＨ５クローンに有利に偏向されたライブラリーが所望される場合、対象はＦｃＲＨ５で免疫化されて抗体応答を生じ、そして脾臓細胞および／または循環Ｂ細胞または末梢血リンパ球（ＰＢＬ）がライブラリー構築のために回収される。好ましい実施形態では、ＦｃＲＨ５免疫化がＦｃＲＨ５に対するヒト抗体を産生するＢ細胞を生じるよう、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを保有する（そして機能的内因性抗体産生系を欠く）トランスジェニックマウスにおいて抗ＦｃＲＨ５抗体応答を生じさせることにより、抗ＦｃＲＨ５クローンに有利に偏向されたヒト抗体遺伝子断片ライブラリーが得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの生成は、以下に記載される。

【０５９９】

抗ＦｃＲＨ５反応性細胞集団に関する付加的濃化は、例えば、ＦｃＲＨ５アフィニティークロマトグラフィーを用いる細胞分離により、または蛍光色素標識ＦｃＲＨ５への細胞の吸着とその後の流動活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）により、ＦｃＲＨ５特異的膜結合抗体を発現するＢ細胞を単離するための適切なスクリーニング手法を用いることにより得られる。

【０６００】

代替的には、非免疫化ドナーからの脾臓細胞および／またはＢ細胞または他のＰＢＬの使用は、可能性のある抗体レパートリーのより良好な提示を提供し、そしてＦｃＲＨ５が抗原性でない任意の動物（ヒトまたは非ヒト）種を用いた抗体ライブラリーの構築も可能にする。抗体遺伝子構築をin vitroで組入れるライブラリーに関して、幹細胞が対象から採取されて、非整列抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象となる免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、オオカミ、イヌ、ネコ、

ブタ、ウシ、ウマおよび鳥類種から得られる。

【０６０１】

抗体可変遺伝子セグメント（例えば、ＶＨおよびＶＬセグメント）をコードする核酸は、当該細胞から回収され、増幅される。再整列ＶＨおよびＶＬ遺伝子ライブラリーの場合、リンパ球からゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡを単離し、その後、Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されるような再整列ＶＨおよびＶＬ遺伝子の５’および３’末端と整合するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に付して、それにより発現のための多様なＶ遺伝子レパートリーを作製することにより、所望のＤＮＡが得られる。Ｖ遺伝子は、成熟Ｖドメインをコードするエキソンの５’末端に逆向プライマーを、そしてＪ－セグメント内に順向プライマーを有する、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡから増幅される（Orlandi et al. (1989)に、そしてWard et al., Nature, 341: 544-546 (1989)に記載）。しかしながら、ｃＤＮＡからの増幅のためには、逆向プライマーは、リーダーエキソン中（Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)）、ならびに順向プライマーは定常領域中（Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)）にも置かれ得る。相補性を最大にするために、縮重がプライマー中に組入れられ得る（Orlandi et al. (1989)またはSastry et al. (1989)に記載）。ある実施形態では、免疫細胞核酸試料中に存在する全ての利用可能なＶＨおよびＶＬ整列を増幅するために、各Ｖ遺伝子ファミリーに対して標的化されるＰＣＲプライマーを用いることにより、ライブラリー多様性は最大化される（Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)の方法に記載、またはOrum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)の方法に記載）。発現ベクター中に増幅ＤＮＡをクローニングするために、一端にタグとしてＰＣＲプライマー内に（Orlandi et al. (1989)）、あるいはタグ化プライマーによるさらなるＰＣＲ増幅により（Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)）、稀少な制限部位が導入され得る。

【０６０２】

合成的に再整列されるＶ遺伝子のレパートリーは、Ｖ遺伝子セグメントからin vitroで得られる。ヒトＶＨ遺伝子セグメントのほとんどは、クローン化され、配列決定され（Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)で報告されている）、そしてマッピングされている（Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)で報告されている）；これらのクローン化セグメント（Ｈ１およびＨ２ループの主要立体配座を全て含む）を用いて、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるような多様な配列および長さのＨ３ループをコードするＰＣＲプライマーを有する多様なＶＨ遺伝子レパートリーを生成し得る。ＶＨレパートリーは、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)に記載されるような単一長の長いＨ３ループに集中される全ての配列多様性を有しても作製される得る。ヒトＶκおよびＶλセグメントは、クローン化され、配列決定されており（Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)で報告された）、合成軽鎖レパートリーを作製するために用いられ得る。一連のＶＨおよびＶＬフォールドならびにＬ３およびＨ３長に基づいた合成Ｖ遺伝子レパートリーは、かなりの構造的多様性を有する抗体をコードする。Ｖ遺伝子コードＤＮＡの増幅後、生殖系列Ｖ遺伝子セグメントは、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)の方法に従ってin vitroで再整列され得る。

【０６０３】

抗体断片のレパートリーは、ＶＨおよびＶＬ遺伝子レパートリーをいくつかの方法で一緒に組合せることにより構築され得る。各レパートリーは異なるベクター中に作製され、ベクターは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで（例えばHografe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)に記載）、または組合せ感染によりin vivoで（例えば、Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)に記載されたｌｏｘＰ系）、組換えられ得る。in vivo組合せアプローチは、Ｆａｂ断片の二鎖性を利用して、大腸菌形質転換効率により課せられるライブラリーサイズの限界を克服する。ナイーブＶＨおよびＶＬレパートリーは、一方はファージミドに、他方はファージベクター中に、別個にクローン化される。次に、各細

胞が異なる組合せを含有し、ライブラリーサイズが存在する細胞の数（約10^{12}クローン）によってのみ限定されるよう、２つのライブラリーは、ファージミド含有細菌のファージ感染により組合される。ＶＨおよびＶＬ遺伝子が単一レプリコン上で組換えられ、ファージビリオン中に同時パッケージングされるよう、ベクターはともに、in vivoで組換えシグナルを含有する。これらの巨大ライブラリーは、良好な親和力（約10^{-8}ＭのK_d^{-1}）を有する多数の多様な抗体を提供する。

【０６０４】

代替的には、レパートリーは、同一ベクター中で順次クローン化される（例えばBarbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載）か、あるいはＰＣＲにより一緒に集合され、次いでクローン化される（例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)に記載）。ＰＣＲアセンブリーは、ＶＨおよびＶＬ　ＤＮＡを、可動性ペプチドスペーサーをコードするＤＮＡと連結して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）レパートリーを形成するためにも用いられ得る。さらに別の技法では、「細胞内ＰＣＲアセンブリー」が、ＰＣＲによりリンパ球内のＶＨおよびＶＬ遺伝子を、次いで、連結遺伝子のクローンレパートリーを組合せるために用いられる（Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)に記載）。

【０６０５】

ナイーブライブラリー（天然または合成）により産生される抗体は、中等度の親和力（約10^{6}～$10^{7}$$M^{-1}$の$K_d^{-1}$）を有するが、しかし親和性成熟も、第二ライブラリーから構築し、再選択することによりin vitroで模倣され得る（Winter et al. (1994)（上記）に記載）。例えば、突然変異は、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)の方法において、またはGram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)の方法において、誤りがちなポリメラーゼ（Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)で報告されている）を用いることにより、in vitroで無作為に導入され得る。さらに、親和性成熟は、１つ以上のＣＤＲを無作為に突然変異化することにより、例えば、選択個々のＦｖクローンにおいて、当該ＣＤＲをスパニングする無作為配列を保有するプライマーを伴うＰＣＲを用い、そしてより高い親和性クローンに関してスクリーニングすることにより、実施され得る。ＷＯ　９６０７７５４（１９９６年3月１４日公開）は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域における突然変異誘発を誘導して、軽鎖遺伝子のライブラリーを作製するための方法を記載した。別の有効なアプローチは、非免疫化ドナーから得られる天然Ｖドメイン変異体のレパートリーを用いてファージ表示により選択されるＶＨまたはＶＬドメインを組換えて、数回の鎖再シャッフリングにおいて、より高い親和性に関してスクリーニングすることである（Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載）。この技法は、約10^{-9}Ｍ以下の親和力を有する抗体および抗体断片の産生を可能にする。

【０６０６】

ライブラリーのスクリーニングは、当該技術分野で既知の種々の技法により成し遂げられ得る。例えば、ＦｃＲＨ５は、吸着プレートのウェルを被覆するために用いられ、吸着プレートに固着される宿主細胞上で発現され、または細胞選別に用いられ、あるいはストレプトアビジン被覆ビーズで捕捉するためにビオチンに接合され得るし、あるいはファージ表示ライブラリーをパニングするための任意の他の方法に用いられ得る。

【０６０７】

ファージライブラリー標本は、ファージ粒子の少なくとも一部を吸着剤と結合するのに適した条件下で、固定化ＦｃＲＨ５と接触される。通常、ｐＨ、イオン強度、温度等を含めた条件は、生理学的条件を模倣するよう選択される。固相と結合されるファージは、洗浄され、次いで、酸により（例えば、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載）、またはアルカリにより（例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載）、またはＦｃＲＨ５抗原競合により（例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)の抗原競合法と類似の手法で）、溶離される。ファージは、単一回の選択で２０～１０００倍濃化され得る。さらに、濃化ファ

ージは、細菌培養中で増殖され、さらなる回数の選択に付される。

【０６０８】

選択の効率は、洗浄中の解離の動力学、ならびに単一ファージ上の多数の抗体が同時に抗原と結合い得るか否か、を含めた多数の因子に依っている。迅速解離動力学（および弱い結合親和力）を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージ表示、ならびに固相中の抗原の高被覆密度の使用により保持され得る。高密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離されたファージの再結合を助ける。遅い解離動力学（および良好な結合親和力）を有する抗体の選択は、長時間洗浄および一価ファージ表示（Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)に、およびＷＯ　９２／０９６９に記載）、ならびに抗原の低被覆密度（Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載）の使用により促進され得る。

【０６０９】

ＦｃＲＨ５に関してわずかに異なる親和性でも、異なる親和性を有するファージ抗体間で選択することが可能である。しかしながら、選択抗体の無作為突然変異（例えば、いくつかの親和性成熟技法で実施される）は、多数の突然変異体、抗原とのほとんどの結合、およびより高い親和力を有する２～３のものを生じると思われる。ＦｃＲＨ５を制限すると、稀少な高親和性ファージは完全に競合され得る。全ての高親和性突然変異体を保持するために、ファージは過剰量のビオチニル化ＦｃＲＨ５とともにインキュベートされ得るが、しかしビオチニル化ＦｃＲＨ５の濃度はＦｃＲＨ５に関する標的モル親和性定数より低いモル数である。次いで、高親和性結合ファージは、ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズにより捕捉され得る。このような「平衡捕捉」は、それらの結合親和力に従って抗体を選択させ、感度は、低親和性を有する大過剰量のファージから２倍高いだけの親和性を有する突然変異体クローンの単離を可能にする感度である。固相に結合されたファージを洗浄するのに用いられる条件は、さらにまた、解離動力学に基づいて識別するよう操作され得る。

【０６１０】

抗ＦｃＲＨ５クローンは、活性に基づいて選択され得る。ある実施形態では、本発明は、天然でＦｃＲＨ５を発現する生きている細胞と結合する抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、ＦｃＲＨ５リガンドとＦｃＲＨ５との間の結合を遮断するが、しかしＦｃＲＨ５リガンドと第二タンパク質との間の結合を遮断しない抗ＦｃＲＨ５抗体を提供する。このような抗ＦｃＲＨ５抗体に対応するＦｖクローンは、（１）上記のようにファージライブラリーから抗ＦｃＲＨ５クローンを単離すること、任意に、適切な細菌宿主中の集団を増殖させることによりファージクローンの単離集団を増幅すること；（２）それぞれ活性の遮断および非遮断が望ましいＦｃＲＨ５および第二タンパク質を選択すること；（３）抗ＦｃＲＨ５ファージクローンを吸着して、ＦｃＲＨ５を固定化すること；（４）過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と重複するかまたは共有されるＦｃＲＨ５結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶離すること；ならびに（５）ステップ（４）後に吸着されたままであるクローンを溶離することにより選択され得る。任意に、所望の遮断／非遮断特性を有するクローンはさらに、本明細書中に記載される選択手順を１回以上反復することにより、濃化され得る。

【０６１１】

本発明のハイブリドーマ由来モノクローナル抗体またはファージ表示ＦｖクローンをコードするＤＮＡは、慣用的手法を用いて（例えば、ハイブリドーマまたはファージＤＮＡ鋳型から当該重鎖および軽鎖コード領域を特異的に増幅するよう意図されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより）、容易に単離され、配列決定される。一旦単離されると、ＤＮＡは発現ベクター中に入れられ、これは次に、別の状況では免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えば大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または骨髄腫細胞中でトランスフェクトされて、組換え宿主細胞中での所望のモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードするＤＮＡの細菌中での組換え発現に関する検討文献としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol.,

5:256 (1993) および Pluckthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)が挙げられる。

【０６１２】

本発明のＦｖクローンをコードするＤＮＡは、重鎖および／または軽鎖定常領域をコードする既知のＤＮＡ配列と組合されて（例えば、適切なＤＮＡ配列は、Kabat et al（上記）から得られる）、完全または部分長重鎖および／または軽鎖をコードするクローンを形成し得る。任意のアイソタイプの定常領域、例えばＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥ定常領域はこの目的のために用いられ得る、そしてこのような定常領域は任意のヒトまたは動物種から得られることが理解される。一動物（例えばヒト）種の可変ドメインＤＮＡから得られ、次いで、別の動物種の定常領域ＤＮＡと融合されて、「ハイブリッド」全長重鎖および／または軽鎖に関するコード配列（単数または複数）を形成するＦｖクローンは、本明細書中で用いられるような「キメラ」および「ハイブリッド」の定義に含まれる。ある実施形態では、ヒト可変ＤＮＡに由来するＦｖクローンは、ヒト定常領域ＤＮＡと融合されて、全長または部分長ヒト重鎖および／または軽鎖に関するコード配列（単数または複数）を形成する。

【０６１３】

ハイブリドーマに由来する抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡは、例えば、ハイブリドーマクローンから得られる相同ネズミ配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常領域のコード配列を置き換えることによっても修飾され得る（例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)の方法）。ハイブリドーマーまたはＦｖクローン由来の抗体または断片をコードするＤＮＡはさらに、非免疫グロブリンポリペプチドに関するコード配列の全部または一部である免疫グロブリンコード配列との共有結合により、修飾され得る。このようにして、本発明のＦｖクローンまたはハイブリッドクローン由来抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【０６１４】

Ｃ．　抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法（ＡＤＥＰＴ）

プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法薬、ＷＯ　８１／０１１４５参照）を活性抗癌薬に転化するプロドラッグ活性化酵素と抗体を接合することにより、本発明の抗体はＡＤＥＰＴにも用いられ得る（例えば、ＷＯ　８８／０７３７８および米国特許第４，９７５，２７８号参照）。

【０６１５】

ＡＤＥＰＴに有用な免疫接合体の酵素構成成分としては、それをそのより活性な細胞傷害形態に転化するような方法でプロドラッグに作用し得る任意の酵素が挙げられる。

【０６１６】

本発明の方法に有用である酵素としては、アルカリ性ホスファターゼ（これは、ホスフェート含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；アリールスルファターゼ（スルフェート含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；シトシンデアミナーゼ（非毒性５－フルオロシトシンを抗癌薬、５フルオロウラシルに転化するために有用である）；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（例えば、カテプシンＢおよびＬ）（ペプチド含有プロドラッグを遊離薬剤に転化するために有用である）；Ｄ－アラニルカルボキシペプチダーゼ（Ｄ－アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを転化するために有用である）；炭水化物開裂酵素、例えばβ－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ（グリコシル化プロドラッグを遊離プロドラッグに転化するために有用である）；β－ラクタマーゼ（β－ラクタムで誘導体化される薬剤を遊離薬剤に転化するために有用である）；ならびにペニシリンアミダーゼ、例えばペニシリンＶアミダーゼおよびペニシリンＧアミダーゼ（それぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基によりそれらのアミン窒素で誘導体化される薬剤を遊離薬剤に転化するために有用である）が挙げられるが、これらに限定されない。代替的には、酵素活性を有する抗体（「アブザイム」としても当該技術分野で知れらている）は、本発明のプロドラッグを遊離活性薬剤に転化するために用いられ得る（例えば、Massey, Nature 328:457-458 (1987)参照）。抗体－アブザイム接

合体は、腫瘍細胞集団にアブザイムを送達するために、本明細書中に記載されるように調製され得る。

【０６１７】

本発明の酵素は、当該技術分野で周知の技法により、例えば上記のヘテロ二官能性架橋試薬を用いて、抗ＦｃＲＨ５抗体と共有結合され得る。代替的には、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分と連結された本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該技術分野で周知の組換えＤＮＡ技法を用いて構築され得る（例えば、Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)参照）。

【０６１８】

Ｄ．　抗ＦｃＲＨ５抗体

本明細書中に記載される抗ＦｃＲＨ５抗体のほかに、抗ＦｃＲＨ５抗体変異体が調製され得る、ということが意図される。抗ＦｃＲＨ５抗体変異体は、適切なヌクレオチド変化をコードＤＮＡ中に導入することにより、および／または所望の抗体またはポリペプチドの合成により、調製され得る。アミノ酸変化は抗ＦｃＲＨ５抗体の翻訳後プロセスを変更し得る、例えば、グリコシル化部位の数または位置を変える、あるいは膜固着特質を変更することを当業者は理解する。

【０６１９】

本明細書中に記載される抗ＦｃＲＨ５抗体における変異は、例えば米国特許第５，３６４，９３４号に記述された保存的および非保存的突然変異に関する技法および指針のいずれかを用いて作製され得る。変異は、ネイティブ配列抗体またはポリペプチドと比較した場合にアミノ酸配列における変化を生じる抗体またはポリペプチドをコードする１つ以上のコドンの置換、欠失または挿入であり得る。任意に、変異は、抗ＦｃＲＨ５抗体のドメインのうちの１つ以上における、任意の他のアミノ酸による少なくとも１つのアミノ酸の置換による。所望の活性に悪影響を及ぼさずに、どのアミノ酸残基が挿入され、置換され、または欠失され得るかを決定するに際しての指針は、抗ＦｃＲＨ５抗体の配列を、同種のの既知のタンパク質分子のものと比較し、高相同性を有する領域でなされるアミノ酸配列変化の数を最小限にすることにより見出され得る。アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、類似の構造的および／または化学的特性を有する別のアミノ酸に置き換える、例えばロイシンをセリンに置換する、すなわち保存的アミノ酸置換の結果であり得る。挿入または欠失は、任意に、約１～５つのアミノ酸の範囲であり得る。可能にされる変異は、配列中のアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的に作製し、その結果生じる変異体を、全長または成熟ネイティブ配列により示される活性に関して試験することにより決定され得る。

【０６２０】

抗ＦｃＲＨ５抗体断片が、本明細書中で提供される。このような断片は、Ｎ末端またはＣ末端で切頭化され得るか、あるいはっト、全長ネイティブ抗体またはタンパク質と比較した場合、内部残基を欠き得る。ある断片は、抗ＦｃＲＨ５抗体の所望の生物学的活性に不可欠でないアミノ酸残基を欠く。

【０６２１】

抗ＦｃＲＨ５抗体断片は、多数の慣用的技法のうちのいずれかにより調製され得る。所望のペプチド断片は、化学的に合成され得る。代替的一アプローチは、酵素的消化により、例えば特定のアミノ酸残基により限定される部位でタンパク質を切断することが既知である酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適切な制限酵素でＤＮＡを消化し、所望の断片を単離することにより、抗体またはポリペプチド断片を生成することを包含する。さらに別の適切な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、所望の抗体またはポリペプチド断片をコードするＤＮＡ断片を単離し、増幅することを包含する。ＤＮＡ断片の所望の末端を限定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲにおける５’および３’末端に用いられる。好ましくは、抗ＦｃＲＨ５抗体断片は、本明細書中に開示されるネイティブ抗ＦｃＲＨ５抗体と少なくとも１つの生物学的および／または免疫学的活性を共有する。

【０６２２】

特定の実施形態では、当該保存的置換は、好ましい置換の見出し下で、表８に示される。このような置換が生物学的活性の変化を生じる場合には、表８で例となる置換と呼ばれる、あるいはアミノ酸クラスに関して以下でさらに説明される、より実質的な変化が導入され、生成物がスクリーニングされる。

表 8

元の残基	例となる置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	
Asp (D)	glu	
Cys (C)	ser	
Gln (Q)	asn	
Glu (E)	asp	
Gly (G)	pro; ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; orleucine	
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	
Met (M)	leu; phe; ile	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	
Trp (W)	tyr; phe	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	

【０６２３】

抗ＦｃＲＨ５抗体の機能または免疫学的同一性における実質的修飾は、（ａ）例えば、シートまたは螺旋立体配座のような置換の領域におけるポリペプチド主鎖の構造、（ｂ）標的部位での分子の電荷または疎水性、あるいは（ｃ）側鎖の大部分を保持するのに及ぼすそれらの作用が有意に異なる置換を選択することにより成し遂げられる。天然残基は、共通の側鎖特性に基づいた群に分けられる：

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；

（２）中性疎水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；

（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；

（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；

（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；ならびに

（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０６２４】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つの一成員を別のクラスのものに交換するということを引き起こす。このような置換残基は、保存的置換部位に、さらに好ましくは残りの（非保存）部位にも導入され得る。

【０６２５】

変異は、当該技術分野で既知の方法を用いて、例えばオリゴヌクレオチド媒介性（部位特異的）突然変異誘導、アラニンスキャニング、およびＰＣＲ突然変異誘発によりなされ得る。部位特異的突然変異誘発［Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986)；Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells et al., Gene, 34:315 (1985)］、制限選択突然変異誘発［Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)］あるいは他の既知の技法は、クローン化ＤＮＡ上で実施されて、抗ＦｃＲＨ５抗体変異体ＤＮＡを産生し得る。

【０６２６】

スキャニングアミノ酸分析は、連続配列に沿う１つ以上のアミノ酸を特定するためにも用いられ得る。好ましいスキャニングアミノ酸は、相対的に小さく、中性のアミノ酸である。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが挙げられる。β－炭素以上に側鎖を排除し、変異体の主鎖立体配座を余り変更しないと思われるため、アラニンは、典型的には、この群の間で好ましいスキャニングアミノ酸である［Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)］。アラニンは、さらにまた、最も一般的なアミノ酸であるため、典型的には選択される。さらに、それは、埋没および露呈位置の両方で高頻度に見出される［Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)］。アラニン置換が適量の変異体を生じない場合、等配電子体的アミノ酸が用いられ得る。

【０６２７】

抗ＦｃＲＨ５抗体の適性立体配座を保持するのに関与しない任意のシステインも、一般的にセリンで置換されて、分子の参加的安定性を改良し、異所性架橋を防止し得る。逆に、システイン結合（単数または複数）は、抗ＦｃＲＨ５抗体に付加されて、その安定性を改良し得る（特に、抗体が抗体断片、例えばＦｖ断片である場合）。

【０６２８】

特に好ましい型の置換性変異体は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の１つ以上の超可変領域残基を置換することを包含する。一般的に、さらなる開発のために選択された結果的に生じる変異体（単数または複数）は、それらが生成される親抗体に比して、改良された生物学的特性を有する。このような置換性変異体を生成するための好都合な方法は、ファージ表示を用いる親和性成熟を包含する。簡潔に述べると、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７部位）が、各部位での全ての考え得るアミノ置換を生じるよう突然変異化される。このように生成される抗体変異体は、各粒子内にパッケージされるＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物との融合体として、糸状ファージ粒子から多価方式で表示される。ファージ表示変異体は、次に、本明細書中に開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）に関してスクリーニングされる。修飾に関して候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発が実施されて、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を特定し得る。代替的には、または付加的には、抗原－抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体およびＦｃＲＨ５ポリペプチド間の接触点を特定することが有益である。このような接触残基および隣接残基は、本明細書中で遂行される技法による置換のための候補である。このような変異体が一旦生成されると、変異体のパネルは本明細書中に記載されるようなスクリーニングに付されて、１つ以上の関連検定における優位の特性を有する抗体が、さらなる開発のために選択され得る。

【０６２９】

抗ＦｃＲＨ５抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該技術分野で既知の種々の方法により調製される。これらの方法としては、天然供給源からの単離（天然アミノ酸配列変異体の場合）、ならびにオリゴヌクレオチド媒介性（または部位特異的）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、および抗ＦｃＲＨ５抗体の早期調製変異体または非変異体バージョンのカセット突然変異誘発による調製が挙げられるが、これらに限定されない。

【０６３０】

Ｅ．　抗ＦｃＲＨ５抗体の修飾

抗ＦｃＲＨ５抗体の共有的修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有的修飾の一型は、抗ＦｃＲＨ５抗体の標的化アミノ酸残基を、抗ＦｃＲＨ５抗体の選択側鎖あるいはＮ－またはＣ末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることを包含する。二官能性作用物質による誘導体化は、例えば、抗ＦｃＲＨ５抗体を、抗ＦｃＲＨ５抗体を精製するための方法に用いるための水不溶性支持マトリックスまたは表面に架橋する（その逆も）ために有用である。一般に用いられる架橋剤としては、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば４－アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル、例えば、ジスクシンイミジルエステル、例えば３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）、二官能性マレイミド、例えばビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンおよびメチル－３－［（ｐ－アジドフェニル）ジチオ］プロピオイミデートのような作用物質が挙げられる。

【０６３１】

他の修飾としては、対応するグルタミルおよびアスパルチル残基へのそれぞれグルタミニルおよびアスパラギニル残基の脱アミド化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化［T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)］、Ｎ末端アミンのアセチル化、ならびに任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０６３２】

本発明の範囲内に含まれる抗ＦｃＲＨ５抗体の別の型の共有的修飾は、抗体またはポリペプチドのネイティブグリコシル化パターンを変更することを包含する。「ネイティブグリコシル化パターンを変更すること」は、ネイティブ配列抗ＦｃＲＨ５抗体中に見出される１つ以上の炭水化物を欠失すること（基本的グリコシル化部位を除去することによるかまたは化学的および／または酵素的手段によりグリコシル化を欠失することによる）、および／またはネイティブ配列抗ＦｃＲＨ５抗体中に存在しない１つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味するよう、本明細書中の目的のために意図される。さらに、その語句は、存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変化を含めたネイティブタンパク質のグリコシル化における定量的変化を包含する。

【０６３３】

抗体およびその他のポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、Ｎ連結またはＯ連結である。Ｎ連結は、炭水化物部分とアスパラギン残基の側鎖との結合を指す。トリペプチド配列　アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニン（ここで、Ｘはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分とアスパラギン側鎖との酵素的結合に関する認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列の存在は、潜在的グリコシル化部位を作り出す。Ｏ連結グリコシル化は、糖Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうちの１つとヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンとの結合を指すが、しかし５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリシンも用いられ得る。

【０６３４】

抗ＦｃＲＨ５抗体へのグリコシル化部位の付加は、（Ｎ連結グリコシル化部位に関して）上記トリペプチド配列のうちの１つ以上を含有するよう、アミノ酸配列を変更することにより好都合に成し遂げられる。変更は、（Ｏ連結グリコシル化部位に関して）元の抗ＦｃＲＨ５抗体の配列に対する１つ以上のセリンまたはトレオニン残基による付加または置換によってもなされ得る。抗ＦｃＲＨ５抗体アミノ酸配列は、任意に、ＤＮＡレベルでの変化を通して、特に、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成されるよう、予め選択された塩基で抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡを突然変異化することにより、変更され得る。

【０６３５】

抗ＦｃＲＨ５抗体上の炭水化物部分の数を増大する別の手段は、グリコシドとポリペプ

チドとの化学的または酵素的カップリングによる。このような方法は、当該技術分野で、例えばＷＯ　８７／０５３３０（１９８７年９月１１日公開)に、およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【０６３６】

抗ＦｃＲＨ５抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的にまたは酵素的に、あるいはグリコシル化のための標的として役立つアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異的置換により、成し遂げられ得る。化学的脱グリコシル化技法は、当該技術分野で知られており、例えば、Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、ならびにEdge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、種々のエンドーおよびエキソーグリコシダーゼの使用により達成され得る（Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987)に記載）。

【０６３７】

抗ＦｃＲＨ５抗体の別の型の共有的修飾は、抗体を、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのうちの１つと連結することを包含する（米国特許第４，６４０，８３５号；第４，４９６，６８９号；第４，３０１，１４４号；第４，６７０，４１７号；第４，７９１，１９２号または第４，１７９，３３７号に記載）。抗体は、例えば、コアセルベーション技法によりまたは界面重合により、調製されるマイクロカプセル中に（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンーマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド薬剤送達系中に（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）、あるいはマクロエマルション中にも包括され得る。このような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

【０６３８】

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、別の非相同ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合される抗ＦｃＲＨ５抗体を含むキメラ分子を形成する方法でも修飾され得る。

【０６３９】

一実施形態では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの抗ＦｃＲＨ５抗体の融合体を含む。エピトープタグは、一般的に、抗ＦｃＲＨ５抗体のアミノーまたはカルボキシル末端に配置される。このようなエピトープタグ化形態の抗ＦｃＲＨ５抗体は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出され得る。さらにまた、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体またはエピトープタグと結合する別の型の親和性マトリックスを用いるアフィニティー精製により、抗ＦｃＲＨ５抗体を容易に精製させる。種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は、当該技術分野で周知である。例としては、ポリーヒスチジン（ポリーｈｉｓ）またはポリーヒスチジンーグリシン（ポリーｈｉｓーｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ　ＨＡタグポリペプチドおよびその抗体　１２ＣＡ５[Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；ｃーｍｙｃタグならびにそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７および９Ｅ１０抗体[Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグおよびその抗体[Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Ｆｌａｇーペプチド[Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；ＫＴ３エピトープペプチド[Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]；αーチューブリンエピトープペプチド[Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；およびＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]が挙げられる。

【０６４０】

代替的実施形態では、キメラ分子は、抗ＦｃＲＨ５抗体と免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域との融合を含み得る。二価形態のキメラ分子（「免疫アドヘシン」と

しても言及される）に関して、このような融合は、ＩｇＧ分子のＦｃ領域に対してであり得る。Ｉｇ融合は、好ましくは、Ｉｇ分子内の少なくとも１つの可変領域の代わりの可溶性（欠失されるかまたは不活性化された膜貫通ドメイン）形態の抗ＦｃＲＨ５抗体の置換を包含する。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、CH_2およびCH_3、あるいはヒンジ、CH_1、CH_2およびCH_3領域を包含する。免疫グロブリン融合の生成に関しては、米国特許第５，４２８，１３０号（１９９５年６月２７日発行）も参照されたい。

【０６４１】

Ｆ．　抗ＦｃＲＨ５抗体の調製

以下の説明は、主に、抗ＦｃＲＨ５抗体コード核酸を含有するベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクトされた細胞を培養することによる抗ＦｃＲＨ５抗体の産生に関する。もちろん、当該技術分野で周知である代替的方法が、抗ＦｃＲＨ５抗体を調製するために用いられ得ることが意図される。例えば、適切なアミノ酸配列またはその部分は、固相技法を用いて直接ペプチド合成により産生され得る［例えば、Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)； Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照］。in vitroタンパク質合成は、手動技法を用いて、または自動化により実施され得る。自動化合成は、例えば、メーカーの使用説明書を用いるApplied Biosystems ペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、成し遂げられ得る。抗ＦｃＲＨ５抗体の種々の部分は、化学的または酵素的方法を用いて、別個に化学的に合成され、ならびに組合されて、所望の抗ＦｃＲＨ５抗体を産生し得る。

【０６４２】

１．　抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡの単離

抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡは、抗ＦｃＲＨ５抗体ｍＲＮＡを保有し、それを検出可能レベルで発現すると思われる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリーから得られる。したがって、ヒト抗ＦｃＲＨ５抗体ＤＮＡは、ヒト組織から調製されるｃＤＮＡライブラリーから好都合に得られる。抗ＦｃＲＨ５抗体コード遺伝子も、ゲノムライブラリーから、または既知の合成手法（例えば、自動核酸合成）により得られる。

【０６４３】

ライブラリーは、当該遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質を特定するよう設計されたプローブ（例えば、少なくとも約２０～８０塩基のオリゴヌクレオチド）でスクリーニングされ得る。選択プローブによるｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されたような標準手法を用いて実行され得る。抗ＦｃＲＨ５抗体をコードする遺伝子を単離するための代替的手段は、ＰＣＲ法［Sambrook et al.、上記；Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)］を用いることである。

【０６４４】

ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするための技法は、当該技術分野で周知である。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、十分な長鎖を有し、且つ擬陽性が最小限にされるよう十分に一義的であるべきである。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、それがスクリーニングされているライブラリー中でＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出され得るよう、標識される。標識方法は、当該技術分野で周知であり、放射性標識、例えば^{32}Ｐ標識化ＡＴＰ、ビオチニル化または酵素標識の使用を包含する。ハイブリダイゼーション条件、例えば中等度の緊縮性および高緊縮性は、Sambrook et al.（上記）で提供されている。

【０６４５】

このようなライブラリースクリーニング方法で特定される配列は、公的データベース、例えばGenBankまたは他の私的配列データベースに寄託され、利用可能である他の既知の配列と比較され、並べられ得る。分子の限定領域内または全長配列を通しての配列同一性（アミノ酸またはヌクレオチドレベルでの）は、当該技術分野で既知の、ならびに本明細

書中に記載されるような方法を用いて確定され得る。

【０６４６】

タンパク質コード配列を有する核酸は、初めて本明細書中に開示された推定アミノ酸配列を用いて、そして必要な場合は、Sambrook et al.（上記）に記載されたような慣用的プライマー伸長手法を用いて、選択ｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーをスクリーニングして、前駆体を検出し、ｃＤＮＡに逆転写されていないかもしれないｍＲＮＡの中間体をプロセシングすることにより、得られる。

【０６４７】

２．　宿主細胞の選択および形質転換

抗ＦｃＲＨ５抗体産生のために本明細書中に記載される発現またはクローニングベクターで、宿主細胞はトランスフェクトされ、または形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切であるよう修飾された慣用的栄養培地中で培養される。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等は、過度の実験をせずに当業者が選択し得る。概して、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコールおよび実行技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)およびSambrook et al.（上記）に記されている。

【０６４８】

染色体外としてまたは染色体統一体によりＤＮＡが複製可能であるよう宿主中にＤＮＡを導入することを意味する真核生物細胞トランスフェクションおよび原核生物細胞形質転換の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介性、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯおよび電気穿孔は、当業者に既知である。用いられる宿主細胞に依存して、形質転換は、このような細胞に適した標準技法を用いて実施される。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理（Sambrook et al.（上記）に記載）、または電気穿孔は、一般的に原核生物のために用いられる。アグロバクテリウム・ツメファシエンスによる感染は、ある小物細胞の形質転換のために用いられる（Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)およびＷＯ　８９／０５８５９（１９８９年６月２９日公開））。このような細胞壁を有さない哺乳類細胞に関しては、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられ得る。哺乳類細胞宿主系トランスフェクションの一般的態様は、米国特許第４，３９９，２１６号に記載されている。酵母細胞中での形質転換は、典型的には、Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)およびHsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実行される。しかしながら、細胞中にＤＮＡを導入するための他の方法、例えば核マイクロインジェクション、電気穿孔、無傷細胞との細菌原形質体融合、あるいはポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンによる方法も用いられ得る。哺乳類細胞を形質転換するための種々の技法に関しては、Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)およびMansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).を参照されたい。

【０６４９】

本明細書中のベクター中でＤＮＡをクローニングし、または発現するための適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母または高等真核生物細胞が挙げられる。

【０６５０】

ａ．　原核生物宿主細胞

適切な原核生物としては、古細菌および真正細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性細菌、例えば腸内細菌科、例えば大腸菌が挙げられるが、これらに限定されない。種々の大腸菌株、例えば大腸菌Ｋ１２菌株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）；大腸菌Ｗ３１１０株（ＡＴＣＣ　２７，３２５）およびＫ５　７７２（ＡＴＣＣ　５３，６３５）が公的に入手可能である。その他の適切な原核生物宿主細胞としては、腸内細菌科、例えば大腸菌属、例えば大腸菌、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えば霊菌、および赤痢菌属、ならびにバシラス属、例えば枯草

菌およびバシラス・リケニフォルミス（例えば、ＤＤ　２６６，７１０（１９８９年４月１２日公開)に開示されたバシラス・リケニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス属、例えば緑膿菌、根粒菌属、ビトレオシラ属、パラコッカス属、およびストレプトミセス属が挙げられる。これらの例は、限定例というよりむしろ例示説明のための例である。菌株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ産物発酵のための一般的宿主であるため、特に好ましい宿主または親宿主の一つである。好ましくは、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、菌株Ｗ３１１０(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325)は、宿主に対して内因性であるタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子突然変異を実行するよう修飾され、このような宿主の例としては、大腸菌Ｗ３１１０菌株１Ａ２（完全遺伝子型tonA を有する）；大腸菌Ｗ３１１０菌株９Ｅ４（完全遺伝子型tonA ptr3を有する）；大腸菌Ｗ３１１０菌株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ　５５，２４４）（完全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^{r}を有する）；大腸菌Ｗ３１１０菌株３７Ｄ６（完全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^{r}を有する）；大腸菌Ｗ３１１０菌株４０Ｂ４（非カナマイシン耐性degP 欠失突然変異を有する菌株３７Ｄ６である）；大腸菌Ｗ３１１０菌株３３Ｄ３（遺伝子型W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan^{R}を有する）(米国特許第５，６３９，６３５号)、ならびに、米国特許第４，９４６，７８３号（１９９０年８月７日発行）に開示された突然変異体細胞周縁プロテアーゼを有する大腸菌Ｗ３１１０菌株が挙げられる。他の菌株およびその誘導体、例えば大腸菌２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）、大腸菌Ｂ、大腸菌$_{\lambda}$　１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）および大腸菌ＲＶ３０８（ＡＴＣＣ　３１，６０８）も適している。これらの例は、限定例というよりむしろ例示説明のための例である。限定遺伝子型を有する上記の細菌のいずれかの誘導体を構築するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。細菌の細胞中のレプリコンの複製可能性を考慮しながら、適切な細菌を選択することが、一般的に必要である。例えば、大腸菌、セラチア、またはサルモネラ種は、レプリコンを供給するために周知のプラスミド、例えばｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７またはｐＫＮ４１０が用いられる場合、宿主として適切に用いられる。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、そして付加的プロテアーゼ阻害剤が、望ましくは細胞培養中に組入れられ得る。代替的には、クローニングのin vitro方法、例えばＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ連鎖反応が適している。

【０６５１】

特に、グリコシル化およびＦｃエフェクター機能が必要とされない場合、例えば、治療用抗体が細胞傷害性物質（例えば、毒素）と接合され、免疫接合体それ自体が腫瘍細胞崩壊において有効性を示す場合、全長抗体、抗体断片および抗体融合タンパク質が細菌中で産生され得る。全長抗体は、より大きな循環中半減期を有する。大腸菌中での産生は、より速く、且つより費用効率が高い。細菌中での抗体断片およびポリペプチドの発現に関しては、例えばＵ．Ｓ．　５，６４８，２３７　(Carter et. al.)、Ｕ．Ｓ．　５，７８９，１９９　(Joly et al.)およびＵ．Ｓ．　５，８４０，５２３　(Simmons et al.)（これは、発現および分泌を最適化するための翻訳開始領域（ＴＩＲ）および シグナル配列を記載する）（これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）を参照されたい。発現後、抗体は可溶性分画中の大腸菌細胞ペーストから単離され、例えば、アイソタイプによってプロテインＡまたはＧカラムを通して精製され得る。最終精製は、例えばＣＨＯ細胞中で発現される抗体を精製するためのプロセスと同様に実行され得る。

【０６５２】

ｂ．　真核生物宿主細胞

原核生物のほかに、真核生物性微生物、例えば糸状真菌または酵母が、抗ＦｃＲＨ５抗体コードベクターのための適切なクローニングまたは発現宿主である。出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）は、一般に用いられる下等真核生物宿主微生物である。他の例とし

ては、分裂酵母（Schizosaccharomyces pombe (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]；ＥＰ　１３９，３８３（１９８５年５月２日公開））；エタノール発酵酵母（Kluyveromyces ）宿主(米国特許第４，９４３，５２９号；Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991))、例えばクリュイベロミセス・ラクティス（K. lactis）（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４；Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983])、クリュイベロミセス・フラギリス（K. fragilis）（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、クリュイベロミセス・ブルガリクス（K. bulgaricus ）（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、クリュイベロミセス・ウィケラミ（K. wickeramii ）（ＡＴＣＣ　２４，１７８）、クリュイベロミセス・ワルティ（K. waltii ）（ＡＴＣＣ　５６，５００）、クリュイベロミセス・ドロソフィラルム（K. drosophilarum ）（ＡＴＣＣ　３６，９０６、 Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990))、クリュイベロミセス・テルモトレランス（K. thermotolerans）およびクリュイベロミセス・マルキシアヌス；ヤロウィア（K. marxianus； yarrowia ）（ＥＰ　４０２，２２６）；メタノール資化酵母（Pichia pastoris ）（ＥＰ　１８３，０７０；Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988])；カンジダ属；トリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesia ）（ＥＰ　２４４，２３４）；アカパンカビ（Neurospora crassa ）(Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979])；シュワニオミセス属、例えばシュワニオミセス・オキシデンタリス（Schwanniomyces occidentalis ）（ＥＰ　３９４，５３８（１９９０年１０月３１日公開）；および糸状真菌、例えばアカパンカビ属、ペニシリン属、トリポクラジウム属（ＷＯ　９１／００３５７（１９９１年１月１０日公開））およびアスペルギルス属宿主、例えばアスペルギルス・ニデュランス（A. nidulans ）(Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]；Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]；Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984])およびクロカビ（A. niger ）(Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985])が挙げられる。メタノール資化酵母は、本明細書中で適しており、例としては、ハンセヌラ、カンジダ、クロエケラ、ピキア、サッカロミセス、トルロプシスおよびロドトルラからなる属から選択されるメタノール上での増殖が可能な酵母が挙げられるが、これらに限定されない。このクラスの酵母の例である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記されている。

【０６５３】

グリコシル化抗ＦｃＲＨ５抗体の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞、例えばショウジョウバエＳ２およびヨトウガＳｆ９、ならびに植物細胞、例えばワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコが挙げられる。ヨトウガ（Spodoptera frugiperda ）(キャタピラー)、ネッタイシマカ（Aedes aegypti (カ)）、ヒトスジシマカ(Aedes albopictus (カ))、キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster (ショウジョウバエ)）、およびカイコガ（Bombyx mori ）のような宿主からの多数のバキュロウイルス系統および変異体、ならびに対応する許容昆虫宿主が特定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス系統、例えばキンウワバ科のアウトグラファ・カリフォルニカ（Autographa californica ）ＮＰＶのＬ－１変異体、およびカイコガＮＰＶのＢｍ－５系統は、公的に利用可能であり、このようなウイルスは、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、本発明にしたがって本明細書中のウイルスとして用いられ得る。

【０６５４】

しかしながら、最大の関心は脊椎動物細胞に向けられ、培養（組織培養）中の脊椎動物細胞の増殖は、慣例的手法になっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶＩ株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚腎臓株(懸濁培養中での増殖のためにサブクローニングされた２９３または２９３細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977))；仔ハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、 Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；マウス・セルトリ細胞（Ｔ

Ｍ４、 Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ ３Ａ、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ ８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２、ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；ＭＲＣ－５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒト肝細胞腫株（Ｈｅｐ Ｇ２）である。

【０６５５】

宿主細胞は、抗ＦｃＲＨ５抗体産生のために上記発現またはクローニングベクターで形質転換され、そして、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切であるよう改質された慣用的栄養培地中で培養される。

【０６５６】

３． 複製可能ベクターの選択および使用

本発明の抗体の組換え産生のために、それをコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）が単離され、さらなるクローニングのために（ＤＮＡの増幅）または発現のために、複製可能ベクター中に挿入される。抗体をコードするＤＮＡは、慣用的手法を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）、容易に単離され、配列決定される。多数のベクターが利用可能である。ベクターの選択は、部分的に、用いられる宿主細胞によって決まる。一般的に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物（一般的に哺乳類）起源のものである。

【０６５７】

ベクターは、例えばプラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列は、種々の手法によりベクター中に挿入され得る。概して、ＤＮＡは、当該技術分野で既知の技法を用いて、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（単数または複数）中に挿入される。ベクター構成成分としては、一般的に、シグナル配列、複製の起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー素子、プロモーター、および転写終結配列のうちの１つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。これらの構成成分のうちの１つ以上を含有する適切なベクターの構築は、当業者に既知である標準結紮技法を用いる。

【０６５８】

ＦｃＲＨ５は、直接的にだけでなく、シグナル配列または、成熟タンパク質またはポリペプチドのＮ末端に特異的開裂部位を有する他のポリペプチドであり得る非相同ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても、組換え的に産生され得る。概して、シグナル配列は、ベクターの一構成成分であり得、あるいはそれは、ベクター中に挿入される抗ＦｃＲＨ５抗体コードＤＮＡの一部であり得る。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐまたは熱安定性腸毒素ＩＩリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であり得る。酵母分泌に関して、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（例えば、サッカロミセスおよびクリュイベロミセスα因子リーダー（後者は、米国特許第５，０１０，１８２号に記載されている））、または酸性ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス・グルコアミラーゼリーダー（ＥＰ３６２，１７９（１９９０年４月４日公開））、あるいはＷＯ ９０／１３６４６（１９９０年１１月１５日公開)であり得る。哺乳類細胞発現において、同一または関連種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダーのような哺乳類シグナル配列が、タンパク質の直接分泌を指図するために用いられ得る。

【０６５９】

ａ． 原核生物宿主細胞

本発明の抗体のポリペプチド構成成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準組換

え技法を用いて得られる。所望のポリヌクレオチド配列は、抗体産生細胞、例えばハイブリドーマ細胞から単離され、配列決定され得る。代替的には、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機またはＰＣＲ技術を用いて合成され得る。一旦得られたら、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主中で非相同ポリヌクレオチドを複製し、発現することができる組換えベクター中に挿入される。利用可能であり、当該技術分野で既知の多数のベクターが、本発明の目的のために用いられ得る。適切なベクターの選択は、主に、ベクター中に挿入されるべき核酸のサイズ、ならびにベクターで形質転換されるべき特定宿主細胞に依っている。各ベクターは、その機能（非相同ポリヌクレオチドの増幅または発現、あるいは両方）、ならびにそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性によって、種々の構成成分を含有する。

【０６６０】

概して、宿主細胞と適合性である種から得られるレプリコンおよび対照配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主と関連して用いられる。発現およびクローニングベクターはともに、１つ以上の選択宿主細胞中でベクターを複製させる核酸配列を含有し、ならびに、形質転換細胞中での表現型選択を提供することができる配列を作製する。このような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスに関して周知である。アンピシリン（Ａｍｐ）およびテトラサイクリン（Ｔｅｔ）耐性をコードする遺伝子を含有し、したがって形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供するするプラスミドｐＢＲ３２２からの複製の起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適しており、２μプラスミド起点は酵母のために適しており、そして種々のウイルス起点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶまたはＢＰＶ）は哺乳類細胞中のクローニングベクターに有用である。ｐＢＲ３２２、その誘導体、あるいは他の微生物プラスミドまたはバクテリオファージも、内因性タンパク質の発現のために微生物により用いられ得るプロモーターを、含有するか、または含有するよう修飾され得る。特定の抗体の発現のために用いられるｐＢＲ３２２誘導体の例は、米国特許第５，６４８，２３７号（Carter等）に詳細に記載されている。

【０６６１】

さらに、レプリコン、および宿主微生物と適合性である対照配列を含有するファージベクターを、これらの宿主と関連した形質転換ベクターとして用い得る。例えば、λＧＥＭ．ＴＭ．－１１のようなバクテリオファージが、大腸菌ＬＥ３９２のような感受性宿主細胞を形質転換するために用いられ得る組換えベクターを作製するのに利用され得る。

【０６６２】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成成分の各々をコードする２つ以上のプロモーター－シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調整するシストロンに対して上流（５‘）に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、誘導性と構成性の２つのクラスに属する。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば栄養素の存在または非存在、あるいは温度の変化に応答してその制御下でシストロンの増大レベルの転写を開始するプロモーターである。

【０６６３】

種々の潜在的宿主細胞により認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化により供給源ＤＮＡからプロモーターを取り出し、単離プロモーター配列を本発明のベクター中に挿入することにより、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡと操作可能的に連結され得る。ネイティブプロモーター配列および多数の非相同プロモーターはともに、標的遺伝子の増幅および／または発現を指図するために用いられ得る。いくつかの実施形態では、ネイティブ標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現標的遺伝子のより大きな転写およびより高い収率を一般的に可能にするため、非相同プロモーターが利用される。

【０６６４】

種々の潜在的宿主細胞により認識されるプロモーターが周知である。原核生物宿主とともに用いるのに適したプロモーターとしては、ＰｈｏＡプロモーター、β－ガラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系[Chang et al., Nature, 275:615 (1978)；Goeddel e

ｔ ａｌ., Nature, 281:544 (1979)]、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)；ＥＰ ３６，７７６]およびハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃ[deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]またはｔｒｃプロモーターが挙げられる。細菌系で用いるためのプロモーターは、ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡと操作可能的に連結されるシャイン・ダルガーノ（Ｓ．Ｄ．）配列も含有する。しかしながら、細菌中で機能性である他のプロモーター（例えば、他の既知の細菌またはファージプロモーター）も同様に適している。それらのヌクレオチド配列は公開されており、それにより、当業者は、リンカーまたはアダプタを用いて、それらを、標的軽鎖および重鎖をコードするシストロン(Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269)と操作可能的に結紮して、任意の必要な制限部位を供給することが出来る。

【０６６５】

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を通した発現ポリペプチドの転位を指図する分泌シグナル配列構成成分を含む。概して、シグナル配列はベクターの一構成成分であり得るし、あるいはそれは、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であり得る。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞により認識され、プロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものであるべきである。非相同ポリペプチドに固有のシグナル配列を認識もプロセシングもしない原核生物宿主細胞に関しては、シグナル配列は、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐ、または熱安定性腸毒素ＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡおよびＭＢＰからなる群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。本発明の一実施形態では、発現系の両シストロンに用いられるシグナル配列は、ＳＴＩＩシグナル配列またはその変異体である。

【０６６６】

別の態様では、本発明による免疫グロブリンの産生は宿主細胞の細胞質中で生じ、したがって、各シストロン内の分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点で、免疫グロブリン軽鎖および重鎖は、発現され、フォールディングされ、集合されて、細胞質内に機能性免疫グロブリンを形成する。ある宿主系統（例えば大腸菌ｔｒｘＢ株）は、ジスルフィド結合形成に好都合な細胞質状態を提供し、それにより発現タンパク質サブユニットの適正なフォールディングおよびアセンブリーを可能にする（Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)）。

【０６６７】

本発明は、本発明の分泌され、適性に集合された抗体の収率を最大にするために、発現ポリペプチド構成成分の定量的比率が調整され得る発現系を提供する。このような調整は、少なくとも部分的には、ポリペプチド構成成分に関する翻訳強度を同時的に調整することにより成し遂げられる。

【０６６８】

翻訳強度を調整するための一技法は、米国特許第５，８４０，５２３号（Simmons等）に開示されている。それは、シストロン内の翻訳開始領域（ＴＩＲ）の変異体を利用する。所与のＴＩＲに関して、一連のアミノ酸または核酸配列変異体が、一連の翻訳強度で作製され、それにより、この因子を特定鎖の所望の発現レベルに調整するための便利な手段を提供する。ＴＩＲ変異体は、アミノ酸配列を変更し得るコドン変化を生じる慣用的突然変異誘発技法により生成され得るが、しかしヌクレオチド配列における無症候性変化が好ましい。ＴＩＲにおける変更としては、例えば、シグナル配列における変更とともに、シャイン・ダルガーノ配列の数または間隔における変更が挙げられる。突然変異体シグナル配列を生成するための一方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変えない（すなわち、変化は無症候性である）コード配列の開始での「コドンバンク」の生成である。これは、各コドンの第三ヌクレオチド位置を変えることにより成し遂げられ得る；さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリンおよびアルギニンは、バンクを作製するに際して複雑性を付加し得る多重第一および第二位置を有する。突然変異誘発のこの方法は、Yansur

a et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

【０６６９】

好ましくは、一組のベクターは、その中の各シストロンに関して一連のＴＩＲ強度で生成される。この限定組は、種々のＴＩＲ強度組合せ下で、各鎖の発現レベルならびに所望の抗体産物の収率の比較を提供する。ＴＩＲ強度は、米国特許第５，８４０，５２３号（Simmons等）に詳細に記載されるようなレポーター遺伝子の発現レベルを定量することにより決定され得る。翻訳強度比較に基づいて、所望の個々のＴＩＲは、本発明の発現ベクター構築物に組合せられるよう選択される。

【０６７０】

ｂ．真核生物宿主細胞

ベクター構成成分としては、一般的に、以下のもののうちの１つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：シグナル配列、複製の起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー素子、プロモーター、および転写終結配列。

【０６７１】

（１）シグナル配列構成成分

真核生物宿主細胞中で用いるためのベクターは、シグナル配列、あるいは成熟タンパク質または当該ポリペプチドのＮ末端に特異的開裂部位を有する他のポリペプチドも含有し得る。選択される非相同シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞により認識され、プロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものである。哺乳類細胞発現において、哺乳類シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスｇＤシグナルが利用可能である。

【０６７２】

このような前駆体領域に関するＤＮＡは、抗体をコードするＤＮＡと、読取り枠内で結紮される。

【０６７３】

（２）複製の起点

一般的に、複製の起点構成成分は、哺乳類発現ベクターに必要とされない。例えば、ＳＶ４０起点は、典型的には、それが初期プロモーターを含有するという理由だけで、用いられ得る。

【０６７４】

（３）選択遺伝子構成成分

発現およびクローニングベクターは、典型的には、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含有する。典型的選択遺伝子は、（ａ）抗生物質または他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与し、（ｂ）栄養要求性欠乏を補足し、あるいは（ｃ）複合場位置から得られない重要栄養素を供給するタンパク質をコードし、例としてはバシラス属に関するＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【０６７５】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を阻止する薬剤を利用する。非相同遺伝子で首尾よく形質転換される細胞は、薬剤耐性を付与するタンパク質を産生し、したがって、選択レジメンを生き残る。このような優性選択の例は、薬剤　ネオマイシン、ミコフェノール酸およびヒグロマイシンを用いる。

【０６７６】

哺乳類細胞に関する適切な選択可能マーカーの例は、抗ＦｃＲＨ５抗体コード核酸、例えばＤＨＦＲまたはチミジンキナーゼ、メタロチオネイン－Ｉおよび－ＩＩ、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンでアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等を取り上げるための細胞構成成分の特定を可能にするものである。野生型ＤＨＦＲが用いられる場合の適切な宿主細胞は、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)により記載されたように調製され、増殖されるＤＨＦＲ活性を欠くＣＨＯ

細胞株（例えば、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－９０９６）である。例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子でトランスフェクトされる細胞は、ＤＨＦＲの競合的アンタゴニストであるメトトレキサート（Ｍｔｘ）を含有する培地中で形質転換体の全てを培養することにより、先ず特定される。代替的には、抗体、野生型ＤＨＦＲ、タンパク質、ならびに別の選択可能マーカー、例えばアミノグリコシド３’－ホスホトランスフェラーゼ（ＡＰＨ）で形質転換されるかまたは同時形質転換される宿主細胞（特に、内因性ＤＨＦＲを含有する野生型宿主）は、アミノグリコシド系抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシンまたはＧ４１８のような選択可能マーカーに関する選択作用物質を含有する培地中での細胞増殖により、選択され得る（米国特許第４，９６５，１９９号参照）。

【０６７７】

酵母で用いるための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドＹＲ$_{p}$７中に存在するｔｒｐ１遺伝子である[Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)；Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]。ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株（例えば、ＡＴＣＣ番号　４４０７６またはＰＥＰ－１）に関する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【０６７８】

（４）プロモーター構成成分

発現およびクローニングベクターは、通常は、ｍＲＮＡ合成を指図するために、抗ＦｃＲＨ５抗体コード核酸配列と操作可能的に連結されるプロモーターを含有する。種々の潜在的宿主細胞により認識されるプロモーターは、周知である。

【０６７９】

事実上すべての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位から約２５～３０塩基蒸留に位置する富ＡＴ領域を有する。多数の遺伝子の転写の開始から７０～８０塩基上流に見出される別の配列は、ＣＮＣＡＡＴ領域（ここで、Ｎは任意のヌクレオチド）である。ほとんどの真核生物遺伝子の３’末端はＡＡＴＡＡＡ配列であり、これは、コード配列の３’末端へのポリＡ尾部の付加のためのシグナルであり得る。これらの配列の全てが、真核生物発現ベクター中に適切に挿入される。

【０６８０】

酵母宿主とともに用いるための適切なプロモーター配列の例としては、３－ホスホグリセレートキナーゼ[Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]または他の解糖酵素[Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートでカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－ホスフェートイソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼに関するプロモーターが挙げられる。

【０６８１】

増殖条件により制御される転写の付加的利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソシトクロムＣ、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連した分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用に関与する酵素に関するプロモーター領域である。酵母発現に用いるための適切なベクターおよびプロモーターは、欧州特許第７３，６５７号にさらに記載されている。

【０６８２】

哺乳類宿主細胞中のベクターからの抗ＦｃＲＨ５抗体転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（英国特許第２，２１１，５０４号、１９８９年７月５日公開）、あでのウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、鳥肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよびサルウイルス４０（ＳＶ４０）のようなウイルスのゲノムから、非相同哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、ならびに熱ショックプロモータ

ーから得られるプロモーターにより、制御されるが、但し、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合性である。

【０６８３】

ＳＶ４０ウイルスの初期および後期プロモーターは、複製のＳＶ４０ウイルス起点も含有するＳＶ４０制限断片として好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限断片として好都合に得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを用いる哺乳類宿主中のＤＮＡを発現する系は、米国特許第４，４１９，４４６号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第４，６０１，９７８号に記載されている。単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞中のヒトβ－インターフェロンｃＤＮＡの発現に関しては、Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)も参照されたい。代替的には、ラウス肉腫ウイルス長末端反復が、プロモーターとして用いられ得る。

【０６８４】

（５）エンハンサー素子構成成分

高等真核生物による抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増大され得る。エンハンサーは、その転写を増大するためにプロモーター上で作用する、通常は約１０～３００ｂｐのＤＮＡのシス作用阻止である。多数のエンハンサー配列が、目下、哺乳類遺伝子から知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、アルファ－フェトタンパク質およびインスリン）。しかしながら、典型的には、真核生物細胞ウイルスからのエンハンサーを用いる。例としては、複製の起点の後期側上のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ　１００～２７０）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側上のポリオーマエンハンサー、およびあでのウイルスエンハンサーが挙げられる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー素子に関しては、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)も参照されたい。エンハンサーは、抗ＦｃＲＨ５抗体コード配列に対して５’または３’位置でベクターにスプライスされ得るが、好ましくはプロモーターから５’部位に位置する。

【０６８５】

（６）転写終結構成成分

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物からの有核細胞）中で用いられる発現ベクターは、転写の終結のために、ならびにｍＲＮＡを安定化するために必要な配列も含有する。このような配列は、真核生物またはウイルスＤＮＡまたはｃＤＮＡの５’、時として３’非翻訳領域から一般に入手可能である。これらの領域は、抗ＦｃＲＨ５抗体をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分中のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。有用な転写終結構成成分の１つは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。ＷＯ９４／１１０２６、ならびにそこに開示された発現ベクターを参照されたい。

【０６８６】

組換え脊椎動物細胞培養中での抗ＦｃＲＨ５抗体の合成に適応するために適したさらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)；Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)；欧州特許第１１７，０６０号；および欧州特許第１１７，０５８号に記載されている。

【０６８７】

４．　宿主細胞の培養

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体を産生するために用いられる宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。

【０６８８】

ａ．　原核生物宿主細胞

本発明のポリペプチドを産生するために用いられる原核生物細胞は、当該技術分野で既知の、そして選択宿主細胞の培養に適した培地中で増殖される。適切な培地の例としては、ルリアブロス（ＬＢ）＋必要な栄養素補足物が挙げられる。いくつかの実施形態では、

培地は、発現ベクターの構築に基づいて選ばれる選択作用物質も含有して、発現ベクターを含有する原核生物細胞の増殖を選択的に可能にする。例えば、アンピシリンが、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のために培地に付加される。

【０６８９】

炭素、窒素および無機リン酸塩供給源のほかの任意の必要な補足物も適切な濃度で含まれ、単独で、あるいは別の補足物または培地、例えば複合窒素供給源との混合物として導入される。任意に、培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコラート、ジチオエリトリトールおよびジチオトレイトールからなる群から選択される１つ以上の還元剤を含有し得る。

【０６９０】

原核生物宿主細胞は、適切な温度で培養される。例えば大腸菌増殖に関しては、好ましい温度は約２０℃～約３９℃、さらに好ましくは約２５℃～約３７℃の範囲、さらに好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に宿主生物に依存して、約５～約９の範囲の任意のｐＨである。大腸菌に関して、ｐＨは、好ましくは約６．８～約７．４、さらに好ましくは約７．０である。

【０６９１】

誘導性プロモーターが本発明の発現ベクター中で用いられる場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に適した条件下で誘導される。本発明の一態様では、ＰｈｏＡプロモーターが、ポリペプチドの転写を制御するために用いられる。したがって、形質転換宿主細胞は、誘導のためにリン酸塩制限培地中で培養される。好ましくは、リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地である（例えば、Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147参照）。当該技術分野で既知であるように、用いられるベクター構築物によって、種々の他の誘導物質が用いられ得る。

【０６９２】

一実施形態では、本発明の発現ポリペプチドは、宿主細胞の周縁質中で分泌され、そこから回収される。タンパク質回収は典型的には、一般的に浸透圧性ショック、音波処理または溶解のような手段により微生物を崩壊することを伴う。一旦細胞が崩壊されると、細胞破砕屑または全細胞が、遠心分離または濾過により除去される。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによりさらに精製され得る。代替的には、タンパク質は培地中に運搬され、そこで単離され得る。細胞は培養から除去され、培養上清が濾過されて、生成されたタンパク質のさらなる精製のために濃縮される。発現ポリペプチドは、一般に既知の方法、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）およびウエスタンブロット検定を用いて特定され得る。

【０６９３】

本発明の一態様では、抗体産生は、発酵工程により大量に実行される。種々の大規模流加回分発酵手法は、組換えタンパク質の産生のために利用可能である。大規模発酵は、少なくとも１０００リットルの容量、好ましくは約１，０００～１００，０００リットルの容量を有する。これらの発酵器は、酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を分布させるための撹拌器羽根車を使用する。小規模発酵は、一般的に、容積で約１００リットル以下であり、そして約１リットル～約１００リットルの範囲であり得る発酵器中での発酵を指す。

【０６９４】

発酵工程において、タンパク質発現の誘導は、典型的には、適切な条件下で、所望の密度、例えば約１８０～２２０のOD_{550}に細胞が増殖した後に開始され、この段階で、細胞は初期定常期である。当該技術分野で知られており、そして上で説明されたように、用いられるベクター構築物に従って、種々の誘導物質が用いられ得る。細胞は、誘導前により短期間増殖され得る。細胞は、通常は、約１２～５０時間誘導されるが、しかしより長いかまたはより短い誘導時間が用いられ得る。

【０６９５】

本発明のポリペプチドの産生収率および質を改良するために、種々の発酵条件が改変さ

れ得る。例えば、分泌抗体ポリペプチドの適正なアセンブリーおよびフォールディングを改良するために、シャペロンタンパク質、例えばＤｓｂタンパク質（ＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｂＣ、ＤｓｂＤおよび／またはＤｓｂＧ）またはＦｋｐＡ（シャペロン活性を有するペプチジルプロピル　シス、トランス－イソメラーゼ）を過剰発現する付加的ベクターが用いられて、宿主原核生物細胞を同時形質転換し得る。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞中で産生される異種タンパク質の適正なフォールディングおよび溶解度を助長することが実証されている（Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605；米国特許第６，０８３，７１５号（Georgiou等）；米国特許第６，０２７，８８８号（Georgiou等）；Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105；Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113；Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210））。

【０６９６】

発現異種タンパク質（特にタンパク質分解感受性であるもの）のタンパク質分解を最小限にするために、タンパク質分解酵素を欠くある宿主株が本発明のために用いられ得る。例えば、宿主細胞株は、既知の細菌プロテアーゼ、例えばプロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩおよびその組合せをコードする遺伝子における遺伝子突然変異（単数または複数）を実行するよう修飾され得る。いくつかの大腸菌プロテアーゼ欠乏株が利用可能であり、例えば、Joly et al. (1998)、上記；米国特許第５，２６４，３６５号（Georgiou等）；米国特許第５，５０８，１９２号（Georgiou等）；Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)に記載されている。

【０６９７】

一実施形態では、タンパク質分解酵素を欠き、１つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換された大腸菌株は、本発明の発現系における宿主細胞として用いられる。

【０６９８】

ｂ．　真核生物宿主細胞

市販の培地、例えばハムＦ１０（Sigma）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、Sigma）、ＲＰＭＩ－１６４０（Sigma）およびダルベッコの変法イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Sigma）は、宿主細胞を培養するために適している。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980)、米国特許第４，７６７，７０４号；第４，６５７，８６６号；第４，９２７，７６２号；第４，５６０，６５５号；または第５，１２２，４６９号；ＷＯ　９０／０３４３０；ＷＯ　８７／００１９５；または米国特許Ｒｅ．３０，９８５に記載された培地のいずれかが、宿主細胞のための培地として用いられ得る。これらの培地のいずれも、必要な場合、ホルモンおよび／またはその他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリンまたは上皮細胞成長因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩）、緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗体（例えば、ゲンタマイシン（商標）薬）、微量元素（通常はマイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、ならびにグルコースまたは同等のエネルギー源を補充され得る。任意の他の必要な補充物も、当業者に既知である適切な濃度で含まれ得る。培養条件、例えば温度、ｐＨ等は、発現のために選択される宿主細胞とともに以前に用いられたものであり、当業者には明らかである。

【０６９９】

５．　遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子増幅および／または発現は、例えば、ｍＲＮＡの転写を定量するための慣用的サザンブロッティング、ノーザンブロッティング[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロッティング（ＤＮＡ分析）、または本明細書中で提供される配列に基づいて適切に標識されたプローブを用いたin situハイブリダイゼーションにより、直接的に試料中で測定され得る。代替的には、特定の二重鎖、例えばＤＮＡ二

重鎖、ＲＮＡ二重鎖およびＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二重鎖またはＤＮＡ－タンパク質二重鎖を認識し得る抗体が用いられ得る。抗体は、次いで、標識され、検定が実行されるが、ここで、表面上の二重鎖の形成時に、二重鎖と結合される抗体の存在が検出され得るよう、二重鎖は表面と結合される。

【０７００】

遺伝子発現は、代替的には、免疫学的方法、例えば細胞または組織切片の免疫組織化学的染色、ならびに細胞培養または体液の検定により測定されて、遺伝子産物の発現を直接的に定量し得る。免疫組織化学的染色および／または試料液の検定のために有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、任意の哺乳類で調製され得る。便宜上、抗体は、ネイティブ配列ＦｃＲＨ５ポリペプチドに対して、または本明細書中に提供されるＤＮＡ配列を基礎にした合成ペプチドに対して、あるいはＦｃＲＨ５ＤＮＡと融合され、特定抗体エピトープをコードする外因性配列に対して、調製され得る。

【０７０１】

６．　抗ＦｃＲＨ５抗体の精製

抗ＦｃＲＨ５抗体の形態は、培地から、または宿主細胞溶解物から回収され得る。膜結合される場合、それは、適切な洗剤溶液（例えば、トリトン－Ｘ１００）を用いて、または酵素的開裂により、膜から放出され得る。抗ＦｃＲＨ５抗体の発現に用いられる細胞は、種々の物理的または化学的手段、例えば凍結－解凍周期、音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤により崩壊される。

【０７０２】

組換え細胞タンパク質またはポリペプチドから抗ＦｃＲＨ５抗体を精製することが望ましい。以下の手法は、適切な精製手法の例である：イオン交換カラム上での分別；エタノール沈降；逆相ＨＰＬＣ；シリカ上または陽イオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥ上でのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈降；例えばセファデックスＧ－７５を用いたゲル濾過；ＩｇＧのような夾雑物を除去するためのプロテインＡセファロースカラム；ならびにエピトープ標的化形態の抗ＦｃＲＨ５抗体を結合するための金属キレート化カラム。タンパク質精製の種々の方法が用いられ、このような方法は、当該技術分野で知られており、例えばDeutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載されている。選択される精製ステップ（単数または複数）は、例えば、用いられる精製工程の性質ならびに産生される特定の抗ＦｃＲＨ５抗体に依っている。

【０７０３】

組換え技法を用いる場合、抗体は、細胞膜周辺腔中で細胞内で産生され得、あるいは培地中に直接分泌され得る。抗体が、第一ステップとして、細胞内で産生される場合、微粒子破砕屑（宿主細胞または溶解断片）は、例えば遠心分離または限外濾過により除去される。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手法を記載する。簡潔に述べると、細胞ペーストは、酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡおよびフェニルメチルスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）の存在下で約３０分間かけて解凍される。細胞破砕屑は、遠心分離により除去され得る。抗体が培地中に分泌される場合、このような発現系からの上清は、一般的に、先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮される。プロテアーゼ阻害剤、例えばＰＭＳＦを、タンパク質分解を抑制するために前記ステップのいずれにも含めることができ、抗生物質を、偶発的夾雑物の増殖を防止するために含めることができる。

【０７０４】

細胞から調製される抗体組成物は、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され得、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技法である。親和性リガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種およ

びアイソタイプに依っている。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２またはγ４重鎖を基礎にした抗体を精製するために用いられ得る（Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)）。プロテインＧが、全てのマウスアイソタイプに関して、ならびにヒトγ３に関して推奨される（Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)）。親和性リガンドが結合されるマトリックスは、最も頻繁にはアガロースであるが、しかし他のマトリックスが利用可能である。機械的に安定なマトリックス、例えば制御細孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンは、アガロースを用いて達成され得るより早い流動速度およびより短いプロセシング時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ＡＢＸ（商標）樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技法、例えばイオン交換カラム上での分別、エタノール沈降、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリン・セファロース（商標）上でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上でのクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈降も、回収される抗体に依存して利用可能である。

【０７０５】

任意の予備精製ステップ（単数または複数）後、当該抗体および夾雑物を含む混合物は、約２．５～４．５のｐＨで溶離緩衝液を用いて低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに付され得、好ましくは、低塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍ塩）で実施され得る。

【０７０６】

Ｇ．　薬学的処方物

本発明の抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）は、処置される症状に適した任意の経路で投与され得る。ＡＤＣは、典型的には、非経口的に、すなわち、注入、皮下、筋内、静脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外に投与される。

【０７０７】

これらの癌を処置するために、一実施形態では、静脈内注入を介して抗体－薬剤接合体が投与される。注入を介して投与される投薬量は、１回の投与当たり、約１μｇ／m^2～約１０，０００μｇ／m^2であり、通常、週１回の投与を合計で１回、２回、３回、又は４回の投与を行う。約１μｇ／m^2～約１０００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約８００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約６００μｇ／m^2、約１μｇ／m^2～約４００μｇ／m^2、約１０　μｇ／m^2～約５００μｇ／m^2、約１０μｇ／m^2～約３００μｇ／m^2、約１０μｇ／m^2～約２００μｇ／m^2、および約１μｇ／m^2～約２００μｇ／m^2である。用量投与は、疾患の症候を軽減するかまたは緩和するために、１回／日、１回／週、多数回／週、しかし１回未満／日、多数回／月、しかし１回未満／日、多数回／月、しかし１回未満／週、１回／月または間欠的に施され得る。投与は、処置されている腫瘍あるいはリンパ腫、白血病の症候の寛解まで、開示された間隔のいずれかで継続し得る。投与は、症候の寛解または軽減が達成された後、継続し得るが、この場合、このような寛解または軽減はこのような継続投与により延長される。

【０７０８】

本発明は、自己免疫疾患の緩和方法であって、自己免疫疾患に罹患している患者に、治療的有効量の前記実施形態のいずれか１つのヒト化１０Ａ８抗体－薬剤接合体を投与することを包含する方法も提供する。好ましい実施形態では、抗体は、静脈内にまたは皮下に投与される。抗体－薬剤接合体は、約１μｇ／m^2～約１００ｍｇ／m^2／用量投与の範囲の投薬量で静脈内投与され、特定の一実施形態では、投薬量は１μｇ／m^2～約５００μｇ／m^2である。用量投与は、疾患の症候を軽減するかまたは緩和するために、１回／日、１回／週、多数回／週、しかし１回未満／日、多数回／月、しかし１回未満／日、多数回／月、しかし１回未満／週、１回／月または間欠的に施され得る。投与は、処置されている自己免疫疾患の症候の軽減または緩和まで、開示された間隔のいずれかで継続し得る。投与は、症候の軽減または緩和が達成された後、継続し得るが、この場合、このような緩和または軽減はこのような継続投与により延長される。

【０７０９】

本発明は、Ｂ細胞障害の治療方法であって、Ｂ細胞障害、例えばＢ細胞増殖性障害（例えば、リンパ腫および白血病（これらに限定されない））または自己免疫疾患に罹患している患者に、治療的有効量の前記実施形態のいずれかのヒト化１０Ａ８抗体を投与することを包含する方法を提供するが、この場合、抗体は細胞傷害性分子または検出可能分子と接合されない。抗体は、典型的には、約１μｇ／ｍ^2～約１０００ｍｇ／ｍ^{2}の投与量範囲で投与される。

【０７１０】

一態様では、本発明はさらに、本発明の少なくとも１つの抗ＦｃＲＨ５抗体、および／または少なくとも１つのその免疫接合体および／または少なくとも１つの本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体－薬剤接合体を含む薬学的処方物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的処方物は、（１）本発明の抗体および／またはその免疫接合体、ならびに（２）製薬上許容可能な担体を含む。いくつかの実施形態では、薬学的処方物は、（１）本発明の抗体および／またはその免疫接合体、そして任意に、（２）少なくとも１つの付加的治療薬を含む。付加的治療薬としては、下記のものが挙げられるが、これらに限定されない。ＡＤＣは、典型的には、非経口的に、すなわち、注入、皮下、筋内、静脈内、皮内、くも膜下腔および硬膜外に投与される。

【０７１１】

本発明に従って用いられる治療用処方物（例えば、抗ＦｃＲＨ５抗体またはＦｃＲＨ５免疫接合体を含む）は、所望の純度を有する活性成分（例えば、抗体または免疫接合体）を、任意の製薬上許容可能な担体、賦形剤または安定剤と混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）、凍結乾燥処方物または水溶液の形態で、貯蔵のために調製される。許容可能な担体、賦形剤または安定剤は、用いられる投与量および濃度で、レシピエントに対して非毒性であり、例としては、緩衝剤、例えば酢酸塩、トリス、リン酸塩、クエン酸塩およびその他の有機酸；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンズアルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスタミン、アルギニンまたはリシン；単糖、二糖およびその他の炭水化物、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート剤、例えばＥＤＴＡ；等張剤、例えばトレハロースおよび塩化ナトリウム；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；界面活性剤、例えばポリソルベート；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；および／または非イオン性界面活性剤、例えばトゥイーン（登録商標）、プルロニック（登録商標）またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられる。

【０７１２】

任意に、しかし好ましくは、処方物は、製薬上許容可能な塩、好ましくは塩化ナトリウムを、そして好ましくはほぼ生理学的濃度で含有する。任意に、本発明の処方物は、製薬上許容可能な保存剤を含有し得る。いくつかの実施形態では、保存剤濃度は、０．１～２．０％、典型的にはｖ／ｖの範囲である。適切な保存剤としては、製薬業界で既知のものが挙げられる。ベンジルアルコール、フェノール、ｍ－クレゾール、メチルパラベンおよびプロピルパラベンは、好ましい保存剤である。任意に、本発明の処方物は、製薬上許容可能な界面活性剤を、０．００５～０．０２％の濃度で含み得る。

【０７１３】

in vivo投与のために用いられるべき薬学的処方物は、一般的に滅菌性である。これは、滅菌濾過膜を通すことにより容易に成し遂げられる。

【０７１４】

本明細書中の処方物は、処置されている特定の適応症のために必要な場合、１つより多い活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有し得る。例えば、抗ＦｃＲＨ５抗体のほかに、一処方物中に、付加的抗体、例えば、ＦｃＲＨ５ポリペプチド上の異なるエピトープを結合する第二抗ＦｃＲＨ５抗体、あるいはいくつかの他の標的、例えば特定の癌の増殖に影響を及ぼす増殖因子に対する抗体を含むことが望ましい。代替的には、または付加的には、組成物はさらに、化学療法薬、細胞傷害性物質、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤および／または心臓保護剤を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で、組合せて適切に存在する。

【０７１５】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法により、または界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）に、マクロエマルション中にも入れられ得る。このような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【０７１６】

徐放性調製物が、調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する個体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品、例えば皮膜またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸およびγエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－ビニルアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えばＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（登録商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートからなる注入可能マイクロスフェア）およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－ビニル酢酸および乳酸－グリコール酸のようなポリマーは１００日を超える間、分子の放出を可能にするが、一方、ある種のヒドロゲルはより短い期間、タンパク質を放出する。封入免疫グロブリンが長時間身体中に残存する場合、それらは、３７℃で水分に曝露された結果として変性するかまたは凝集して、生物学的活性を損失し、免疫原性が変わることがある。関与する機序に依存して、安定化のための合理的戦略が考案され得る。例えば、凝集機序がチオ－ジスルフィド交換を介した分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出された場合、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、含水量を制御し、適切な添加剤を用い、そして特定ポリマーマトリックス組成物を開発することにより、安定化が達成され得る。

【０７１７】

抗体は、標的細胞／組織への送達のための任意の適切な形態で処方され得る。例えば、抗体は、免疫リポソームとして処方され得る。「リポソーム」は、哺乳動物に薬剤を送達するために有用である種々の型の脂質、リン脂質および／または界面活性剤からなる小型小胞である。リポソームの構成成分は、一般に、生物学的膜の脂質配列と同様に、二重膜形成で配置される。抗体を含有するリポソームは、当該技術分野で既知の方法、例えばEpstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；米国特許第４，４８５，０４５号および第４，５４４，５４５号；およびＷＯ９７／３８７３１（１９９７年１０月２３日公開）に記載された方法により調製される。循環時間増大を示すリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０７１８】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発法により生成され得る。リポソームは、限定孔サイズのフィルターを通して押出されて、

所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のＦａｂ’断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されたようなリポソームと接合され得る。化学療法薬は、任意に、リポソーム内に含有される（Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)参照）。

【０７１９】

in vivo投与のために用いられるべき処方物は、滅菌性でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して容易に成し遂げられる。

【０７２０】

Ｈ．　抗ＦｃＲＨ５抗体による処置

癌におけるＦｃＲＨ５発現を確定するために、種々の検出検定が利用可能である。一実施形態では、ＦｃＲＨ５ポリペプチド過剰発現は、免疫組織化学（ＩＨＣ）により分析され得る。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をＩＨＣ検定に付して、以下のようなＦｃＲＨ５タンパク質染色強度判定基準を付与される：

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

スコア１＋　：かすかな／わずかに認知可能な膜染色が、腫瘍細胞の１０％より多くで観察される。細胞は、それらの膜の一部で染色されるだけである。

スコア２＋　：弱～中等度の完全膜染色が、腫瘍細胞の１０％より多くで観察される。

スコア３＋　：中等度～強度の完全膜染色が、腫瘍細胞の１０％より多くで観察される。

【０７２１】

ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現に関して０または１＋スコアを有する腫瘍はＦｃＲＨ５を過剰発現していないと特徴付けられ、一方、２＋または３＋スコアを有する腫瘍はＦｃＲＨ５を過剰発現していると特徴付けられ得る。

【０７２２】

代替的には、または付加的には、ＦＩＳＨ検定、例えばインフォーム（登録商標）（販売：Ventana, Arizona)またはパスビジョン（登録商標）(Vysis, Illinois)は、ホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍組織に関して実行されて、腫瘍中のＦｃＲＨ５過剰発現の程度（もしあれば）を確定し得る。

【０７２３】

ＦｃＲＨ５過剰発現または増幅は、in vivo検出検定を用いて、例えば検出されるべき分子を結合し、検出可能標識（例えば、放射性同位体または蛍光標識）でタグ化される分子（例えば、抗体）を投与し、そして標識の局在性に関して患者を外部スキャニングすることにより、評価され得る。

【０７２４】

上記のように、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、種々の非治療用途を有する。本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現癌の段階分けのために有用であり得る（例えば、放射線画像処理）。抗体は、他の細胞の精製における一ステップとして、混合細胞の集団からＦｃＲＨ５発現細胞を殺害し、排除するために、例えばＥＬＩＳＡまたはウェスタンブロットにおけるin vitroでのＦｃＲＨ５ポリペプチドの検出または定量のための細胞からのＦｃＲＨ５ポリペプチドの精製または免疫沈降にも有用である。

【０７２５】

現在、癌の段階によって、癌治療は、以下の療法のうちの１つまたはその組合せを包含する：癌性組織を除去するための外科手術、放射線療法および化学療法。抗ＦｃＲＨ５抗体療法は、化学療法の毒性および副作用に十分に耐容しない高齢患者において、そして放射線療法が限定された有用性を示す転移疾患において、特に望ましい。本発明の腫瘍ターゲッティング抗ＦｃＲＨ５抗体は、疾患の初期診断時または再発中に、ＦｃＲＨ５発現癌を軽減するために有用である。治療的適用に関して、抗ＦｃＲＨ５抗体は、単独で、あるいは、例えばホルモン、抗血管新生薬または放射能標識化合物との、もしくは外科手術、

低温療法、および／または放射線療法との併用療法で用いられ得る。抗ＦｃＲＨ５抗体処置は、他の形態の慣用的療法と一緒に、慣用的療法と連続して、その前に、またはその後に、施され得る。化学療法薬、例えばタキソテレ（登録商標）（ドセタキセル）、タキソール（登録商標）（パクリタキセル）、エストラムスチンおよびミトキサントロンは、癌を治療するのに、特に危険度の低い患者において、用いられる。癌を治療または緩和するための本発明のこの方法では、癌患者は、前記化学療法薬のうちの１つ以上による処置と一緒に、抗ＦｃＲＨ５抗体を投与され得る。特に、パクリタキセルおよび改質誘導体との併用療法（例えば欧州特許第０６００５１７号参照）が意図される。抗ＦｃＲＨ５抗体は、治療的有効用量の化学療法薬とともに投与される。別の実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、化学療法と一緒に施されて、化学療法薬、例えばパクリタキセルの活性および効力を増強する。医師用添付文書集（ＰＤＲ）は、種々の癌の処置に用いられてきたこれらの薬剤の投与量を開示する。治療的に有効なこれらの前記化学療法薬の用量投与レジメンおよび投与量は、処置されている特定の癌、疾患の程度、ならびに当業者の意思に周知の他の因子に依っており、医師により決定され得る。

【０７２６】

特定の一実施形態では、細胞傷害性物質と接合された抗ＦｃＲＨ５抗体を含む接合体が患者に投与される。好ましくは、ＦｃＲＨ５タンパク質と結合された免疫接合体は、細胞により内在化されて、それが結合する癌細胞を殺害するに際して免疫接合体の治療効力を増大する。好ましい一実施形態では、細胞傷害性物質は、癌細胞中の核酸を標的にするかまたはそれを妨害する。このような細胞傷害性物質の例は上記されており、例えばマイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼおよびＤＮＡエンドヌクレアーゼが挙げられる。

【０７２７】

本発明の治療薬（例えば、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその毒素接合体）は、既知の方法、例えば静脈内投与により、例えばボーラス投与として、または一定時間に亘る連続注入により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液内、くも膜下腔内、経口、局所、または吸入経路により、ヒト患者に投与される。治療薬の静脈内または皮下投与が好ましい。

【０７２８】

ex-vivo戦略も、治療的適用のために用いられ得る。ex-vivo戦略は、ＦｃＲＨ５アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを用いて対象から得られる細胞をトランスフェクトするかまたは形質導入することを包含する。次いで、トランスフェクト化または形質導入化細胞が、対象に戻される。細胞は、広範囲の型のうちのいずれも、例えば、造血細胞（例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、Ｔ細胞またはＢ細胞）、繊維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイトまたは筋細胞（これらに限定されない）であり得る。

【０７２９】

例えば、ＦｃＲＨ５アンタゴニストが抗体または免疫接合体である場合、アンタゴニストは、任意の適切な手段により、例えば、非経口、皮下、腹腔内、肺内および鼻内、そして局所的免疫抑制治療のために所望される場合には病巣内投与により、投与される。非経口的注入としては、筋肉内、静脈内、関節内、腹腔内または皮下投与が挙げられる。さらに、アンタゴニストは、特に抗体の用量を減少して、パルス注入により適切に投与される。好ましくは、用量投与は、一部は投与が短期であるかまたは長期であるかによって、注射により、最も好ましくは静脈内または皮下注射により施される。

【０７３０】

別の例では、ＦｃＲＨ５アンタゴニスト化合物は、局所的に、例えば障害または腫瘍の位置が許す場合は、直接注射により投与され、そして注射は定期的に反復され得る。ＦｃＲＨ５アンタゴニストはさらにまた、局所的再発または転移を防止するかまたは提言するために、対象に全身的に、あるいは腫瘍細胞に直接的に、例えば腫瘍または種用の外科的切除後の腫瘍床に送達され得る。

【０７３１】
組合せた治療薬の投与は、典型的には、限定期間（通常は、選択される組合せによって、分、時間、日または週）実行される。併用療法は、逐次的方法でのこれらの治療薬の投与（すなわち、この場合、各治療薬は異なる時間に投与される）、ならびに実質的に同時方式での、これらの治療薬、または治療薬のうちの少なくとも２つの投与を包含するよう意図される。
【０７３２】
治療薬は、同一経路により、または異なる経路により、投与され得る。例えば、組合せにおける抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は静脈内注射により投与され得、一方組合せた化学療法薬は経口的に投与され得る。代替的には、例えば、特定の治療薬によって、治療薬の両方が経口的に投与されるか、あるいは両治療薬は静脈内注射により投与され得る。治療薬が投与される順序も、具体的作用物質によって変わる。
【０７３３】
例えば１つ以上の別個の投与によるか、あるいは連続注入によるかにかかわらず、疾患の種類および重症度によって、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの各治療薬が、患者への投与のための初回候補投与量である。典型的な１日投与量は、上記因子によって、約１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の範囲であり得る。数日間またはそれ以上に亘る反復投与に関しては、条件によって、上記の方法により測定した場合に癌が処置されるまで、処置は持続される。しかしながら、他の投与量レジメンが有用なこともある。
【０７３４】
本発明の適用は、遺伝子両方による抗ＦｃＲＨ５抗体の投与を意図する。例えば、細胞内抗体を産生するための遺伝子療法の使用に関するＷＯ９６／０７３２１（１９９６年３月１４日公開）を参照されたい。
【０７３５】
他の治療レジメンが、抗ＦｃＲＨ５抗体の投与と併用され得る。併用投与としては、別個の処方物または単一薬学的処方物を用いる同時投与、ならびにいずれかの順序での連続投与（この場合、好ましくは、その間に、両方の（またはすべての）活性作用物質が同時にそれらの生物学的活性を発揮する期間がある）が挙げられる。好ましくは、このような併用療法は、相乗的治療効果を生じる。
【０７３６】
単数または複数の抗ＦｃＲＨ５抗体の投与と、特定の癌に関連した別の腫瘍抗原に対して向けられる抗体の投与を組合せることも望ましい。
【０７３７】
別の実施形態では、本発明の治療的処置方法は、抗ＦｃＲＨ５抗体（単数または複数）、ならびに１つ以上の化学療法薬または阻害剤の併用投与、例えば異なる化学療法薬または他の細胞傷害性物質（単数または複数）あるいは腫瘍増殖も抑制する他の治療薬（単数または複数）のカクテルの同時投与を包含する。化学療法薬としては、リン酸エストラムスチン、プレドニムスチン、シスプラチン、５－フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドキセタキセル）および／またはアントラサイクリン抗生物質が挙げられる。このような化学療法薬に関する調製および用量投与スケジュールは、メーカーの使用説明書に従って、あるいは熟練従事者により経験的に決定されるように用いられ得る。このような化学療法薬の調製および用量投与スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。抗体は、抗ホルモン性化合物：例えば抗エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン；抗プロゲステロン、例えばオナプリストン（欧州特許第６１６８１２号参照）；または抗アンドロゲン、例えばフルタミドと、このような分子に関して既知の投与量で、組合され得る。処置されるべき癌がアンドロゲン非依存性癌である場合、患者は予め抗アンドロゲン療法を施され、癌がアンドロゲン非依存性になった後、抗ＦｃＲＨ５抗体（そして任意に本明細書中に記

載されるような他の作用物質）が患者に投与され得る。

【０７３８】

時として、心臓保護剤（療法に伴う心筋機能不全を防止するかまたは低減するため）または１つ以上のサイトカインを同時投与することも有益であり得る。上記の治療レジメンのほかに、癌細胞の外科的除去および／または放射線療法（例えば、外部放射線照射または放射能標識物質、例えば抗体を用いた療法）を、抗体療法の前に、同時に、または後に、患者は施され得る。上記同時投与作用物質のいずれかに関する適切な投与量は、現在用いられているものであり、そして作用物質および抗ＦｃＲＨ５抗体の併用作用（相乗的）のために低減されることもある。

【０７３９】

本発明の抗体組成物は、良好な医療実施と一致する方式で、処方され、用量され、投与され得る。この状況で考慮すべき因子としては、処置されている特定の障害、作用物質の送達部位、投与方法、投与スケジュール、ならびに医療従事者に既知のその他の因子が挙げられる。抗体はその必要はないが、しかし任意に、当該障害を防止するかまたは治療するために一般に用いられる１つ以上の作用物質とともに処方される。このような他の作用物質の有効量は、処方物中に存在する本発明の抗体の量、障害または処置の種類、ならびに上記の他の因子によって決まる。これらは一般的に、前記本明細書中で用いたものと同一投与量で、そして同様の投与経路で、あるいは前記本明細書中で用いられた投与量の約１～９９％で、用いられる。

【０７４０】

疾患の防止または治療のために、投与量および投与方式は、既知の判定基準に従って医師により選択される。抗体の適切な投与量は、上記のような処置されるべき疾患の種類、疾患の重症度および経過、抗体が予防目的で投与されるのか、治療目的か、過去の療法、患者の臨床歴および抗体に対する応答、ならびに担当医師の判断によって決まる。抗体は、１回で、または一連の処置を通して、患者に適切に投与される。好ましくは、抗体は、静脈内注入により、または皮下注射により、投与される。疾患の種類および重症度によって、約１μｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／体重１ｋｇ（例えば、約０．１～１５ｍｇ／ｋｇ／用量投与）の抗体が、１回以上の別個の投与によるか、あるいは連続注入によるかにかかわらず、患者への投与のための初回候補投与量である。用量投与レジメンは、初回負荷用量約４ｍｇ／ｋｇ、その後、毎週維持用量約２ｍｇ／ｋｇの抗ＦｃＲＨ５抗体を投与することを包含し得る。しかしながら、他の投与量レジメンも有用であり得る。典型的１日投与量は、上記の因子によって、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の範囲であり得る。数日以上に亘る反復投与に関しては、条件によって、処置は疾患症候の所望の抑制が生じるまで、持続される。この療法の進行は、慣用的方法および検定により、医師または他の当業者に既知の判定基準に基づいて、容易にモニタリングされ得る。

【０７４１】

患者への抗体タンパク質の投与のほかに、本出願は、遺伝子療法による抗体の投与を意図する。抗体をコードする核酸のこのような投与は、「治療的有効量の抗体を投与する」という表現に包含される。細胞内抗体を産生するための遺伝子療法の使用に関しては、例えば、ＷＯ９６／０７３２１（１９９６年3月１４日公開）を参照されたい。

【０７４２】

患者の細胞に核酸（任意にベクター中に含入される）を運ぶためには、in vivoとex-vivoの主に２つのアプローチがある。in vivo送達に関しては、核酸は、患者に、通常は、抗体が必要とされる部位に、直接注入される。Ex-vivo処置に関しては、患者の細胞が取り出され、核酸がこれらの単離細胞中に導入され、そして修飾化細胞が、患者に直接的に注入されるか、または例えば多孔性膜内に封入されて、これが患者に植え込まれる（例えば、米国特許第４，８９２，５３８号および第５，２８３，１８７号参照）。生きている細胞中に核酸を導入するために利用可能な種々の技法がある。技法は、核酸がin vitroで培養細胞中に移されるか、あるいは意図された宿主の細胞にin vivoで移されるかによって変わる。in vitroで哺乳類細胞中に核酸を運搬するのに適した技法としては、リポソー

ムの使用、電気穿孔、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、燐酸カルシウム沈降法等がある。遺伝子のex-vivo送達のために一般に用いられるベクターは、レトロウイルスベクターである。

【０７４３】

一般的に好ましいin vivo核酸移入技法としては、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、Ｉ型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）ならびに脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介性移入のための有用な脂質は、例えばＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥおよびＤＣ－Ｃｈｏｌである）を用いたトランスフェクションが挙げられる。一般に既知の遺伝子標識および遺伝子療法プロトコールの再検討に関しては、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)を参照されたい。ＷＯ　９３／２５６７３およびそこに引用された参考文献も参照されたい。

【０７４４】

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、本明細書中の「抗体」の定義に包含される種々の形態で存在し得る。したがって、抗体は、全長または無傷抗体、抗体断片、ネイティブ配列抗体またはアミノ酸変異体、ヒト化、キメラまたは融合抗体、免疫接合体、ならびにその機能的断片を包含する。融合抗体では、抗体配列は異種ポリペプチド配列と融合される。抗体は、Ｆｃ領域で修飾されて、所望のエフェクター機能を提供し得る。本明細書中の節で詳細に考察されているように、適切なＦｃ領域を用いて、細胞表面に結合された裸抗体は、例えば抗体依存性細胞性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を介して、または補体依存性細胞傷害性において補体を動員することにより、または他のいくつかの機序により、細胞傷害性を誘導し得る。代替的には、副作用または治療的合併症を最小限にするために、エフェクター機能を排除するかまたは低減することが望ましい場合、ある種の他のＦｃ領域が用いられ得る。

【０７４５】

一実施形態では、抗体は本発明の抗体と同一のエピトープとの結合にまたは実質的に結合することに関して競合する。本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体の生物学的特質、例えば具体的にはin vivo腫瘍ターゲッティングおよび任意の細胞増殖抑制または細胞傷害特質を有する抗体も意図される。

【０７４６】

上記抗体を産生する方法は、本明細書中で詳細に記載されている。

【０７４７】

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体は、ＦｃＲＨ５発現癌を処置するために、または哺乳類における癌の１つ以上の症候を緩和するために有用である。このような癌としては、造血系癌または血液関連癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されず、脾臓の癌およびリンパ節の癌も含まれる。癌のさらに特定の例としては、Ｂ細胞関連癌、例えば高度、中等度および低度リンパ腫（例えば、Ｂ細胞リンパ腫、例えば粘膜関連リンパ組織Ｂ細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、び漫性大細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ならびにホジキンリンパ腫およびＴ細胞リンパ腫）、ならびに白血病（例えば二次性白血病、慢性リンパ性白血病、例えばＢ細胞白血病（ＣＤ５＋Ｂリンパ球）、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病および骨髄形成異常）、ならびにその他の血液学的および／またはＢ細胞またはＴ細胞関連癌が挙げられる。癌は、前記のいずれの転移性癌をも包含する。抗体は、哺乳類においてＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現する癌細胞の少なくとも一部と結合し得る。好ましい一実施形態では、抗体は、ＦｃＲＨ５発現腫瘍細胞を破壊するかまたは殺害するのに、あるいは、細胞上のＦｃＲＨ５ポリペプチドとの結合時に、in vitroまたはin vivoで、このような腫瘍細胞の増殖を抑制するのに有効である。このような抗体としては、裸抗ＦｃＲＨ５抗体（如何なる作用物質とも接合されない）が挙げられる。細胞傷害性または細胞増殖抑制特性を有する裸抗体は、さらに、細胞傷害性物質と繋がれて、腫瘍細胞崩壊をより強力にされる。細胞傷害特性は、例えば抗体

を細胞傷害性物質と接合して、本明細書中に記載されるような免疫接合体を形成することにより、抗ＦｃＲＨ５抗体に付与される。細胞傷害性物質または増殖阻害剤は、好ましくは小分子である。毒素、例えばカリケアマイシンまたはマイタンシノイドおよびそれ類似体または誘導体が好ましい。

【０７４８】

本発明は、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体ならびに担体を含む組成物を提供する。癌を処置する目的のために、組成物は、このような処置を必要とする患者に投与され得るが、この場合、組成物は、免疫接合体として、または裸抗体として存在する１つ以上の抗ＦｃＲＨ５抗体を含み得る。さらなる一実施形態では、組成物は、これらの抗体を、他の治療薬、例えば細胞傷害性物質または増殖阻害剤、例えば化学療法薬と組合せて含み得る。本発明は、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体、ならびに担体を含む処方物も提供する。一実施形態では、処方物は、製薬上許容可能な担体を含む治療用処方物である。

【０７４９】

本発明の別の態様は、抗ＦｃＲＨ５抗体をコードする単離核酸である。ＨおよびＬ鎖の両方、特に、超可変領域残基、ネイティブ配列抗体ならびに変異体、修飾およびヒト化バージョンの抗体をコードする鎖をコードする核酸が包含される。

【０７５０】

本発明は、ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現癌を処置するために、または哺乳類における癌の１つ以上の症候を緩和するために有用な方法であって、治療的有効量の抗ＦｃＲＨ５抗体を哺乳動物に投与することを包含する方法も提供する。抗体治療用組成物は、医師により指図されるように、短期間（急性）または長期間、あるいは間欠的に投与され得る。ＦｃＲＨ５ポリペプチド発現細胞の増殖を抑制し、それを殺害する方法も提供される。

【０７５１】

本発明は、少なくとも１つの抗ＦｃＲＨ５抗体を含むキットおよび製品も提供する。抗ＦｃＲＨ５抗体を含有するキットは、例えばＦｃＲＨ５細胞殺害検定のために、細胞からのＦｃＲＨ５ポリペプチドの精製または免疫沈降のために、用途を見出す。例えば、ＦｃＲＨ５の単離および精製のために、キットは、ビーズ（例えばセファロースビーズ）と結合された抗ＦｃＲＨ５抗体を含有し得る。例えばＥＬＩＳＡまたはウェスタンブロットにおける、in vitroでのＦｃＲＨ５の検出および定量のための抗体を含有するキットが提供される。検出のために有用なこのような抗体は、蛍光または放射能標識のような標識とともに提供され得る。

【０７５２】

Ｉ．　抗体－薬剤接合体治療

本発明の抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）は、例えば腫瘍抗原の過剰発現により特徴づけられる種々の疾患または障害を処置するために用いられ得ることが意図される。例となる症状または過剰増殖性障害としては、良性または悪性腫瘍：白血病およびリンパ性悪性腫瘍が挙げられる。他の例としては、ニューロン、神経膠、星状細胞、視床下部、腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胞胚腔性、炎症性、血管新生性、免疫学的、例えば自己免疫の障害が挙げられる。

【０７５３】

動物モデルおよび細胞ベースの検定において特定されるＡＤＣ化合物は、さらに、腫瘍保有高等霊長類およびヒト臨床試験で検査され得る。ヒト臨床試験は、Ｂ細胞増殖性障害、例えば、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫（これらに限定されない）の病歴がある患者における本発明の抗ＦｃＲＨ５モノクローナル抗体または免疫複合体の効力を試験するよう意図され得る。臨床試験は、既知の治療レジメン、例えば放射線および／または化学療法（既知の化学療法薬および／または細胞傷害性物質を含めて）と組合せたＡＤＣの効力を評価するよう意図され得る。

【０７５４】
一般的に、処置されるべき疾患または障害は、過増殖性疾患、例えばＢ細胞増殖性障害および／またはＢ細胞癌である。本明細書中で処置されるべき癌の例としては、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫（これらに限定されない）から選択されるＢ細胞増殖性障害が挙げられる。
【０７５５】
癌は、本発明のＡＤＣが癌細胞と結合し得るよう、ＦｃＲＨ５発現細胞を含み得る。癌におけるＦｃＲＨ５発現を確定するために、種々の診断／予後検定が利用可能である。一実施形態では、ＦｃＲＨ５過剰発現は、ＩＨＣにより分析され得る。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片はＩＨＣ検定に付されて、検査される腫瘍細胞の染色程度および比率に関して、ＦｃＲＨ５タンパク質染色強度判定基準を付与される。
【０７５６】
疾患の予防または治療に関して、ＡＤＣの適切な投与量は、上記のように、処置されるべき疾患の種類、疾患の重症度および経過、抗体が予防目的で投与されるのか、治療目的か、過去の療法、患者の臨床歴および抗体に対する応答、ならびに担当医師の判断によって決まる。分子は、１回で、または一連の処置を通して、患者に適切に投与される。疾患の種類および重症度によって、約１μｇ／ｋｇ～約１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）の分子が、例えば１回以上の別個の投与によるか、あるいは連続注入によるかにかかわらず、患者への投与のための初回候補投与量である。典型的１日投与量は、上記の因子によって、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の範囲であり得る。患者に投与されるべきＡＤＣの例となる投与量は、約０．１～約１０ｍｇ／患者の体重１ｋｇの範囲である。
【０７５７】
数日以上に亘る反復投与に関しては、条件によって、処置は疾患症候の所望の抑制が生じるまで、持続される。用量投与レジメンの一例は、初回負荷用量約４ｍｇ／ｋｇ、その後の毎週保持用量　約２ｍｇ／ｋｇの抗ＦｃＲＨ５抗体を投与することを包含する。他の投与量レジメンが有用なこともある。この療法の進行は、慣用的技法および検定により、容易にモニタリングされ得る。
【０７５８】
Ｊ．　併用療法
本発明の抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）は、薬学的組合せ処方物中で、あるいは併用療法としての用量投与レジメンにおいて、抗癌特性を有する第二の化合物と組合され得る。薬学的組合せ処方物または用量投与レジメンの第二の化合物は、好ましくは、それらが互いに悪影響を及ぼさないよう、組合せのＡＤＣに対する相補的活性を有する。
【０７５９】
第二の化合物は、化学療法薬、細胞傷害性物質、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤および／または心臓保護剤を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で、組合せて適切に存在する。本発明のＡＤＣを含有する薬学的組成物は、治療的有効量の化学療法薬、例えばチューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤またはＤＮＡ結合剤も有し得る。
【０７６０】
一態様では、第一の化合物は本発明の抗ＦｃＲＨ５ＡＤＣであり、第二の化合物は抗ＣＤ２０抗体（裸抗体またはＡＤＣ）である。一実施形態では、第二の化合物は抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ（リツキサン（登録商標）または２Ｈ７（Genentech, Inc., South San Francisco, CA）である。本発明の抗ＦｃＲＨ５ＡＤＣとの併用免疫療法のために有用な別の抗体としては、ＶＥＧＦ（例えば、アバスチン（登録商標））が挙げられるが、これに限定されない。

【０７６１】
他の治療レジメンは、本発明に従って特定される抗癌性作因、例えば放射線療法、および／または骨髄および末梢血移植物、および／または細胞傷害性物質、化学療法薬、または増殖阻害剤（これらに限定されない）の投与と組合され得る。このような実施形態の１つでは、化学療法薬は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン（オンコビン（商標））、プレドニソロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰまたはＣＯＰ、あるいは免疫療法薬、例えば抗ＣＤ２０（例えばリツキサン（登録商標））または抗ＶＥＧＦ（例えばアバスチン（登録商標））のような作用物質または作用物質の組合せである。

【０７６２】
併用療法は、同時的または逐次的レジメンとして施される。逐次的に投与される場合、組合せは、２回以上の投与で投与され得る。組合せ投与は、同時投与、別個の処方物または単一薬学的処方物の使用、ならびにいずれかの順序での連続投与を含むが、この場合、好ましくは、その間に、両方の（またはすべての）活性作用物質が同時にそれらの生物学的活性を発揮する期間がある。

【０７６３】
一実施形態では、ＡＤＣによる処置は、本明細書中で特定される抗癌剤、および１つ以上の化学療法薬または増殖阻害剤の組合せ投与、例えば異なる治療薬のカクテルの同時投与を包含する。化学療法薬としては、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル）および／またはアントラサイクリン抗生物質が挙げられる。このような化学療法薬に関する調製および用量投与スケジュールは、メーカーの使用説明書に従って、あるいは熟練従事者により経験的に決定されるように用いられ得る。このような化学療法薬の調製および用量投与スケジュールは、“Chemotherapy Service”, (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Mdにも記載されている。

【０７６４】
上記同時投与剤のいずれに関する適切な投与量も、現在用いられているものであり、そして新規に特定された作用物質および他の化学療法薬または処置の併用作用（相乗的）のために低減されることもある。

【０７６５】
併用療法は、「相乗作用」を提供し、「相乗的」であることを立証し得る。すなわちその作用は、一緒に用いられた活性成分が、別個に化合物を用いて生じる作用の和より大きい場合に達成される作用である。相乗作用は、活性成分が：（１）併合単位投与量処方物中に同時処方され、同時的に投与され、または送達される場合；（２）交互にまたは別個の処方物と平行して送達される場合；あるいは（３）いくつかの他のレジメンによる場合に獲得され得る。交替療法で送達される場合、相乗作用は、例えば、別個の注射器での異なる注射により、化合物が逐次的に投与され、送達される場合に成し遂げられる。概して、交替療法中は、有効投与量各活性成分が逐次的に、すなわち、順次投与され、一方、併用療法では、有効投与量の２つ以上の活性成分が一緒に投与される。

【０７６６】
本発明の併用療法は、さらに、１つ以上の化学療法薬（単数または複数）を含み得る。組合せ投与は、同時投与または共存投与、別個の処方物または単一薬学的処方物の使用、ならびにいずれかの順序での連続投与を含むが、この場合、好ましくは、その間に、両方の（またはすべての）活性作用物質が同時にそれらの生物学的活性を発揮する期間がある。

【０７６７】
化学療法薬は、投与される場合、通常はその既知の投与量で投与され、任意に、抗代謝物質化学療法薬の投与に起因し得る薬剤の併合作用または負の副作用のため、低減される。このような化学療法薬に関する調製および用量投与スケジュールは、メーカーの使用説明書に従って、あるいは熟練従事者により経験的に決定されるように用いられ得る。

【０７６８】

組合され得る種々の化学療法薬が、本明細書中に開示される。

【０７６９】

いくつかの実施形態では、組合され得る化学療法薬は、免疫調節薬(ＩＭｉｄｓ)(例えば、サリドマイドおよびレブリミド（登録商標）(レナリドミド))、プロテオソーム阻害剤(例えば、ベルカド（登録商標）(ボルテゾミブ)およびＰＳ３４２)、boraタキソイド(例えば、ドセタキセルおよびパクリタキセル)、ビンカ(例えば、ビノレルビンまたはビンブラスチン)、プラチナ化合物(例えば、カルボプラチンまたはシスプラチン)、アロマターゼ阻害剤(例えば、レトロゾール、アナストラゾールまたはエキセメスタン)、抗エストロゲン(例えば、フルベストラントまたはタモキシフェン)、エトポシド、チオテパ、シクロホスファミド、ペメトレキセド、メトトレキサート、リポソーム・ドキソルビシン、ペギル化リポソーム・ドキソルビシン、カペシタビン、ゲンシタビン、メルタリン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ＣＯＸ－２阻害剤(例えば、セレコキシブ)、またはステロイド(例えば、デキサメタゾンおよびプレドニソン)からなる群から選択される。いくつかの実施形態(例えば、多発性骨髄腫の処置を包含する実施形態)では、デキサメタゾンおよびレナリドミド、またはデキサメタゾン、またはボルテゾミブ、またはビンクリスチン、ドキソルビシンおよびデキサメタゾン、またはサリドマイドおよびデキサメタゾン、またはリポソーム・ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびデキサメタゾン、またはレナリドミドおよびデキサメタゾン、またはボルテゾミブおよびデキサメタゾン、またはボルテゾミブ、ドキソルビシンおよびデキサメタゾンが組合される。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、組合されるべき化学療法薬は、レブリミド（登録商標）(レナリドミド))、プロテオソーム阻害剤(例えば、ベルカド（登録商標）(ボルテゾミブ)およびＰＳ３４２)、boraタキソイド(例えば、ドセタキセルおよびパクリタキセル)、ビンカ(例えば、ビノレルビンまたはビンブラスチン)、プラチナ化合物(例えば、カルボプラチンまたはシスプラチン)、アロマターゼ阻害剤(例えば、レトロゾール、アナストラゾールまたはエキセメスタン)、抗エストロゲン(例えば、フルベストラントまたはタモキシフェン)、エトポシド、チオテパ、シクロホスファミド、ペメトレキセド、メトトレキサート、リポソーム・ドキソルビシン、ペギル化リポソーム・ドキソルビシン、カペシタビン、ゲンシタビン、メルタリン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ＣＯＸ－２阻害剤(例えば、セレコキシブ)、またはステロイド(例えば、デキサメタゾンおよびプレドニソン)からなる群から選択される。

【０７７１】

いくつかの実施形態(例えば、悪性骨髄腫の処置を包含する実施形態)では、デキサメタゾンおよびレナリドミド、またはデキサメタゾンおよびボルテゾミブが組合される。

【０７７２】

他の一実施形態では、併用療法は、抗体または免疫接合体および１つより多い化学療法薬を含む。例えば、抗体または免疫接合体は、（ｉ）ビンクリスチン、ドキソルビシン（リポソーム性または非リポソーム性処方物中）およびデキサメタゾン；（ｉｉ）サリドマイドおよびデキサメタゾン；（ｉｉｉ）ベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）、ドキソルビシンおよびデキサメタゾン；（ｉｖ）ベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）、サリドマイドおよびデキサメタゾン；（ｖ）メルファランおよびプレドニソン；（ｖｉ）メルファラン、プレドニソンおよびサリドマイド；（ｖｉｉ）メルファラン、プレドニソンおよびベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）；（ｖｉｉｉ）ビンクリスチン、ドキソルビシンおよびデキサメタゾン；あるいは（ｉｘ）サリドマイドおよびデキサメタゾンと組合せられ得る。

【０７７３】

一実施形態では、併用療法は、本明細書中に記載される抗体または免疫接合体、ならびに（ｉ）ベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）、（ｉｉ）デキサメタゾン、（ｉｉｉ）レブリミド（登録商標）（レナリドミド）のうちの１つ以上を含み得る。別の実施形態では、併用療法は、抗体または免疫接合体、ならびにデキサメタゾンおよびレブリミド（登

録商標）（レナリドミド）の両方、またはベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）およびデキサメタゾンの両方を含む。他の一実施形態では、併用療法は、抗体または免疫接合体、ならびにベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）、デキサメタゾンおよびレブリミド（登録商標）（レナリドミド）の各々を含む。

【０７７４】

Ｋ．　製品およびキット

本発明の別の実施形態は、ＦｃＲＨ５発現癌の治療、予防および／または診断のために有用な物質を含有する製品である。製品は、容器、ならびに容器の上または容器に伴う標識または包装挿入物を含む。適切な容器としては、例えば瓶、バイアル、注射器等が挙げられる。容器は、種々の材料、例えばガラスまたはプラスチックから成形され得る。容器は、癌症状を治療し、予防し、および／または診断するために有効である組成物を保持し、そして滅菌性アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液袋、または皮下注射針により貫通可能な栓を有するバイアルである）。組成物中の少なくとも１つの活性作用物質は、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体である。標識または包装挿入物は、組成物が癌を処置するために用いられることを示す。標識または包装挿入物は、さらに、癌患者に抗体組成物を投与するための使用説明書を含む。付加的には、製品は、さらに、製薬上許容可能な緩衝液、例えば注射用の静菌性水（ＢＷＦＩ）、リン酸塩緩衝生理食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液を含む第二の容器を含み得る。それはさらに、商業的ならびにユーザーの見地から望ましいその他のもの、例えばその他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針および注射器を包含し得る。

【０７７５】

種々の目的のために、例えば、ＦｃＲＨ５発現細胞殺害検定のため、細胞からのＦｃＲＨ５ポリペプチドの精製または免疫沈降のために有用であるキットも提供される。ＦｃＲＨ５ポリペプチドの単離および精製のために、キットは、ビーズ（例えばセファロースビーズ）と結合された抗ＦｃＲＨ５抗体を含有し得る。例えばＥＬＩＳＡまたはウェスタンブロットにおける、in vitroでのＦｃＲＨ５の検出および定量のための抗体を含有するキットが提供される。製品の場合と同様に、キットは、容器、ならびに容器の上または容器に伴う標識または包装挿入物を含む。容器は、本発明の少なくとも１つの抗ＦｃＲＨ５抗体を含む組成物を保持する。例えば希釈液または緩衝液、対照抗体を含有する付加的抗体が包含され得る。標識または包装挿入物は、組成物についての記述、ならびに意図されたin vitroまたは検出用途に関する使用説明書を提供し得る。

【０７７６】

Ｌ．　ＦｃＲＨ５ポリペプチドに関する用途

本発明は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを模倣する（アゴニスト）、またはＦｃＲＨ５ポリペプチドの作用を防止する（アンタゴニスト）ものを特定するために化合物をスクリーニングする方法を包含する。アンタゴニスト薬剤候補に関するスクリーニング検定は、本明細書中で特定される遺伝子によりコードされるＦｃＲＨ５ポリペプチドを結合するかまたは錯化する、あるいは、そうでなければコードポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を妨害する、例えば細胞からのＦｃＲＨ５ポリペプチドの発現を抑制する化合物を特定するよう意図される。このようなスクリーニング検定は、化学物質ライブラリーの高処理量スクリーニングが容易にできて、小分子薬候補を特定するのに特に適するようにする検定を包含する。

【０７７７】

検定は、種々のフォーマットで、例えばタンパク質－タンパク質結合検定、生化学的スクリーニング検定、イムノアッセイ、および細胞ベースの検定（これらは当該技術分野で十分に特性化されている）で実施され得る。

【０７７８】

アンタゴニストに関する検定は全て、２つの化合物を相互作用させるのに十分な条件化で、十分な時間の間、薬剤候補と、本明細書中で特定される核酸によりコードされるＦｃＲＨ５ポリペプチドとを接触させることを必要とするという点で共通している。

【０７７９】
結合検定では、相互作用は結合であり、形成される錯体は反応混合物中で単離され、検出され得る。特定の一実施形態では、本明細書中で特定される遺伝子によりコードされるＦｃＲＨ５ポリペプチド、または薬剤候補は、共有的または非共有的結合により、固相上に、例えば微量滴定プレート上に固定される。非共有結合は、一般的に、固体表面をＦｃＲＨ５ポリペプチドの溶液で被覆し、乾燥することにより成し遂げられる。代替的には、固定されるべきＦｃＲＨ５ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体は、それを固体表面に固着するために用いられ得る。検定は、非固定化構成成分（検出可能標識により標識され得る）を、固定化構成成分、例えば固着構成成分を含有する被覆表面に付加することにより実施される。反応が完了したら、非反応構成成分は、例えば線状により除去され、固体表面に固着された錯体が検出される。元々の固定化構成成分が検出可能標識を保有する場合、表面に固定された標識の検出は、錯体形成が起きたことを示す。元々の非固定化構成成分が標識を保有しない場合、例えば、固定化索体を特異的に結合する標識化抗体を用いることにより、錯体形成が検出され得る。

【０７８０】
候補化合物が、本明細書中で特定される遺伝子によりコードされる特定のＦｃＲＨ５ポリペプチドと相互反応するが、結合しない場合、そのポリペプチドとのその相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用を検出することがよく知られた方法により、検定され得る。このような検定としては、伝統的アプローチ、例えば架橋、同時免疫沈降、ならびに勾配またはクロマトグラフィーカラムによる同時精製が挙げられる。さらに、タンパク質－タンパク質相互作用は、Fields and co-workers (Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989)；Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991))により記載され、Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)により開示されたような酵母ベースの遺伝子系を用いることにより、モニタリングされ得る。多くの転写活性剤、例えば酵母ＧＡＬ４は、２つの物理的に異なるモジュラードメイン（すなわち、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する）からなる。上記の出版物に記載された酵母発現系（一般的に「２－ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性を利用し、２つのハイブリッドタンパク質（一方は、標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインと融合され、もう一つは、候補活性化タンパク質が活性化ドメインと融合される）を用いる。ＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下でのＧＡＬ１－ｌａｃＺレポーター遺伝子の発現は、タンパク質－タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成によって決まる。相互作用ポリペプチドを含有するコロニーは、β－ガラクトシダーゼに対する色素産生基質で検出される。２－ハイブリッド技法を用いる２つの特定タンパク質間のタンパク質－タンパク質相互作用を特定するための完全キット（ＭＡＴＣＨＭＡＫＥＲ（商標））は、Clonetechから市販されている。この系は、特定タンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインをマッピングするために、ならびにこれらの相互作用に重要なアミノ酸残基を特定するためにも、拡張され得る。

【０７８１】
本明細書中で特定されるＦｃＲＨ５ポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内または細胞外構成成分との相互作用を妨げる化合物は、以下のように試験され得る：通常、遺伝子の産物ならびに細胞内または細胞外構成成分を含有する反応混合物が、２つの産物の相互作用および結合を可能にする条件化で、それを可能にする時間の間、調製される。結合を抑制する候補化合物の能力を試験するために、反応は、試験化合物の非存在下および存在下で実行される。さらに、プラセボが第三の反応混合物に付加され得、陽性対照としての働きをする。混合物中に存在する試験化合物と細胞内または細胞外構成成分との結合（錯体形成）は、本明細書中で上記したようにモニタリングされる。対照反応（単数または複数）では錯体が形成されるが、試験化合物を含有する反応混合物中では形成されないことは、試験化合物が試験化合物とその反応相手との相互作用を妨げることを示す。

【０７８２】

アンタゴニストに関して検定するために、特定の活性に関してスクリーニングされるべき化合物とともに、ＦｃＲＨ５ポリペプチドが細胞に付加され、そして、ＦｃＲＨ５ポリペプチドの存在下で当該活性を抑制する化合物の能力は、化合物がＦｃＲＨ５ポリペプチドに対するアンタゴニストであることを示す。代替的には、アンタゴニストは、競合的抑制検定のための適切な条件下で、ＦｃＲＨ５ポリペプチドおよび潜在的アンタゴニストを、膜結合ＦｃＲＨ５ポリペプチド受容体または組換え受容体と組合せることにより検出され得る。受容体と結合されるＦｃＲＨ５ポリペプチド分子の数が潜在的アンタゴニストの有効性を確定するために用いられ得るよう、ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、例えば放射能により標識され得る。受容体をコードする遺伝子は、当業者に知られている多数の方法、例えばリガンドパニングおよびＦＡＣＳ選別により、特定され得る（Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)）。好ましくは、ポリアデニル化ＲＮＡがＦｃＲＨ５ポリペプチドに応答性の細胞から調製され、このＲＮＡから作製されるｃＤＮＡライブラリーがプールに分けられて、ＣＯＳ細胞またはＦｃＲＨ５ポリペプチドに応答性でない他の細胞をトランスフェクトするために用いられる発現クローニングが用いられる。ガラススライド上で増殖されるトランスフェクト化細胞は、標識化ＦｃＲＨ５ポリペプチドに曝露される。ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、部位特異的プロテインキナーゼに関する認識部位のヨウ素化または含入を含めた種々の手段により標識され得る。固定およびインキュベーション後、スライドはオートラジオグラフィー分析に付される。陽性プールが特定され、サブプールが調製され、相互作用的サブプール化および再スクリーニング工程を用いて再トランスフェクトされ、最後は、推定受容体をコードする単一クローンを産生する。

【０７８３】

受容体特定のための代替的アプローチとして、標識化ＦｃＲＨ５ポリペプチドは、細胞膜または受容体分子を発現する抽出調製物と光親和性連結され得る。架橋物質は、ＰＡＧＥにより分割され、Ｘ線フィルムに曝露される。受容体を含有する標識化錯体は、切り出され、ペプチド断片に分割され、タンパク質マイクロ配列決定に付される。マイクロシーケンシングから得られたアミノ酸配列は、推定受容体をコードする遺伝子を特定するためのｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするよう、一組の縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計するために用いられる。

【０７８４】

アンタゴニストに関する別の検定では、哺乳類細胞、または受容体を発現する膜調製物は、候補化合物の存在下で標識化ＦｃＲＨ５ポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この相互作用を増強するかまたは遮断する化合物の能力が測定され得る。

【０７８５】

潜在的アンタゴニストのさらに具体的な例としては、免疫グロブリンとＦｃＲＨ５ポリペプチドとの融合物に結合するオリゴヌクレオチド、特に抗体が挙げられ、ポリーおよびモノクローナル抗体および抗体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、およびこのような抗体または断片のキメラまたはヒト化バージョン、ならびにヒト抗体および抗体断片を含むが、これらに限定されない。代替的には、潜在的アンタゴニストは、密接に関連するタンパク質、例えば受容体を認識するがしかし作用を付与せず、それによりＦｃＲＨ５ポリペプチドの作用を競合的に抑制する突然変異化型のＦｃＲＨ５ポリペプチドであり得る。

【０７８６】

本明細書中で特定されるＦｃＲＨ５ポリペプチドを、ならびに本明細書中の上記で開示されたスクリーニング検定により特定される他の分子を特異的に結合する抗体は、薬学的組成物の形態で、種々の障害、例えば癌の治療のために投与され得る。

【０７８７】

ＦｃＲＨ５ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかしながら、リポフェクションまたはリポソームも用いられて、抗体または抗体断片を細胞中に送達し得る。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の

結合ドメインと特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列を基礎にして、標的タンパク質配列を結合する能力を保持するペプチド分子が意図され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得るか、および／または組換えＤＮＡ技術により産生され得る（例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)参照）。

【０７８８】

本明細書中の処方物は、処置されている特定の適応症のために必要とされる場合、１つより多くの活性化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有し得る。代替的には、またはさらに、組成物は、その機能を増強する作用物質、例えば細胞傷害性物質、サイトカイン、化学療法薬または増殖阻害剤を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で、組合せ中に適切に存在する。

【０７８９】

Ｍ．　抗体誘導体

本発明の抗体は、さらに、当該技術分野で知られており、容易に入手可能である付加的非タンパク質様部分を含有するよう修飾され得る。好ましくは、抗体の誘導体化のために適した部分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定例としては、以下のものが挙げられる：ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマー)、およびデキストランまたはポリ(ｎ－ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド・コポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにその混合物。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量を有し得、分枝鎖または非分枝鎖であり得る。抗体に結合されるポリマーの数は変わり得、もし１つより多くのポリマーが結合される場合、それらは同一または異なる分子であり得る。概して、誘導体化のために用いられるポリマーの数および／または種類は、抗体誘導体が限定条件下で治療に用いられるか等にかかわらず、改良されるべき抗体の特定の特性または機能（これらに限定されない）を含めた考察に基づいて確定される。

【０７９０】

Ｎ．　スクリーニング方法

本発明のさらに別の実施形態は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを含有することが疑われる試料中のＦｃＲＨ５ポリペプチドの存在を確定する方法であって、ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合するその抗体薬剤接合体に試料を曝露すること、そしてその抗体薬剤接合体と試料中のＦｃＲＨ５ポリペプチドとの結合を確定すること（ここで、このような結合の存在は、試料中のＦｃＲＨ５ポリペプチドの存在を示す）を包含する方法に向けられる。任意に、試料は、ＦｃＲＨ５ポリペプチドを発現すると思われる細胞（癌細胞であり得る）を含有し得る。当該方法に用いられるその抗体薬剤接合体は、任意に、検出可能的に標識され、固体支持体等に結合される。

【０７９１】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、（ａ）哺乳動物から得られる組織細胞を含む試験試料を、ＦｃＲＨ５ポリペプチドと結合するその抗体薬剤接合体と接触させること、ならびに（ｂ）その抗体薬剤接合体と試験試料中のＦｃＲＨ５ポリペプチドとの間の錯体の形成を検出することを包含する方法に向けられる。その抗体薬剤接合体は、検出可能的に標識され、固体支持体等と結合され、および／または組織細胞の試験試料が、癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

【０７９２】

ＩＶ．　抗ＦｃＲＨ５抗体および免疫接合体のさらなる使用方法

Ａ．　診断方法および検出方法

一態様では、本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体および免疫接合体は、生物学的試料中のＦｃＲＨ５の存在を検出するために有用である。「検出する」という用語は、本明細書中で用いる場合、定量的または定性的検出を包含する。ある実施形態では、生物学的試料は、細胞または組織を含む。ある実施形態では、このような組織としては、正常、および／または他の組織に比して高レベルでＦｃＲＨ５を発現する癌性組織、例えばＢ細胞および／またはＢ細胞関連組織が挙げられる。

【０７９３】

一態様では、本発明は、生物学的試料中のＦｃＲＨ５の存在を検出する方法を提供する。ある実施形態では、当該方法は、生物学的試料を、抗ＦｃＲＨ５抗体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下で抗ＦｃＲＨ５抗体と接触し、そして抗ＦｃＲＨ５抗体およびＦｃＲＨ５間に錯体が形成されるか否かを検出することを包含する方法を提供する。

【０７９４】

一態様では、本発明は、ＦｃＲＨ５の発現増大と関連する障害の診断方法を提供する。ある実施形態では、当該方法は、試験細胞を抗ＦｃＲＨ５抗体と接触させること；抗ＦｃＲＨ５抗体とＦｃＲＨ５との結合を検出することにより試験細胞によるＦｃＲＨ５の発現のレベル（定量的または定性的に）を確定すること；そして試験細胞によるＦｃＲＨ５の発現のレベルを、対照細胞（例えば、標的細胞と同一組織起源の正常細胞、あるいはこのような正常細胞に匹敵するレベルでＦｃＲＨ５を発現する細胞）によるＦｃＲＨ５の発現のレベルと比較することを包含する方法を提供するし、ここで、対照細胞と比較して高レベルのＦｃＲＨ５発現は、ＦｃＲＨ５発現の増大と関連する障害の存在を示す。ある実施形態では、試験細胞は、ＦｃＲＨ５の発現増大に関連した障害を有すると思われる個体から得られる。ある実施形態では、障害は、細胞増殖性障害、例えば癌または腫瘍である。

【０７９５】

本発明の抗体を用いて診断され得る細胞増殖性障害の例としては、Ｂ細胞障害および／またはＢ細胞増殖性障害、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫（これらに限定されない）が挙げられる。

【０７９６】

ある実施形態では、例えば上記のような診断または検出方法は、抗ＦｃＲＨ５抗体と、細胞の表面または祖の表面にＦｃＲＨ５を発現する細胞から得られる膜調製物中で発現されるＦｃＲＨ５戸の結合を検出することを包含する。ある実施形態では、当該方法は、抗ＦｃＲＨ５抗体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下で、細胞を抗ＦｃＲＨ５抗体と接触させること、そして抗ＦｃＲＨ５抗体と細胞表面のＦｃＲＨ５との間に錯体が形成されたか否かを検出することを包含する。抗ＦｃＲＨ５抗体と細胞表面で発現されるＦｃＲＨ５との結合を検出するための例となる検定は、「ＦＡＣＳ」検定である。

【０７９７】

ある種の他の方法が、抗ＦｃＲＨ５抗体とＦｃＲＨ５との結合を検出するために用いられ得る。このような方法としては、当該技術分野で周知である抗原結合検定、例えばウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降検定、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイおよび免疫組織化学（ＩＨＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７９８】

ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は標識される。標識としては、標識、または直接的に検出される部分（例えば、蛍光性、色原性、高電子密度性、化学発光性および放射性レベル）、ならびに、例えば酵素反応または分子相互作用により、間接的に検出される、酵素またはリガンドのような部分が挙げられるが、これらに限定されない。標識の例としては、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈおよび^{131}Ｉ、蛍光体、例えば希土類キレート化合物またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導

体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４７３７４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリ性ホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ライソザイム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、複素環式オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ（ＨＲＰのような染料前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素と結合される）、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定遊離ラジカル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７９９】

ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、不溶性マトリックス上に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままである任意のＦｃＲＨ５から抗ＦｃＲＨ５抗体を分離することを伴う。これは、慣用的には、水不溶性マトリックスまたは表面への吸着による（Bennich et al.、米国特許第３，７２０，７６０号）ように、検定手順前に抗ＦｃＲＨ５抗体を不溶性にすることにより、あるいは共有結合することにより（例えば、グルタルアルデヒド架橋を用いて）、あるいは抗ＦｃＲＨ５抗体およびＦｃＲＨ５間に錯体を形成後に抗ＦｃＲＨ５抗体を不溶性にすることにより、例えば、免疫沈降により、成し遂げられ得る。

【０８００】

診断または検出の上記実施形態のいずれも、抗ＦｃＲＨ５抗体の代わりに、またはそのほかに、本発明の免疫接合体を用いて実行され得る。

【０８０１】

Ｂ．　治療方法

本発明の抗体または免疫接合体は、例えば、in vitro、ex-vivoおよびin vivo治療方法で用いられ得る。一態様では、本発明は、in vivoまたはin vitroで細胞の成長または増殖を抑制する方法であって、免疫接合体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下で、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体に細胞を曝露することを包含する方法を提供する。「細胞の成長または増殖を抑制する」は、細胞の成長または増殖を少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または１００％低減することを意味する。ある実施形態では、細胞は腫瘍細胞である。ある実施形態では、細胞はＢ細胞である。ある実施形態では、細胞は、例えば本明細書中で例示されるような異種移植片である。

【０８０２】

一態様では、本発明の抗体または免疫接合体は、Ｂ細胞増殖性障害を治療または予防するために用いられる。ある実施形態では、細胞増殖性障害は、ＦｃＲＨ５の発現および／または活性増大と関連する。例えば、ある実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は、Ｂ細胞の表面でのＦｃＲＨ５の発現増大と関連する。ある実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は腫瘍または癌である。本発明の抗体または免疫接合体により治療されるべきＢ細胞増殖性障害の例としては、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８０３】

一態様では、本発明は、Ｂ細胞増殖性障害の治療方法であって、有効量の抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体を個体に投与することを包含する方法を提供する。ある実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害の治療方法は、抗ＦｃＲＨ５抗体または抗ＦｃＲＨ５免疫接合体、および任意に少なくとも１つの付加的治療薬、例えば以下で提示されるものを含む有効量の薬学的処方物を、個体に投与することを包含する。ある実施形態では、細胞増殖性障害の治療方法は、１）抗ＦｃＲＨ５抗体および細胞傷害性物質を含む免疫接合体、そし

て任意に、２)少なくとも１つの付加的治療薬、例えば以下で提示されるものを含む有効量の薬学的処方物を、個体に投与することを包含する。

【０８０４】

一態様では、本発明の抗体または免疫接合体のうちの少なくともいくつかは、ヒト以外の種からのＦｃＲＨ５に結合し得る。したがって、本発明の抗体または免疫接合体を用いて、例えば、ヒトにおいて、または本発明の抗体または免疫接合体が交差反応するＦｃＲＨ５を有する他の哺乳動物（例えば、チンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよびアカゲザル、ブタまたはマウス）において、ＦｃＲＨ５を含有する細胞培養中で、ＦｃＲＨ５に結合し得る。一実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、免疫接合体の接合細胞毒素が細胞の内部に到達するよう、抗体または免疫接合体をＦｃＲＨ５と接触させて、抗体または免疫接合体－抗原錯体を形成することにより、Ｂ細胞上のＦｃＲＨ５を標的にするために用いられ得る。一実施形態では、ＦｃＲＨ５はヒトＦｃＲＨ５である。

【０８０５】

一実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、ＦｃＲＨ５発現および／または活性増大に関連した障害に罹患している個体におけるＦｃＲＨ５の結合方法であって、個体中のＦｃＲＨ５が結合されるよう、抗体または免疫接合体を個体に投与することを包含する方法に用いられ得る。一実施形態では、結合した抗体または免疫接合体は、ＦｃＲＨ５を発現するＢ細胞中に内在化される。一実施形態では、ＦｃＲＨ５はヒトＦｃＲＨ５であり、個体はヒト個体である。代替的には、個体は、抗ＦｃＲＨ５抗体が結合するＦｃＲＨ５を発現する哺乳動物であり得る。さらに、個体は、（例えば、ＦｃＲＨ５の投与により、またはＦｃＲＨ５をコードする導入遺伝子の発現により）ＦｃＲＨ５が導入された哺乳動物であり得る。

【０８０６】

抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、治療目的のためにヒトに投与され得る。さらに、抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、獣医学的目的のために、またはヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するＦｃＲＨ５を発現する非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、ラットまたはマウス）に投与され得る。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体または免疫接合体の治療効能を評価する（例えば、投与量および投与の時間経過の試験）ために有用であり得る。

【０８０７】

本発明の抗体または免疫接合体は、単独で、または他の組成物と組合せて、治療に用いられ得る。例えば、本発明の抗体または免疫接合体は、少なくとも１つの付加的治療薬および／またはアジュバントと同時投与され得る。ある実施形態では、付加的治療薬は、細胞傷害性物質、化学療法薬または増殖阻害剤である。このような実施形態のうちの１つにおいて、化学療法薬は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン（オンコビン（商標））、プレドニソロン、ＣＨＯＰ、ＣＶＰまたはＣＯＰ、あるいは免疫療法薬、例えば抗ＣＤ２０（例えばリツキサン（登録商標））または抗ＶＥＧＦ（例えばアバスチン（登録商標））のような作用物質または作用物質の組合せであって、ここで、併用療法は、癌および／またはＢ細胞障害、例えばＢ細胞増殖性障害、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、攻撃性ＮＨＬ、再発性攻撃性ＮＨＬ、再発性無痛性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性無痛性ＮＨＬ、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）およびマントル細胞リンパ腫の処置に有用である。

【０８０８】

上記のような併用療法は、組合せ投与（この場合、２つ以上の治療薬が同一のまたはべ湖の処方物中に含まれる）、および別個の投与（この場合、本発明の抗体または免疫接合体の投与は、付加的治療薬および／またはアジュバントの投与の前、同時的および／または後に生じる）を包含する。本発明の抗体または免疫接合体は、放射線療法と組合せても

用いられ得る。

【０８０９】

本発明の抗体または免疫接合体（および任意の付加的療法薬またはアジュバント）は、任意の適切な手段により、例えば、非経口、皮下、腹腔内、肺内および鼻内、そして局所的治療のために所望される場合には病巣内投与により、投与され得る。非経口的注入としては、筋肉内、静脈内、関節内、腹腔内または皮下投与が挙げられる。さらに、抗体または免疫接合体は、特に抗体または免疫接合体の用量を減少して、パルス注入により適切に投与される。用量投与は、一部は投与が短期であるかまたは長期であるかによって、注射により、例えば静脈内または皮下注射により、任意の適切な経路で施される。

【０８１０】

本発明に用いられる治療薬（例えば、本発明の抗体または免疫接合体）は、良好な医療実施と一致する方式で、処方され、用量され、投与され得る。この状況で考慮すべき因子としては、処置されている特定の障害、処置されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、作用物質の送達部位、投与方法、投与スケジュール、ならびに医療従事者に知られているその他の因子が挙げられる。抗体または免疫接合体はその必要はないが、しかし任意に、当該障害を防止するかまたは治療するために現在用いられている１つ以上の作用物質とともに処方される。このような他の作用物質の有効量は、処方物中に存在する本発明の抗体または免疫接合体の量、障害または処置の種類、ならびに上記の他の因子によって決まる。これらは一般的に、前記本明細書中で用いたものと同一投与量で、そして同様の投与経路で、あるいは前記本明細書中で用いられた投与量の約１～９９％で、あるいは適切であると経験的／臨床的に確定される任意の投与量および任意の経路で、用いられる。

【０８１１】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体または免疫接合体の適切な投与量は（単独で、または１つ以上の他の付加的治療薬、例えば化学療法薬と組合せて用いられる場合）、処置されるべき疾患の種類、抗体または免疫接合体の種類、疾患の重症度および経過、抗体または免疫接合体が予防目的で投与されるのか、治療目的か、過去の療法、患者の臨床歴および抗体または免疫接合体に対する応答、ならびに担当医師の判断によって決まる。抗体または免疫接合体は、１回で、または一連の処置を通して、患者に適切に投与される。疾患の種類および重症度によって、約１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）の抗体または免疫接合体が、例えば１回以上の別個の投与によるか、あるいは連続注入によるかにかかわらず、患者への投与のための初回候補投与量であり得る。典型的１日投与量は、上記の因子によって、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の範囲であり得る。数日以上に亘る反復投与に関しては、条件によって、処置は一般的に、疾患症候の所望の抑制が生じるまで、持続される。抗体または免疫接合体の例となる一投与量は、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。したがって、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇ（またはその任意の組合せ）の抗体または免疫接合体の１回以上の用量投与が、患者に施され得る。このような用量投与は、間欠的に、例えば毎週または３週間毎（例えば、約２～約２０、または例えば約６用量の抗体または免疫接合体を患者が摂取するように）、施され得る。初回高負荷用量と、その後の１回以上の低用量が、投与され得る。例となる用量投与レジメンは、約４ｍｇ／ｋｇの初回負荷用量と、その後の約２ｍｇ／ｋｇの抗体の毎週維持用量を投与することを包含する。しかしながら、他の投与量レジメンが有用なこともある。この療法の進行は、慣用的方法および検定により、容易にモニタリングされ得る。

【０８１２】

Ｃ．　活性検定

本発明の抗ＦｃＲＨ５抗体および免疫接合体は、それらの物理的／化学的特性、および／または生物学的活性に関して、当該技術分野で既知の種々の検定により特徴づけされ得る。

【０８１３】

１．　活性検定

一態様では、生物学的活性を有する抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体を特定するための検定が提供される。生物学的活性としては、例えば、細胞の成長または増殖を抑制する能力（例えば、「細胞殺害」活性）、または細胞死、例えばプログラムされ多細胞死（アポトーシス）を誘導する能力が挙げられ得る。in vivoおよび／またはin vitroでこのような生物学的活性を有する抗体または免疫接合体も提供される。

【０８１４】

ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体は、in vitroでの細胞の成長または増幅を抑制するその能力に関して試験される。細胞の成長または増殖の抑制に関する検定は、当該技術分野で周知である。本明細書中に記載される「細胞殺害」検定により例示される細胞増殖に関するある検定は、細胞生存度を測定する。このような検定の一つが、CellTiter-Glo（商標）発光細胞生存度検定であり、これは、Promega (Madison, WI)から市販されている。その検定は、代謝的活性細胞の指標であるＡＴＰの存在量に基づいて、培養中の生存可能細胞の数を確定する（Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第６６０２６７７号参照）。検定は、９６または３８４ウェル・フォーマットで実行されて、自動化高処理量スクリーニング（ＨＴＳ）を容易にする（Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404参照）。検定手順は、単一試薬（CellTiter-Glo（登録商標）試薬）を、培養細胞に直接付加することを包含する。これは、細胞溶解を引き起こし、ルシフェラーゼ反応により生成される発光シグナルを生じる。発光シグナルは、存在するＡＴＰの量に比例し、これは、培養中に存在する生存可能細胞の数に直接比例する。データは、ルミノメーターまたはＣＣＤカメラ画像処理装置により記録され得る。発光出力は、相対発光単位（ＲＬＵ）として表される。

【０８１５】

細胞増殖に関する別の検定は、ミトコンドリアレダクターゼによるフォルマザンへの３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミドの酸化を測定する比色検定である「ＭＴＴ」検定である。CellTiter-Glo（登録商標）検定と同様に、この検定は、細胞培養中に存在する代謝的活性細胞の数を示す（例えば、Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63、およびZhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882参照）。

【０８１６】

一態様では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、in vitroでの細胞死を誘導するその能力に関して試験される。細胞死の誘導に関する検定は、当該技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、このような検定は、例えばヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー（More et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11参照）または７ＡＡＤの取込みにより示されるような膜完全性の損失を測定する。例となるＰＩ取込み検定では、細胞は、ダルベッコの変法イーグル培地（Ｄ－ＭＥＭ）：ハムＦ１２（５０：５０）（１０％熱不活性化ＦＢＳ（Hyclone）および２ｍＭ　Ｌ－グルタミンを補足）中で培養される。したがって、検定は、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で実施される。細胞は、１００×２０ｍｍ皿中に3×10^{6}／皿の密度で植えつけられ、一晩結合させる。培地が除去され、新たな培地のみと、または種々の濃度の抗体または免疫接合体を含有する培地と取り替えられる。細胞は、３日間、インキュベートされる。処理後、単一層がＰＢＳで洗浄され、トリプシン処理により剥がされる。次いで、細胞は、４℃で５分間、１２００ｒｐｍで遠心分離され、ペレットが３ｍｌの冷Ca^{2+}結合緩衝液（１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ　７．４、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　$CaCl_2$）中に再懸濁されて、３５ｍｍ濾し蓋付き１２×７５管中にアリコート化（１ｍｌ／管、３管／処置群）して、細胞塊を取り出す。次いで、管に、ＰＩ（１０μｇ／ｍｌ）を入れる。試料は、ＦＡＣＳＣＡＮ（登録商標）フローサイトメトリーおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（登録商標）ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Becton Dickinson）を用いて分析され得る。ＰＩ取込みにより確定して、統計学的有意レベルの細胞死を誘導する抗体または免疫接合体が、このようにして

特定される。
【０８１７】
一態様では、抗ＦｃＲＨ５抗体または免疫接合体は、in vitroでアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導するその能力に関して試験される。アポトーシスを誘導する抗体または免疫接合体に関する例となる検定は、アネキシン結合検定である。例となるアネキシン検定では、細胞は、前段落で論じたように皿中で培養され、植えつけられる。培地が除去され、新たな培地のみと、または０．００１～１０μｇ／ｍｌの抗体または免疫接合体を含有する培地と取り替えられる。３日間のインキュベーション期間後、単一層がＰＢＳで洗浄され、トリプシン処理により剥がされる。次いで、細胞は、前段落で考察されたようにCa^{2+}結合緩衝液中に再懸濁され、試験管中にアリコート化される。次いで試験管に標識化アネキシン（例えば、アネキシンＶ－ＦＩＴＣ）（１μｇ／ｍｌ）を入れる。試料は、ＦＡＣＳＣＡＮ（登録商標）フローサイトメトリーおよびＦＡＣＳＣＯＮＶＥＲＴ（登録商標）ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Becton Dickinson）を用いて分析され得る。対照に比して統計学的に有意レベルのアネキシン結合を誘導する抗体または免疫接合体が、このようにして特定される。アポトーシスを誘導する抗体または免疫接合体に関する別の例となる検定は、ゲノムＤＮＡのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンＤＮＡ　ＥＬＩＳＡ比色検定である。このような検定は、例えば、細胞死検出ＥＬＩＳＡキット（Roche, Palo Alto, CA）を用いて実施され得る。
【０８１８】
in vitro検定において上記のいずれかで用いるための細胞としては、天然にＦｃＲＨ５を発現するか、またはＦｃＲＨ５を発現するよう操作された細胞または細胞株が挙げられる。このような細胞としては、同一組織起源の正常細胞に比してＦｃＲＨ５を過剰発現する腫瘍細胞が挙げられる。このような細胞としては、さらにまた、ＦｃＲＨ５を発現する細胞株（腫瘍細胞株を含む）、ならびにＦｃＲＨ５を普通は発現しないが、しかしＦｃＲＨ５をコードする核酸でトランスフェクトされた細胞株が挙げられる。
【０８１９】
一態様では、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体は、in vivoでの細胞の成長または増殖を抑制するその能力に関して試験される。ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体またはその免疫接合体は、in vivoでの腫瘍増殖を抑制するその能力に関して試験される。in vivoモデル系、例えば異種移植片モデルが、このような試験のために用いられ得る。例となる異種移植片系では、ヒト腫瘍細胞が適切に免疫無防備状態にされた非ヒト動物、例えばＳＣＩＤマウス中に導入される。本発明の抗体または免疫接合体が、動物に投与される。腫瘍増殖を抑制するかまたは低減する抗体または免疫接合体の能力が、測定される。上記異種移植片系のある実施形態では、ヒト腫瘍細胞は、ヒト患者からの腫瘍細胞である。異種移植片モデルを調製するために有用なこのような細胞は、ヒト白血病およびリンパ腫細胞株を包含し、その例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：ＢＪＡＢ－ｌｕｃ細胞（ルシフェラーゼレポーター遺伝子でトランスフェクトされたＥＢＶ－陰性バーキットリンパ腫細胞株）、ラモス細胞（ＡＴＣＣ、Manassas,VA、ＣＲＬ－１９２３）、ＳｕＤＨＬ－４細胞（ＤＳＭＺ、Braunschweig, Germany, AAC 495)、ＤｏＨＨ２細胞(Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991)、およびKluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)参照)、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞(Jadayel, D.M. et al, Leukemia 11(1):64-72 (1997)参照)。ある実施形態では、ヒト腫瘍細胞は、皮下注射により、または乳房脂肪パッドのような適切な部位への移植により、適切に免疫無防備常態にされた非ヒト動物に導入される。
【０８２０】
２．結合検定およびその他の検定
一態様では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、その抗原結合活性に関して試験される。例えば、ある実施形態では、抗ＦｃＲＨ５抗体は、細胞の表面に発現されるＦｃＲＨ５に結合するその能力に関して試験される。ＦＡＣＳ検定が、このような試験のために用いられ得る。
【０８２１】

一態様では、競合検定を用いて、ＦｃＲＨ５との結合に関してネズミ１０Ａ８抗体（ｍｕ１０Ａ８および／またはヒト化１０Ａ８ｖ１抗体（ｈｕ１０Ａ８ｖ１））と競合するモノクローナル抗体を特定し得る。ある実施形態では、このような競合抗体は、ネズミ１０Ａ８抗体（ｍｕ１０Ａ８）および／またはヒト化１０Ａ８ｖｌ（ｈｕ１０Ａ８ｖ１）により結合されるのと同一エピトープ（例えば、線状または立体配座エピトープ）に結合する。例となる競合検定としては、慣例的検定、例えばHarlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)に提示されたような検定が挙げられるが、これらに限定されない。抗体が結合するエピトープのマッピング方法の詳細な例は、Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に示されている。２つの抗体は、各々が他の結合を５０％より多く遮断する場合、同一のエピトープと結合するといわれる。

【０８２２】

例となる競合検定では、固定化ＦｃＲＨ５は、ＦｃＲＨ５と結合する第一の標識化抗体（例えば、ネズミ１０Ａ８抗体（ｍｕ１０Ａ８）、キメラ１０Ａ８抗体（ｃｈ１０Ａ８）および／またはヒト化１０Ａ８　ｖ１抗体（ｈｕ１０Ａ８　ｖ１）、およびＦｃＲＨ５との結合に関して第一の抗体と競合するその能力に関して試験されている第二の非標識化抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、固定化ＦｃＲＨ５が、第一の標識化抗体を含むが第二の非標識化抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。第一の抗体とＦｃＲＨ５との結合を許容する条件下でのインキュベーション後、過剰量の非結合抗体が除去され、固定化ＦｃＲＨ５と会合した標識の量が測定される。固定化ＦｃＲＨ５と会合した標識の量が、対照試料に比して試験試料中で実質的に減少されている場合には、それは、第二の抗体がＦｃＲＨ５との結合に関して第一の抗体と競合している、ということを示す。ある実施形態では、固定化ＦｃＲＨ５は、細胞の表面に存在するか、あるいはその表面にＦｃＲＨ５を発現する細胞から得られた膜調製物中に存在する。

【０８２３】

一態様では、精製抗ＦｃＲＨ５抗体は、さらに、一連の検定、例えばＮ末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分光分析、イオン交換クロマトグラフィーおよびパパイン消化（これらに限定されない）により特徴づけされ得る。

【０８２４】

一実施形態では、本発明は、いくつかの、しかし全てではない、エフェクター機能を保有する変更された抗体を意図するが、これはin vivoでの抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能（例えば、補体およびＡＤＣＣ）は必要でないかまたは有害である多数の用途のための望ましい候補となる。ある実施形態では、抗体のＦｃ活性は、所望の特性のみが維持される、ということを保証するために測定される。in vitroおよび／またはin vivo細胞傷害性検定は、ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ活性の低減／枯渇を確証するために実行され得る。例えば、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合検定は、抗体がＦｃγＲ結合を欠く（それゆえ、ＡＤＣＣ活性を欠くと思われる）が、しかしＦｃＲｎ結合能力を保持する、ということを保証するために実行され得る。ＡＤＣＣを媒介するための一次細胞、ＮＫ細胞はＦｃ（ＲＩＩＩ）のみを発現するが、一方、単球はＦｃ（ＲＩ）、Ｆｃ（ＲＩＩ）およびＦｃ（ＲＩＩＩ）を発現する。造血系細胞上でのＦｃＲ発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の４６４ページの表３に要約されている。当該分子のＡＤＣＣ活性を査定するためのin vitro検定の一例は、米国特許第５，５００，３６２号または第５，８２１，３３７号に記載されている。このような検定のために有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。代替的には、または付加的には、当該分子のＡＤＣＣ活性は、in vivoで、例えばClynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されたような動物モデルで査定され得る。Ｃ１ｑ結合検定は、抗体がＣ１ｑを結合できず、それゆえ

ＣＤＣ活性を欠く、ということを確証するためにも用いられ得る。補体活性化を査定するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されたようなＣＤＣ検定が実施され得る。ＦｃＲｎ結合およびin vivoクリアランス／半減期確定も、当該技術分野で既知の方法を用いて実施され得る。

【０８２５】

例証目的のために以下の実施例を提示するが、これらは、如何なる点においても本発明の範囲を限定するものではない。

【０８２６】

本明細書中で引用される特許および参考文献は全て、それらの記載内容が参照により本明細書中で援用される。

【実施例】

【０８２７】

実施例で言及される市販の試薬は、別記しない限り、メーカーの使用説明書に従って用いた。実施例中で用いた抗体は、市販の抗体または本明細書中で記載される抗体である。以下の実施例で、ならびに本明細書全体を通して、ＡＴＣＣ寄託番号により特定される細胞の供給源は、アメリカ培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection, Manassas, VA）である。

【０８２８】

実施例１：ＦｃＲＨ５を結合する抗体の調製

この実施例は、ＦｃＲＨ５を特異的に結合し得るモノクローナル抗体の調製を例証する。

【０８２９】

モノクローナル抗体を産生するための技法は当該技術分野で知られており、例えば、Goding（上記）に記載されている。用いられ得る免疫原としては、精製ＦｃＲＨ５、ＦｃＲＨ５を含有する融合タンパク質、ならびに細胞表面に組換えＦｃＲＨ５を発現する細胞が挙げられる。免疫原の選択は、過度の実験を伴なわずにう、当業者によりなされ得る。

【０８３０】

マウス（例えばＢａｌｂ／ｃ）が、完全フロイントアジュバント中で乳化され、そして１～１００マイクログラムの量で皮下または腹腔内に注射されるＦｃＲＨ５免疫原を用いて免疫化される。代替的には、免疫原は、ＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT）中で乳化され、動物の後足蹠に注射される。次いで、１０～１２日後に、選択アジュバント中で乳化した付加的免疫原を用いて、免疫化マウスに追加免疫する。その後、数週間、マウスを付加的免疫化注射で追加免疫する。抗ＦｃＲＨ５抗体を検出するために、ＥＬＩＳＡ検定で試験するための眼窩後方採血により、マウスから定期的に試料を採取し得る。

【０８３１】

適切な抗体力価を検出後、抗体に関して「陽性」である動物に、免疫原の最終静脈内注射を注入し得る。３～４日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を採取する。次に、脾臓細胞を、（３５％ポリエチレングリコールを用いて）選択ネズミ骨髄腫細胞株、例えばＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．１（ＡＴＣＣ番号　ＣＲＬ　１５９７から入手可能）と融合する。融合によりハイブリドーマ細胞を得て、これを次に、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）培地を含入する９６ウェル組織培養プレート中で平板化して、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッドおよび脾臓細胞ハイブリッドの増殖を抑制し得る。

【０８３２】

免疫原に対する反応性に関して、ＥＬＩＳＡでハイブリドーマ細胞をスクリーニングする。免疫原に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の確定は、当該技術分野の技術の範囲内である。

【０８３３】

陽性ハイブリドーマ細胞を同系Ｂａｌｂ／ｃマウス中に腹腔内注射して、抗免疫原モノクローナル抗体を含有する腹水を産生し得る。代替的には、組織培養フラスコまたは回転

ボトル中で、ハイブリドーマ細胞を増殖させ得る。硫酸アンモニウム沈降を用い、その後、ゲル排除クロマトグラフィーを用いて、腹水中に産生されるモノクローナル抗体の精製を成し遂げ得る。代替的には、抗体とプロテインＡまたはプロテインＧとの結合を基礎にしたアフィニティークロマトグラフィーを用い得る。

【０８３４】

この技法（単数または複数）を用いて、本明細書中に開示されるＦｃＲＨ５ポリペプチドに対して向けられる抗体を、首尾よく産生し得る。さらに具体的には、ＦｃＲＨ５タンパク質を認識し、結合し得る機能性モノクローナル抗体（標準ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ選別分析および／または免疫組織化学分析により測定）を、本明細書中に開示されるような以下のＦｃＲＨ５タンパク質に対して首尾よく生成し得る：ＰＲＯ８２０（ＤＮＡ５６０４１）、ＰＲＯ５２３８７（ＤＮＡ２５７８４５）。

【０８３５】

本明細書中に記載されるようなＦｃＲＨ５ポリペプチドに対して向けられるモノクローナル抗体の調製のほかに、当該ＦｃＲＨ５ポリペプチドを（in vitroおよびin vivoの両方で）発現する細胞（または組織）に対して細胞毒素を向けるに際して用いるために、モノクローナル抗体の多くを細胞毒素と首尾よく接合し得る。例えば、毒素（例えば、ＤＭ１）誘導体化モノクローナル抗体を、本明細書中に記載されるような以下のＦｃＲＨ５ポリペプチドに対して首尾よく生成し得る：ＰＲＯ８２０（ＤＮＡ５６０４１）、ＰＲＯ５２３８７（ＤＮＡ２５７８４５）。

【０８３６】

Ａ．　ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２（ＰＲＯ８２０、ＰＲＯ５２３８７）安定細胞株の生成

ＦｃＲＨ５抗体をスクリーニングするための細胞株を作製するために、タグ化および非タグ化ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２を安定的に発現するＳＶＴ２マウス繊維芽細胞株を生成した。ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２　ｃＤＮＡを脾臓細胞ライブラリーからＰＣＲ増幅し、ＴＡをｐＣＲ４中でクローン化した（Invitrogen）。非タグ化発現構築物を作製するために、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を、ＰＣＲを用いて、制限部位を付加し、ＰＣＲ産物を消化し、ベクターと結紮することにより、哺乳類発現ベクターｐＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ中にクローン化した。シグナル配列を伴わずにＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２　ＯＲＦｓを増幅し、ＰＣＲ産物をｇＤタグおよびシグナル配列（ＭＧＧＴＡＡＲＬＧＡＶＩＬＦＶＶＩＶＧＨＧＶＲＧＫＹＡＬＡＤＡＳＬＫＭＡＤＰＮＲＦＲＧＫＤＬＰＶＬＤＱＬＬ）（配列番号１）を含有するｐＭＳＣＶｎｅｏ（Clonetech）ベクターに結紮することにより、Ｎ末端タグ化発現構築物を作製した。各ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２に関して、ＦＡＣＳ特異的反応性ならびにＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ間の交差反応性に関してモノクローナル抗体をスクリーニングするのに用いるために、２つの安定細胞株を確立した。標準リポフェクトアミン２０００（Invitrogen, Carlsbad, Ca）プロトコールにより、ｇＤ－タグ化および非タグ化発現ベクターをＳＶＴ２中でトランスフェクトした（高グルコースＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン中で細胞を増殖）。ｇＤタグ化トランスフェクト体を、１週間、０．５ｍｇ／ｍｌゲネチシン(Invitrogen, Carlsbad, Ca)選択下に置き、次に、ｇＤ－タグ特異的モノクローナル抗体（ｇＤ：９５２、Genentech; South San Francisco）を用いて単一細胞ＦＡＣＳ選別して、最高発現クローンを得た。コロニーが可視的に成長するまで、非タグ化トランスフェクト体を５．０ｕｇ／ｍｌプロマイシン（Calbiochem; La Jolla, Ca）選択下に置いた。標準Ｔｒｉｚｏｌａ(Invitrogen; Carlsbad, Ca)プロトコールにより各コロニーからＲＮＡを単離して、ＴａｑＭａｎａ(ABI; Foster City, Ca)を実行して、最高産生クローンを確定した。

【０８３７】

Ｂ．　ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２（ＰＲＯ８２０、ＰＲＯ５２３８７）に対するモノクローナル抗体の生成

ヒトＦｃＲＨ５に結合することができるネズミモノクローナル抗体を調製した。

【０８３８】

ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２のＨｉｓ－タグ化細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を発現するベクターの、ＣＨＯ細胞中での一過性トランスフェクションにより、マウスの免疫化のためのタンパク質を生成した。ニッケルカラム上でトランスフェクト化細胞上清からタンパク質を精製し、タンパク質の同一性を、Ｎ末端配列決定により確証した。

【０８３９】

Ｒｉｂｉアジュバント（Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO）中の組換えポリヒスチジンタグ化（ＨＩＳ６）タンパク質を用いて、Ｂａｌｂ／ｃマウス（Charles River Laboratories, Hollister, CA）を超免疫化した。直接ＥＬＩＳＡにより免疫原に対する高抗体力価を実証する、そしてＦＡＣＳにより対象とするＦｃＲＨを安定的に発現するＳＶＴ２マウス繊維芽細胞と特異的に結合するマウスからのＢ細胞を、前に記載されたもの（Kohler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995）と類似の変法プロトコールを用いて、マウス骨髄腫細胞（Ｘ６３．Ａｇ８．６５３；American Type Culture Collection, Rockville, MD）と融合させた。１０～１２日後、上清を採取し、直接ＥＬＩＳＡおよびＦＡＣＳにより、抗体産生および結合に関してスクリーニングした。限界希釈による２回目サブクローニング後に最高免疫結合を示す陽性クローンを展開し、さらなる特性化、例えばＦｃＲＨ１、－２、－３、－４および－５特異性ならびに交差反応性のために培養した。各ハイブリドーマ系統から採取した上清を、以前記載されたもの（Hongo et al., 1995）と類似の変法プロトコールを用いて、アフィニティークロマトグラフィー（Pharmacia fast protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden）により精製した。次に、精製抗体調製物を滅菌濾過し（孔サイズ０．２μｍ；Nalgene, Rochester NY）、リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中に４℃で保存した。

【０８４０】

ＦｃＲＨ５タンパク質を認識し、結合することができるモノクローナル抗体（標準ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ選別分析および／または免疫組織化学分析により測定）を、ＰＲＯ５２８３７（ＦｃＲＨ５／ＩＲＴＡ２ｃ）に対して首尾よく生成し、以下のように命名した：

抗ＦｃＲＨ５－９Ｅ２（本明細書中では９Ｅ２または９Ｅ２．１．１と呼ばれる）（ＡＴＣＣ番号　ＰＴＡ－７２０７、２００５年１１月９日寄託）、

抗ＦｃＲＨ５－１Ｈ４（本明細書中では１Ｈ４または１Ｈ４．１．１と呼ばれる）（ＡＴＣＣ番号　ＰＴＡ－７２０８、２００５年１１月９日寄託）、

抗ＦｃＲＨ５－１３Ｇ９（本明細書中では１３Ｇ９または１３Ｇ９．１．１と呼ばれる）（米国特許仮出願第６１／２１１，６９５号、２００９年４月１日出願および第６１／１６６，２１４号、２００９年４月２日出願）、

抗ＦｃＲＨ５－４Ｄ１０（本明細書中では４Ｄ１０または４Ｄ１０．１．１と呼ばれる）（ＡＴＣＣ番号　ＰＴＡ－７２１０、２００５年１１月９日寄託）、

抗－ＦｃＲＨ５－６Ｈ１（本明細書中では６Ｈ１または６Ｈ１．１．１と呼ばれる）（ＡＴＣＣ番号　ＰＴＡ－７２１１、２００５年１１月９日寄託）、

抗ＦｃＲＨ５－８Ｈ６（本明細書中では８Ｈ６または８Ｈ６．１．１と呼ばれる）（ＡＴＣＣ番号　ＰＴＡ－７２１２、２００５年１１月９日寄託）、

抗ＦｃＲＨ５－７Ｄ１１（本明細書中では７Ｄ１１または７Ｄ１１．１．１と呼ばれる）（本明細書中に記載）、

抗ＦｃＲＨ５－１０Ａ８（本明細書中では１０Ａ８または１０Ａ８．１．１と呼ばれる）（本明細書中に記載）。

【０８４１】

親和力確定（Biacore解析）

Ｂｉａｃｏｒｅ　２０００表面プラズモン共鳴システム(BIAcore, Inc.)を用いて測定される会合および解離速度定数から、ＩｇＧのＦｃＲＨ結合親和力を算定した。供給もとの使用説明書（BIAcore, Inc.）に従って、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミドヒドロクロリド（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を用いて、抗ネズミＩｇＧ（ＢＲ－１００８－３３８）の共有結合のために、バイオセンサーチップを活性化した。簡潔に述べると、動力学分析の各サイクルに関し

て、５μｌの１００ｎＭ　ＩｇＧをチップ上に捕捉し、種々のＦｃＲＨの２倍連続希釈液を、２０μｌ／分の流量で１５０秒間、注入した。抗原解離を１８０秒間モニタリングした後、再生させた。１：１ラングミュア結合モデルとデータを適合させることにより、２５℃での平衡解離定数を算定した。実行緩衝液は、０．０５％トゥイーン－２０を含有するＰＢＳであった。結果を、以下の表９に示す。抗体は全て、治療薬として用いられるのに十分な親和力で抗原を結合した。

表９

ネズミ抗体	Hu抗原に対する親和力(Biacore)	安定トランスフェクト化細胞におけるCyno X反応性(FACS)
1H4	6 nM	X*
4D10	3 nM	
6H1	<0.1 nM	X
7D11	6 nM	X*
8H6	20 nM	X (by IHC)
9E2	0.2 nM	
10A8	N/A	X
10F5	N/A	X
13G9	19 nM	X

*飽和濃度で非常にわずか

【０８４２】

Ｃ．　キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５抗体の構築および配列決定

１．　キメラ　抗ヒトFcRH5抗体7D11（ch7D11）

キメラ７Ｄ１１　ＩｇＧ１の構築のために、Qiagen ＲＮｅａｓｙミニキット(カタログ番号７４１０４)およびメーカー提示プロトコールを用いて、７Ｄ１１ハイブリドーマ細胞から総ＲＮＡを抽出した。７Ｄ１１モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖に関して得たＮ末端アミノ酸配列を用いて、各鎖に特異的なＰＣＲプライマーを設計した。ＲＴ－ＰＣＲのための逆向プライマーを、Ｎ末端配列に対応する遺伝子ファミリーのフレームワーク４と整合するよう設計した。クローニングのための所望の制限部位を付加するためにも、プライマーを設計した。軽鎖に関しては、これらはＮ末端でＥｃｏＲＶ、ならびにフレームワーク４の３’でＫｐｎＩであった。重鎖に関しては、付加した部位は、Ｎ末端にＢｓ

ｉＷＩ、ならびにＶＨ－ＣＨ１接合部のわずかに下流のＡｐａＩであった。プライマー配列を以下に示す：

7D11LCF.EcoRV (7D11 軽鎖順向プライマー)：
5’- GATCGATATCYTGCTSACMCARTGTCCAGC - 3’ (配列番号２)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

C7F7LCR.KpnI (7D11 軽鎖逆向プライマー)：
5’- TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC- 3’ (配列番号３)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

1D1(IIID-2)HCF.BsiWI (7D11 重鎖順向プライマー)：
5’- GATCGACGTACGCTGARGTGCARYTGGTGGARTCTGG- 3’ (配列番号４)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

C7F7HCR.ApaI (7D11 重鎖逆向プライマー)：
5’- ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT- 3’ (配列番号５)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

【０８４３】

QiagenワンステップＲＴ－ＰＣＲキット(カタログ番号２１０２１０)ならびに推奨された反応混合物および条件を用いて、軽鎖および重鎖に関するＲＴ－ＰＣＲ反応を実行した。ＩｇＧの哺乳動物細胞発現のためのｐＲＫベクターは、前に記載されている（Gorman et al., DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990)）。ベクターを修飾し、あるエンドヌクレアーゼ制限酵素認識部位を組入れて、クローニングおよび発現を助長した（Shields et al., J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604）。増幅ＶＬを、ヒトκ定常ドメインを含有するｐＲＫ哺乳動物細胞発現ベクター（ｐＲＫ．ＬＰＧ３．ＨｕｍａｎＫａｐｐａ）中にクローン化した。増幅ＶＨを、全長ヒトＩｇＧ１定常ドメインをコードするｐＲＫ哺乳動物細胞発現ベクター（ｐＲＫ．ＬＰＧ４．ＨｕｍａｎＨＣ）に挿入した。

【０８４４】

抗ヒトＦｃＲＨ５に関する結果的に生じたネズミーヒトキメラ軽鎖（図１）および重鎖（図３）の全コード領域に関して、ＤＮＡ配列を得た（ｃｈ７Ｄ１１）。ＤＮＡによりコードされるネズミーヒトキメラ軽鎖および重鎖に関するコード化ポリペプチドを、それぞれ図２および図４に示す。ＤＮＡ配列決定後、プラスミドの発現を分析した。

【０８４５】

２９３（アデノウイルス形質転換ヒト胚性腎臓細胞株(Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977)）中で、プラスミドを一時的にトランスフェクトした。具体的には、トランスフェクション前日に、２９３細胞をばらばらにして、血清含有培地中に平板化した。翌日、リン酸カルシウム沈降物として調製した二本鎖ＤＮＡを付加し、その後、ｐＡｄＶＡｎｔａｇｅ（商標）ＤＮＡ(Promega, Madison, WI)を付加して、３７℃で一晩、細胞をインキュベートした。無血清培地中で細胞を培養し、４日後に採取した。プロテインＡカラム上のトランスフェクト化細胞上清から抗体タンパク質を精製し、次いで、緩衝液を１０ｍＭコハク酸ナトリウム、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６．０に交換して、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ－１０(Amicon)を用いて濃縮した。Ｎ末端配列決定により、タンパク質の同一性を確証した。定量的アミノ酸分析により、タンパク質濃度を確定した。以下で説明するように、ＳＶＴ２細胞中でＦＡＣＳにより、ヒトＦｃＲＨ５との結合に関して抗体を試験した。

【０８４６】

2. キメラ抗ヒトFcRH5抗体10A8 (ch10A8)

抗ヒトＦｃＲＨ５ハイブリドーマのパネルの一成員として、抗体１０Ａ８を得た。上記のようにＲＴ－ＰＣＲを用いてこれらの抗体のマウス／ヒト・キメラを構築して、基質として全ｍＲＮＡを用いてハイブリドーマ軽鎖および重鎖の可変ドメインを増幅した。軽鎖

可変ドメインを、ヒト定常κドメインを含有するベクターｐＲＫ．ＬＰＧ３．ＨｕｍａｎＫａｐｐａ中でクローン化し、一方、重鎖可変ドメインを、全長ヒトＩｇＧ１定常ドメインをコードするベクターｐＲＫ．ＬＰＧ４．ＨｕｍａｎＨＣ中でクローン化した。抗ヒトＦｃＲＨ５に関する結果的に生じたネズミ－ヒトキメラ軽鎖（図５）および重鎖（図７）の全コード領域に関して、ＤＮＡ配列を得た（ｃｈ１０Ｄ８）。これは、可変ドメインのフレームワークおよびＣＤＲ領域の特定を可能にした。ＤＮＡによりコードされる１０Ａ８ネズミ－ヒトキメラ軽鎖および重鎖に関するコード化ポリペプチドを、それぞれ図６および図８に示す。

【０８４７】

１０Ａ８のＲＴ－ＰＣＲクローニングのために用いたプライマーの配列を、以下に示す：

10A8LCF.EcoRV（10A8 軽鎖順向プライマー）：
5’- GATCGATATCGTGATGACCCARTCTCAY AA- 3’（配列番号６）
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8LCR.KpnI（10A8 軽鎖逆向プライマー）：
5’- TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC- 3’（配列番号７）
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCF.BsiWI（10A8重鎖順向プライマー）：
5’- GATCGACGTACGCTGARGTGCARYTG GTGGARTCTGG- 3’（配列番号８）
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCR（10A8 重鎖逆向プライマー）：
5’-CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA - 3’（配列番号９）
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

【０８４８】

３．キメラ 抗ヒトFcRH5抗体13G9（ch13G9）

抗ヒトＦｃＲＨ５ハイブリドーマのパネルの一成員として、抗体１３Ｇ９を得た。ＲＴ－ＰＣＲを用いてこれらの抗体のマウス／ヒト・キメラを構築して、基質として全ｍＲＮＡを用いてハイブリドーマ軽鎖および重鎖の可変ドメインを増幅した。軽鎖可変ドメインを、ヒト定常κドメインを含有するベクターｐＲＫ．ＬＰＧ３．ＨｕｍａｎＫａｐｐａ中でクローン化し、一方、重鎖可変ドメインを、全長ヒトＩｇＧ１定常ドメインをコードするベクターｐＲＫ．ＬＰＧ４．ＨｕｍａｎＨＣ中でクローン化した。ＤＮＡ配列決定は、可変ドメインのフレームワークおよびＣＤＲ領域の特定を可能にした。１３Ｇ９のキメラおよびヒト化バージョンは、米国特許仮出願第６１／２１１，６９５号（２００９年４月１日出願）および第６１／１６６，２１４号（２００９年４月２日出願）（これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）に記載されている。

【０８４９】

Ｄ．ヒト化抗ヒトＦｃＲＨ５抗体１０Ａ８の生成

残基番号は、カバト（Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）に従った。一文字アミノ酸記号を用いる。ＩＵＢコードを用いて、ＤＮＡ縮重を表す（Ｎ＝Ａ／Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｄ＝Ａ／Ｇ／Ｔ、Ｖ＝Ａ／Ｃ／Ｇ、Ｂ＝Ｃ／Ｇ／Ｔ、Ｈ＝Ａ／Ｃ／Ｔ、Ｋ＝Ｇ／Ｔ、Ｍ＝Ａ／Ｃ、Ｒ＝Ａ／Ｇ、Ｓ＝Ｇ／Ｃ、Ｗ＝Ａ／Ｔ、Ｙ＝Ｃ／Ｔ）。

【０８５０】

１．ヒト化抗-FcRH5抗体移植片

種々のヒト化抗ＦｃＲＨ５抗体を生成した。ネズミＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）からのＶＬおよびＶＨドメインを、ヒト共通ＶＬカッパ（ｈｕＫＩ）およびヒト亜群ＩＩＩ共通

ＶＨ（ｈｕＩＩＩ）ドメインと整列させた。ヒト共通配列カッパＩを伴うネズミ１０Ａ８の軽鎖可変ドメインのアラインメントを、図９に示す。ネズミ１０Ａ８（ｍｕ１０Ａ８）からの超可変領域を、受容体ヒト共通フレームワーク中に操作して、ＭＡ１０Ａ８の直接ＨＶＲ移植片（本明細書中では、「１０Ａ８移植片」または１０Ａ８移植「ヒト化抗体」または「ｈｕ１０Ａ８移植片」と呼ぶ）を生成した。哺乳類シグナル配列、ヒトＶカッパＩ可変ドメインに関する共通配列、およびヒト定常カッパＩドメインを含有する哺乳類発現ベクター上に、１０Ａ８のＣＤＲを操作した。ネズミ残基は、ドナーｍＡｂから受容体プラスミドへは移入されなかった。Kunkle突然変異誘発プロトコールに従って、各ＣＤＲをコードする単一オリゴヌクレオチド、および受容体プラスミドのｓｓＤＮＡを用いて、ＣＤＲを移入した。移植した残基、ならびにその結果生じたヒト１０Ａ８バージョン（ｈｕ１０Ａ８ｖ１）軽鎖可変ドメイン（配列番号１９）を、図９に示す。

【０８５１】

同様に、哺乳類シグナル配列、ヒト重鎖亜群ＩＩＩの共通配列、および全長ヒトＩｇＧ１定常ドメインをコードする配列を含有するベクター上に、ネズミ１０Ａ８（ｍｕ１０Ａ８）の重鎖可変ドメインのＣＤＲを操作した。ネズミ残基は、ドナーｍＡｂから受容体プラスミドへは移入されなかった。ネズミ１０Ａ８重鎖可変ドメイン、移植されたヒト亜群ＩＩＩ可変ドメイン残基のアラインメント、ならびにその結果生じたヒト１０Ａ８バージョン（ｈｕ１０Ａ８ｖ１）重鎖可変ドメイン（配列番号２１）を、図１０に示す。

【０８５２】

初期試験に関しては、アデノウイルス形質転換ヒト胚性腎臓細胞株２９３（Graham et al., 1977）中で、キメラおよびヒト化バージョン１（ｈｕ１０Ａ８　ｖ１）を、一時的に発現させた。各変異体に関しては、上記の１０μｇの軽鎖および重鎖プラスミドを、０．１ｍｌのＦｕＧｅｎｅを含有するＤＭＥＭ培地　０．９ｍｌに付加した。この混合物は、２４ｍｌの培地を有する７５％集密２９３細胞のＴ２５０フラスコ１つに付加するのに十分であり、フラスコを、３７℃、５％CO_2で一晩、インキュベートした。翌日、細胞をＰＢＳで洗浄し、培地を、インスリンおよび微量元素を補足した無血清発現培地と入れ替えた。５日後、状態調節培地を採取し、プロテインＡセファロース上でのアフィニティークロマトグラフィーにより、抗体を精製した。

【０８５３】

ＦＡＣＳおよびスカッチャード分析により、ヒト化バージョン１（ｈｕ１０Ａ８　ｖ１）およびキメラの相対結合親和力を測定した（下記参照）。ヒト化バージョン１の親和力はキメラと等価であると思われたため、親和力を増大するための１０Ａ８のさらなるバージョンを作製せず、さらなる試験は、このバージョンならびにその接合化誘導体に基づいて行なった（下記参照）。

【０８５４】

２．　IgG産生

２９３（アデノウイルス形質転換ヒト胚性腎臓細胞株(Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977)）中で、プラスミドを一時的にトランスフェクトした。具体的には、トランスフェクション前日に、２９３細胞をばらばらにして、血清含有培地中に平板化した。翌日、リン酸カルシウム沈降物として調製した二本鎖ＤＮＡを付加し、その後、ｐＡｄＶＡｎｔａｇｅ（商標）ＤＮＡ(Promega, Madison, WI)を付加して、３７℃で一晩、細胞をインキュベートした。無血清培地中で細胞を培養し、４日後に採取した。プロテインＡカラム上のトランスフェクト化細胞上清から抗体タンパク質を精製し、次いで、緩衝液を１０ｍＭコハク酸ナトリウム、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０に交換して、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ－１０(Amicon)を用いて濃縮した。Ｎ末端配列決定により、タンパク質の同一性を確証した。定量的アミノ酸分析により、タンパク質濃度を確定した。以下で説明するように、ＳＶＴ２細胞中でＦＡＣＳにより、ヒトＦｃＲＨ５との結合に関して抗体を試験した。

【０８５５】

３．　結合分析(FACS分析)

ＦｃＲＨ５抗体の交差反応性を確定するために、ＩｇＧ変異体とヒトＦｃＲＨ１～６を発現するＳＶＴ２細胞との結合を、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。

【０８５６】

簡潔に述べると、１００μｌ中でｇＤタグ化ｈｕＦｃＲＨ１～６を安定的に発現する約10^6細胞のＳＶＴ２細胞を、１．０ｕｇのネズミまたはキメラＡｂ［Ｍｕ抗－ｇＤ（陽性対照）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（１Ｈ４）（“ｍｕ１Ｈ４”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（４Ｄ１０）（“ｍｕ４Ｄ１０”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（６Ｈ１）（“ｍｕ６Ｈ１”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（７Ｄ１１）（“ｍｕ７Ｄ１１”）、Ｃｈ抗－ＦｃＲＨ５（７Ｄ１１）（“ｃｈ７Ｄ１１”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（８Ｈ６）（“ｍｕ８Ｈ６”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（９Ｅ２）（“ｍｕ９Ｅ２”）または　Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（１３Ｇ９）（“ｍｕ１３Ｇ９”）］とともにインキュベートした。空ベクターを安定的に発現するＳＶＴ２細胞のインキュベーションを、同一抗体とともにインキュベートして、陰性対照として用いた。ＰＥ接合ラット抗－ＭｕＩｇG_1、ラット抗－ＭｕＩｇG_{2a+b}またはＭｕ抗－ＨｕＩｇＧを、第二検出抗体として用いた。結果を、図１４に示す。試験抗体は全て、ＦｃＲＨ５に特異的に結合するが、但し、Ｍｕ抗ＦｃＲＨ５（６Ｈ１）に関しては、ＦｃＲＨ１と交差反応する。Ｍｕ抗ＦｃＲＨ５（８Ｈ６）は、ＦＡＣＳ分析によると、弱いが、しかしＦｃＲＨ５特異的な抗体である。

【０８５７】

ＦｃＲＨ５抗体の交差反応性、ＩｇＧ変異体上清とＳＶＴ２細胞との結合をさらに確定するために、発現ヒトＦｃＲＨ１～６を、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。

【０８５８】

簡潔に述べると、ｇＤタグ化ｈｕＦｃＲＨ１～６を安定的に発現する約10^6細胞のＳＶＴ２細胞を、１．０μｇの精製Ｍｓ抗ｇＤ抗体または１００μｌ（未知の濃度）のネズミＡｂハイブリドーマ上清（Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）（“ｍｕ１０Ａ８”）、Ｍｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ｆ５）（“ｍｕ１０Ｆ５”）とともにインキュベートした。空ベクターを安定的に発現するＳＶＴ２細胞のインキュベーションを、同一抗体とともにインキュベートして、陰性対照として用いた。ＰＥ接合ラット抗－ＭｕＩｇG_1を、第二の検出抗体として用いた。結果を、図１５に示す。ｍｕ１０Ａ８およびｍｕ１０Ｆ５抗体はともに、ＦｃＲＨ５を特異的に結合する。

【０８５９】

マウスＦｃＲＨ５抗体の結合をさらに確定するために、ＩｇＧ変異体の、ヒトＦｃＲＨ５を発現するＲａｊｉ細胞、ならびにカニクイザルＦｃＲＨ５を発現する２９３Ｔ細胞への結合を、ＦＡＣＳ分析を用いて分析した。

【０８６０】

簡潔に述べると、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされた約10^6ＲａｊｉおよびｇＤタグ化ｃｙｎｏＦｃＲＨ５で一時的にトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞を、１．０μｇのビオチニル化マウスアイソタイプ対照、ビオチニル化ｍｕ抗ｇＤ、ビオチニル化ｍｕ６Ｈ１、ビオチニル化ｍｕ１３Ｇ９またはビオチニル化ｍｕ７Ｄ１１とともに１００μｌＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、０．５％ＢＳＡ、０．０５％アジ化ナトリウム）中でインキュベートした。ＰＥ接合ストレプトアビジンを、第二の検出試薬として用いた。結果を、図１６および１７に示す。

【０８６１】

ＦｃＲＨ５抗体のさらなるＦＡＣＳ分析のために、１．０ｍｇ、０．１ｍｇまたは０．０１ｍｇの抗体を、ｈｕＦｃＲＨ５を安定的に発現するＢＪＡＢ細胞およびカニクイザルＦｃＲＨ５を安定的に発現するＳＶＴ２細胞の１００万個当たりで滴定した。簡潔に述べると、１００μｌ中約10^6細胞を、ｈｕＦｃＲＨ５を安定的に発現するＢＪＡＢ細胞、およびカニクイザルＦｃＲＨ５を安定的に発現するＳＶＴ２細胞の１００万個当たり種々の量（１．０ｍｇ、０．１ｍｇまたは０．０１ｍｇ）のネズミＡｂｍｕ１Ｈ４、ｍｕ６Ｈ１、ｍｕ７Ｄ１１、ｍｕ９Ｅ２、ｍｕ１０Ａ８、ｍｕ１０Ｆ５またはｍｕ１３Ｇ９とともにインキュベートした。１．０μｇ／10^6細胞の適切なＭｕ　ＩｇＧアイソタイプ対照との

インキュベーションを、陰性対照として用いた。ＰＥ接合ラット抗－ＭｕＩｇＧ$_{1}$またはラット抗－ＭｕＩｇＧ$_{2a+b}$を、第二検出抗体として用いた。結果を、図１８および１９に示す。ｍｕ１Ｈ４、ｍｕ６Ｈ１、ｍｕ７Ｄ１１、ｍｕ９Ｅ２、ｍｕ１０Ａ８、ｍｕ１０Ｆ５またはｍｕ１３Ｇ９は、ＦＡＣＳ分析により、カニクイザルＦｃＲＨ５と交差反応し、それらは、前臨床安全性試験に用いられて、標的依存性毒性を査定する。

【０８６２】

ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体のＦＡＣＳ分析のために（実施例２参照）、ＦｃＲＨ５ＡＤＣを漸増濃度（０．１、１．０および１０μｇ／ｍＬ）で、ヒトＦｃＲＨ５でトランスフェクトされ、安定的にそれを発現する１０^{6}ＯＰＭ２細胞、またはカニクイザルＦｃＲＨ５を安定的に発現するＳＶＴ２細胞に、１００μＬ反応容積中で付加した。次に、試料を、ＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、０．５％ＢＳＡ、０．１％アジ化ナトリウム）中で室温で１時間インキュベートして、内在化を抑制した。洗浄後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁し、室温で３０分間、フィコエリトリンと接合されたマウス抗ヒトＩｇＧ（Ｍｓ抗ヒトＰＥ）第二抗体　２０μＬとともに、１００μＬ反応容積中でインキュベートした。洗浄後、細胞を２００μＬの２％パラホルムアルデヒド／ＰＢＳ中に固定し、フローサイトメトリーを実施した。同一手法をＨｕＩｇＧのために用いたが、しかしながら、最高濃度（１０μｇ／ｍＬ）だけであった。ＨｕＩｇＧをアイソタイプ対照として用いて、基線ＰＭＴ／細胞株を設定した。フローサイトメトリーをＢＤ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（登録商標）上で実施し、幾何平均蛍光強度を各試料に関して記録した。ＦｌｏｗＪｏ　ｖ８．４．５ソフトウェアを用いて、記録データを分析した（図２０～２５参照）。チオ－ｈｕ１０Ａ８－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）およびチオおよびチオ－ｈｕ１０Ａ８－ＬＣ（Ｖ２０５Ｃ）は、ＦＡＣＳ分析により、ｈｕＦｃＲＨ５を安定的に発現するＯＰＭ２細胞およびカニクイザルＦｃＲＨ５を安定的に発現するＳＶＴ２細胞に対する種々の濃度の非接合抗体に同様に結合する。チオ－ｃｈ１０Ａ８－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、チオ－ｈｕ１０Ａ８－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、チオ－ｈｕ１０Ａ８－ＬＣ（Ｖ２０５Ｃ）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ｃｈ１０Ａ８－ＳＰＤＢ－ＤＭ４およびｈｕ１０Ａ８－ＳＰＤＢ－ＤＭ４は、ＦＡＣＳ分析により、ｈｕＦｃＲＨ５を安定的に発現するＯＰＭ２細胞に対する種々の濃度のＡＤＣに同様に結合する。

【０８６３】

４．　親和力確定（スカチャード分析）

ＦｃＲＨ５ネズミ抗体およびＩｇＧクローンの結合、ヨウ素化ＩｇＧ変異体の、ヒトＦｃＲＨ５を発現するＯＰＭ２細胞およびカニクイザルＦｃＲＨ５を発現するＳＶＴ２細への結合をさらに確定するために、スカチャード分析を実施した。

【０８６４】

スカチャード分析のために、０．５ｎＭ　Ｉ^{125}標識化ネズミまたはＩｇＧクローン抗－ＦｃＲＨ５を、ヒトＦｃＲＨ５を安定的に発現するトランスフェクト化ＯＰＭ２株、およびカニクイザルＦｃＲＨ５を安定的に発現するトランスフェクト化ＳＶＴ２株の、存在下で、それぞれ、５０～０．０２ｎＭ（１２ステップ　１：２連続希釈液）の範囲の、非標識ネズミまたはＩｇＧクローン抗ＦｃＲＨ５に対して競合させた。４℃で４時間インキュベーション後、細胞を洗浄し、細胞ペレット数をガンマ計数器（1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Walthem, MA）で読み取った。全ての点を三重反復試験で実行し、１０分間計数した。New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA)プログラムを用いて、Ｋｄ算定のために平均ＣＰＭを用いた。結果を表１０に示す（「ｍｓ」は、ネズミ抗体を指す）。

表１０．　スカチャード分析により決定した場合の親和力確定

細胞株	PUR/ロット	Ab	Kd (nM)	標準誤差
BJAB.huFcRH5	50095-16	ms10A8	0.44	0.046
SVT2.cyFcRH5	50095-16	ms10A8	2.74	0.530
OPM2.huFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0.52	0.036
SVT2.cyFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0.98	0.022
OPM2.huFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	0.85	0.050
SVT2.cyFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	1.57	0.000
OPM2.huFcRH5	CA51434-50	Hu10A8 v1	1.44	0.150
SVT2.cyFcRH5	CA51434-50	Hu10A8 v1	3.04	1.340
OPM2.huFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	1.77	0.240
OPM2.huFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	1.21	0.142
SVT2.cyFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	3.12	0.139
SVT2.cyFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	2.63	1032.300
BJAB.huFcRH5	50095-53	ms6H1	0.19	0.007
SVT2.cyFcRH5	50095-93	ms6H1	0.38	0.027

【０８６５】

実施例２： 抗ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体（ＡＤＣ）の生成

抗ヒトＦｃＲＨ５に関する抗体薬剤接合体（ＡＤＣ）の生成のために用いられる薬剤は、マイタンシノイドＤＭ１およびＤＭ４ならびにドラスタチン１０誘導体モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）を包含した（ＵＳ２００５０２７６８１２（２００５年５月３１日出願）およびＵＳ２００５０２３８６４９（２００４年１１月５日出願）（これらの記載内容はともに、参照により本明細書中で援用される）参照）。ＤＭ１、ＤＭ４およびＭＭＡＥは、ＮＨＬの化学療法的処置に用いられるビンカアルカロイド有糸分裂阻害剤より少なくとも１００倍以上細胞傷害性である有糸分裂阻害剤である（Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17:114-123 (2006)；Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)；Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)）。ＡＤＣの生成のために用いられるリンカーは、安定チオエステルリンカーＳＭＣＣ（接合後はＭＣＣと呼ばれる）を用いて、リシンのε－アミノ基を介してＤＭ１、ＤＭ４と連結された。代替的には、ＤＭ４に関して、抗体は、ＳＰＤＢリンカーを用いて、リシンのｅ－アミノ基を介してＤＭ４と連結された。ＳＭＣＣリンカーにより結合されるＤＭ１は、還元状態での開裂に耐性である。さらに、ＡＤＣが内在化され、リソソームに対して標的にされて、細胞内部では有効な抗有糸分裂剤であるリシン－Ｎε－ＤＭ１の放出を引き起こす場合、ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびＳＰＤＢ－ＤＭ４　ＡＤＣは、細胞毒性を誘導するが、細胞から放出される場合、リシン－Ｎε－ＤＭ１は非毒性である（Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)）。ＭＭＡＥに関して、抗体は、マレイミドカプロイル－バリン（ｖｃ）－ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ）によりシステイン

を介してＭＭＡＥに連結された。ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢリンカーは、細胞間プロテアーゼ、例えばカテプシンＢにより切断可能であり、そして切断されると、遊離薬剤を放出する（Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)）が、一方、
ＭＣリンカーは、細胞内プロテアーゼによる切断に耐性である。

【０８６６】

米国特許出願１１／１４１，３４４（２００５年５月３１日出願）（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載された手法と同様に、ＳＭＣＣ－ＤＭ１を用いて、抗ヒトＦｃＲＨ５に関する抗体薬剤接合体（ＡＤＣ）を生成した。抗ヒトＦｃＲＨ５精製抗体を、５０ｍＭリン酸カリウムおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ　７．０を含有する溶液中に緩衝液交換した。ＳＭＣＣ（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）中に溶解し、抗体溶液に付加して、最終ＳＭＣＣ／Ａｂモル比を１０：１とした。混合しながら、室温で３時間、反応を進行させた。その後、ＳＭＣＣ修飾抗体を、１５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．０を有する１３５ｍＭクエン酸ナトリウム中で平衡させたＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム（Ｇ－２５）上で精製した。ＤＭＡ中に溶解したＤＭ１を、ＳＭＣＣ抗体調製物に付加して、ＤＭ１対抗体のモル比を１０：１とした。混合しながら、室温で４～２０時間、反応を進行させた。ＤＭ１修飾抗体溶液を、２０容積のＰＢＳで透析濾過して、非反応ＤＭ１を除去し、滅菌濾過して、４℃で保存した。典型的には、この工程により、抗体の収率は４０～６０％に達した。調製物は、ゲル濾過およびレーザー光散乱により査定した場合、通常は、９５％超の単量体物質であった。ＤＭ１は２５２ｎｍで吸収最大を示すため、抗体と結合される薬剤の量は、２５２および２８０ｎｍでの示差吸収測定により確定され得る。典型的には、薬剤体抗体比は、３：４であった。

【０８６７】

３～４つの薬剤を用いて、抗ヒトＦｃＲＨ５　ＳＰＤＢ　ＤＭ４抗体－薬剤接合体を精製するために、抗体を、先ず、ＳＰＤＢ［４－（２－ピリジルジチオ）酪酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル］で修飾して、ジチオピリジル基を生成した。抗体に対して４～６倍モル過剰量のＳＰＤＢを付加し、室温で９０分間反応させた。５～１０ｍｇ／ｍｌの抗体濃度で、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡを有する５０ｍＭリン酸カリウム、ｐＨ７中で、反応を実行する。ＳＰＤＢ反応後、エタノールを付加して、最終濃度を５％Ｖ／Ｖとして、チオール含有ＤＭ４薬剤を、ＳＰＤＢより１．７倍モル過剰量で付加した。室温で１６時間、インキュベーションを実行する。透析濾過、ゲル濾過、または陽イオン交換クロマトグラフィーにより、接合体を精製する。

【０８６８】

米国特許出願１０／９８３，３４０（２００４年１１月５日出願）（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載された手法と同様に、ＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ（ｖｃ）－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ薬剤リンカーを用いて、抗ヒトＦｃＲＨ５に関する抗体薬剤接合体（ＡＤＣ）を生成した。精製抗ヒトＦｃＲＨ５抗体を、５００ｍＭホウ酸ナトリウムおよび５００ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ８．０中に溶解し、さらに、過剰量の１００ＭＭジチオトレイトール（ＤＴＴ）で処理した。３７℃で約３０分間インキュベーション後、セファデックスＧ２５樹脂上での溶離により緩衝液を交換し、１ｍＭ　ＤＴＰＡを含有するＰＢＳで溶離した。溶液の２８０ｎｍでの吸光度からの還元抗体濃度、ならびにＤＴＮＢ（Aldrich, Milwaukee, WI）との反応によるチオール濃度を確定すること、ならびに４１２での吸光殿確定により、チオール／Ａｂ値を調べた。ＰＢＳ中に溶解した還元抗体を、氷上で冷やした。ＤＭＳＯ中の薬剤リンカーＭＣ－ｖａｌ－ｃｉｔ（ｖｃ）－ＰＡＢ－ＭＭＡＥをアセトニトリルおよび水中に溶解し、ＰＢＳ中の冷却還元抗体に付加した。１時間インキュベーション後、過剰量のマレイミドを付加して、反応をクエンチし、任意の非反応抗体チオール基をキャップした。反応混合物を遠心式限外濾過により濃縮し、ＰＢＳ中のＧ２５樹脂を通した溶離により、抗体－薬剤接合体を精製し、脱塩して、滅菌条件下で０．２μｍフィルターを通して濾過し、凍結保存した。

【０８６９】

実施例３：　システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の調製

本明細書中に開示されたように、システイン操作された抗ＦｃＲＨ５抗体の調製を実施した。システイン残基を抗体の軽鎖、重鎖またはＦｃ領域に付加して、種々の薬剤との接合を可能にし得る。システイン抗ＦｃＲＨ５抗体１０Ａ８の調製に際しては、軽鎖をコードするＤＮＡを突然変異化して、図１３に示すようにカバト位置２０５のバリンをシステインで置換した。重鎖をコードするＤＮＡを突然変異化して、図１２に示すように、重鎖中のＥＵ位置１１８（順次位置１１８、カバト番号１１４）のアラニンをシステインに置換した。抗ＦｃＲＨ５抗体のＦｃ領域を突然変異化して、重鎖Ｆｃ領域中のＥＵ位置４００（順次位置４００；カバト番号３９６）のセリンをシステインに置換し得る。

【０８７０】

実施例４：　ネズミ抗ＦｃＲＨ５抗体薬剤接合体を用いたin vivo腫瘍細胞殺害検定

Ａ．　異種移植片

種々の抗ＦｃＲＨ５抗体の効力を試験するために、ネズミ抗ヒト抗体をＤＭ１と接合し、腫瘍に及ぼす接合変異体の作用を分析した。

【０８７１】

具体的には、ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞（ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクト化されるバーキットリンパ腫細胞株）における腫瘍を退行させる抗体の能力。

【０８７２】

ＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞中へのｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、抗ＦｃＲＨ５抗体（７Ｄ１１）を用いて中範囲発現体に関してＦＡＣＳ自己クローン化した。自己クローン化後、ＦＡＣＳにより確定した場合に、形質細胞発現に最も良く似ているＦｃＲＨ５を発現するＢＪＡＢ－ルシフェラーゼ細胞株を、抗ＦｃＲＨ５抗体を用いてＦＡＣＳ分析により選択した。陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅで、同じ方法でトランスフェクト化されたＢＪＡＢ－ルシフェラーゼを用いた。

【０８７３】

マウス抗体の効力の分析のため、雌ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウス（６～８週齢　Charles Rivers Laboratories； Hollister, CA）に、2×10^{7} ＢＪＡＢ－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均１２８mm^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１００～２５０mm^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝　０．５ａ×b^{2}（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、mm^{3}で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。０日目および７日目に、抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣまたは対照抗体－薬剤接合体を用いて、マウス８匹の群を、４００μｇの抗体結合薬剤／マウス１m^{3}（約８～１０ｍｇＡＤＣ／マウス１ｋｇに対応する）の毎週静脈内（ｉ．ｖ．）用量で処置した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。実験中、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が２０００mm^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０８７４】

用いた動物および毒素間のリンカーは、ＤＭ１に関するチオエーテル架橋剤ＳＭＣＣであった。付加的リンカーとしては、ジスルフィドリンカーＳＰＰまたはＤＭ１に関するチオエステル架橋剤ＳＭＣＣあるいはＭＣまたはＭＣ－バリン－シトルリン（ｖｃ）－ＰＡＢ、あるいは（バリン－シトルリン（ｖｃ））ジペプチドリンカー試薬）（モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）またはモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）に関するマレイミド構成成分およびパラ－アミノベンジルカルバモイル（ＰＡＢ）自壊的構成成分を有する）が挙げられ得る。用いられる毒素は、ＤＭ１であった。付加的毒素としては、ＭＭＡＥまたはＭＭＡＦが挙げられ得る。

【０８７５】

この実験のための抗体は、Chang et al. ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０４３５１４（ＷＯ２００５／０６３２９９）（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載されたｍｕ７Ｄ１１、ならびに本明細書中に記載される抗ＦｃＲＨ５を包含した(実施例１Ｂ参照、例えばｍｕ７Ｄ１１、ｍｕ６Ｈ１、ｍｕ１０Ａ８、ｍｕ１３Ｇ９およびｍｕ９Ｅ２)。

【０８７６】

陰性対照は、抗ｇｐ－１２０ベースの接合体（ＳＭＣＣ－ＤＭ１）を包含した。

【０８７７】

Ｂ．　結果

１．　BJAB-FcRH5 異種移植片

示されているような薬剤接合体および用量による４８日時間変化で、抗－ＦｃＲＨ５ｍｕ７Ｄ１１、ｍｕ６Ｈ１、ｍｕ１０Ａ８、ｍｕ１３Ｇ９およびｍｕ９Ｅ２　ＡＤＣｓは、陰性対照　抗ｇｐ－１２０　ＳＭＣＣ－ＤＭ１と比較して、ＢＪＡＢ－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した。ＡＤＣおよび対照のすべてに関して、０日目および７日目に、２つの用量（下記の表１１に示す）でＡＤＣを投与した。具体的には、抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣの全てが、腫瘍増殖を有意に抑制した（図２６）。

【０８７８】

さらに、同一試験において、最初の１７日の体重変化％を、各投与量群で確定した。結果（図２７）は、これらのネズミ抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣの投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかったことを示した。

【０８７９】

さらに、表１１において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ｍｍ^{3}に低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１１

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量薬剤－DM1 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比(薬剤/Ab)
Mu-抗-gp120	8/8	0	0	--	10.8	--
Mu-抗-gp120-mcc-dm1	8/8	0	0	400	8.4	3.2
Mu-抗-FcRH5 (7D11)	8/8	0	0	--	10.8	--
Mu-抗-FcRH5 (7D11)-mcc-dm1	8/8	0	0	400	9	3
Mu-抗-FcRH5 (6H1)-mcc-dm1	6/8	1	2	400	10.8	2.5
Mu-抗-FcRH5 (10A8)-mcc-dm1	7/8	3	1	400	10	2.7
Mu-抗-FcRH5 (13G9)-mcc-dm1	7/8	0	1	400	8.4	3.2
Mu-抗-FcRH5 (9E2)-mcc-dm1	8/8	2	0	400	10.4	2.6

【０８８０】

実施例５：　抗ＦｃＲＨ５チオＭａｂ薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ．　異種移植片

ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを有するｈｕ１０Ａ８チオＭＡｂ薬剤接合体、ならびにＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力を試験するために、マウス腫瘍に及ぼす１０Ａ８チオＭａｂ薬剤接合体および１０Ａ８薬剤接合体の作用を分析した。

【０８８１】
具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＯＰＭ２細胞（多発性骨髄腫細胞）における腫瘍を退行させる抗体の能力を検査した。
【０８８２】
ＯＰＭ２細胞中での線状化ｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、ビオチン（Pierce Biotechnology, Rockford, Il）標識化抗ＦｃＲＨ５抗体（７Ｄ１１）、およびＭＡＣＳ　ＬＳカラム（Miltenyi Biotec, Auburn, Ca）上のＭＡＣＳ抗ビオチンマイクロビーズを用いて、ＦｃＲＨ５発現細胞に関して分離した。分離後、ＦｃＲＨ５発現を、抗ＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）を用いてＦＡＣＳにより確証し、そしてＯＰＭ２細胞株を、同様にして、陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅでトランスフェクトした。
【０８８３】
ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを有するｈｕ１０Ａ８チオ ＭＡｂ薬剤接合体、ならびにＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力の分析のため、雌ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、2×10^{7} ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均１８０mm^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１００～２５０mm^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：$V=0.5a\times b^{2}$（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、mm^{3}で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣまたは対照抗体－薬剤接合体を用いて、マウス８匹の群を、２、４または８ｍｇ　ＡＤＣ／マウス１ｋｇの１回静脈内（ｉ．ｖ．）用量で処置した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。実験中、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００mm^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。
【０８８４】
陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＳＰＤＢ－ＤＭ４およびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）を包含した。
【０８８５】
Ｂ．　結果
１．　ＯＰＭ２-FcRH5 異種移植片
表１２に示されているような薬剤接合体および用量による３５日時間変化で、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたｈｕ１０Ａ８（Ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）、およびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたｈｕ１０Ａ８チオ ＭＡｂ（「チオ－ＨＣ－ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ｖｃ－Ｅ」）は、陰性対照、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗－ＨＥＲ２（Ｈｕ－抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）およびＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）チオＭＡｂｓ（「チオ－ｈｕ－抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）－ｖｃ－Ｅ」）と比較して、ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した。ＡＤＣおよび対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量（表１２に示す）でＡＤＣを投与した。具体的には、ヒト化抗ＦｃＲＨ５およびヒト化抗ＦｃＲＨ５チオ ＭＡｂ　ＡＤＣの全てが、腫瘍増殖を有意に抑制した（図２８）。抗ＨＥＲ２ベースの接合体を、陰性対照（「チオ－ｈｕ－抗－Ｈｅｒ２（４Ｄ５）－ｖｃ－Ｅ」および「抗－Ｈｅｒ２（４Ｄ５）－ｓｐｄｂ－ｄｍ４」）として用いた。
【０８８６】
さらに、同一試験において、最初の１４日の体重変化％を、各投与量群で確定した。結果（図２９）は、これらのヒト化抗ＦｃＲＨ５およびヒト化抗ＦｃＲＨ５チオ ＭＡｂ　Ａ

ＤＣの投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかったことを示した。さらに、表１２において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ｍｍ3に低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１２

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量 薬剤－DM4 または MMAE (μg/m²)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
ビヒクル*	8/8	0	0	n/a	--	n/a
チオ-hu-抗-Her2 (4D5)-vc-E	8/8	0	0	227	8	1.9
抗-Her2 (4D5)-spdb-dm4	8/8	0	0	196	4	3.02
チオ-HC(A118C)-hu-抗-FcRH5 (10A8)-vc-E	7/8	2	1	112	4	1.94
チオ-HC(A118C)-hu-抗-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	6	1	224	8	1.94
チオ-LC(L205C)-hu-抗-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	4	0	109	4	1.89
チオ-LC(L205C)-hu-抗-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	3	1	218	8	1.89
Hu-抗-FcRH5-10A8-spdb-DM4	8/8	2	1	98	2	3.13
Hu-抗-FcRH5-10A8-spdb-DM4	2/8	2	6	196	4	3.13

* ビヒクル= 20 mM 酢酸ヒスチジン、pH 5.5、 240 mM スクロース、0.02% PS20

【０８８７】

実施例６： ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ． 異種移植片

種々の投与量でのＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体（「ｈｕ－抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４」）の効力を試験するために、マウスにおける腫瘍に及ぼす接合抗体の作用を分析した。

【０８８８】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＯＰＭ２細胞（多発性骨髄腫細胞）における腫瘍を退行させる抗体の能力を検査した。

【０８８９】

ＯＰＭ２細胞中での線状化ｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、ビオチン（Pierce Biotechnology, Rockford, Il）標識化抗ＦｃＲＨ５抗体（７Ｄ１１）、およびＭＡＣＳ ＬＳカラム（Miltenyi Biotec, Auburn, Ca）上のＭＡＣＳ抗ビオチンマイクロビーズを用いて、ＦｃＲＨ５発現細胞に関して分離した。分離後、ＦｃＲＨ５発現を、抗ＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）を用いてＦＡＣＳにより確証し、そしてＯＰＭ２細胞株を、同様にして、陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅでトランスフェクトした。

【０８９０】

ＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力の分析のため、雌ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、2×10^{7} ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス

の脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均１８０ｍｍ^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１００～２５０ｍｍ^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝　０．５ａ×ｂ^2（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、ｍｍ^{3}で表した。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表した。抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣまたは対照抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）を用いて、マウス９匹の群を、０．５～１２ｍｇ　ＡＤＣ／マウス１ｋｇの範囲の１回静脈内（ｉ．ｖ．）用量で処置した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。実験中、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００ｍｍ^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０８９１】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＳＰＤＢ－ＤＭ４）を包含した。

【０８９２】

Ｂ．結果

１．ＯＰＭ２-FcRH5 異種移植片

表１３に示されているような薬剤接合体および用量による５０日時間変化で、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）（ｈｕ１０Ａ８）（ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）は、陰性対照、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗ＨＥＲ２（「ｈｕ－抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４」）と比較して、ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した。ＡＤＣおよび対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量（表１３に示す）でＡＤＣを投与した。具体的には、８ｍｇ／ｋｇおよび１２ｍｇ／ｋｇのヒト化抗ＦｃＲＨ５ＡＤＣが、腫瘍増殖を有意に抑制した（図３０ａ）。

【０８９３】

さらに、同一試験において、最初の１４日の体重変化％を、各投与量群で確定した。結果（図３０ｂ）は、これらのヒト化抗ＦｃＲＨ５およびヒト化抗ＦｃＲＨ５チオＭＡｂＡＤＣの投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかったことを示した。さらに、表１３において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０^{3}ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１３

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量薬剤－DM4 (μg/m²)	用量Ab (mg/kg)	薬剤比(薬剤/Ab)
ビヒクル*	9/9	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu-抗-Her2-SPDB DM4	9/9	0	0	587	12	3.02
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	30	0.5	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	60	1	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	119	2	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	2	1	238	4	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	1/8	1	8	477	8	3.8
Hu-抗 -FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	0/9	4	9	715	12	3.8

* ビヒクル= 20 mM 酢酸ヒスチジン、pH 5.5、 240 mMスクロース、0.02% PS20

【０８９４】

実施例７： 抗－ＦｃＲＨ５チオＭａｂ薬剤接合体によるin vitro細胞増殖低減に関する検定

ｈｕ１０Ａ８およびｈｕ１０Ａ８チオ ＭＡｂ（ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）薬剤接合体（例えば、ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－裸、チオ－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－裸、ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、チオ－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）を、ヒトＦｃＲＨ５を安定的に発現するトランスフェクト化ＯＰＭ株（ＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＤ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２）を用いて、細胞増殖検定により、測定した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）発光細胞生存度検定は、市販の（Promega Corp., Madison, WI）、鞘翅目ルシフェラーゼの組換え発現に基づいた同種の検定である（米国特許第５５８３０２４号；米国特許第５６７４７１３号；米国特許第５７００６７０号）。この細胞増殖検定は、代謝的活性細胞の指標であるＡＴＰの存在量に基づいて、培養中の生存可能細胞の数を確定する（Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第６６０２６７７号）。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）検定は、９６４ウェル・フォーマットで実行されて、自動化高処理量スクリーニング（ＨＴＳ）を容易にする（Cree et al., AntiCancer Drugs 6:398-404 (1995)）。同種の検定手順は、単一試薬（CellTiter-Glo（登録商標）試薬）を、血清補足培地中で培養される細胞に直接付加することを包含する。

【０８９５】

同種の「付加－混合－測定」フォーマットは、存在するＡＴＰの量に比例して、細胞溶解ならびに発光シグナルの生成を生じる。基質である甲虫シフェラーゼは、組換えホタルルシフェラーゼにより酸化的に脱カルボキシル化され、ＡＴＰのＡＭＰへの転化、ならびに光子の生成を伴う。生存可能細胞は、巣大敵発光単位（ＲＬＵ）で反映される。データは、ルミノメーターまたはＣＣＤカメラ画像処理装置により記録され得る。発光出力は、時間経過と共に測定されたＲＬＵとして表される。％ＲＬＵは、「非薬剤接合体」対照と比較した正規化ＲＬＵパーセンテージである。代替的には、ルシフェラーゼからの光子は、シンチラントの存在下で、シンチレーション計数器で計数され得る。その場合、光単位はＣＰＳ（計数／秒）として表され得る。

【０８９６】

ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ Ｇｌｏ発光細胞生存度検定（Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002))から適合される以下のプロトコールを用いて、細胞増殖検定により、ヒト化抗体－薬剤接合体の効力を測定した:

１．　約７５，０００のＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＤ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞を含有する細胞培養の５０μｌのアリコートを、９６ウェル不透明壁プレートの各ウェル中に入れた。

２．　ｈｕ１０Ａ８またはチオ－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）ＡｂまたはＡＤＣ（５０ｕｌ）を、三重反復実験ウェルに付加して、最終濃度を１００００、３３３３、１１１１、３７０、１２３、４１、１４、４．６または１．５ｎｇ／ｍＬとし、「無薬剤接合体」対照ウェルには培地のみを入れて、３日間インキュベートした。

３．　プレートを、室温で約３０分間平衡させた。

４．　ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ試薬（１００μｌ）を付加した。

５．　内容物を回旋振盪器上で２分間混合して、細胞溶解を誘導した。

６．　プレートを、室温で１０分間インキュベートして、発光シグナルを安定化した。

７．　％ＲＬＵ（相対発光単位）として発光を記録し、報告した。

８．　対照として、同一細胞株を、無関係非結合ｈｕ抗Ｈｅｒ２．４Ｄ５　ＡｂまたはＡＤＣ（例えば、ｈｕ－抗Ｈｅｒ２．４Ｄ５－裸、ｈｕ－抗－Ｈｅｒ２．４Ｄ５．ＨＣ．Ａ１１８Ｃ－裸ｈｕ抗Ｈｅｒ２．４Ｄ５－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ｈｕ抗Ｈｅｒ２．４Ｄ５．ＨＣ．Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）と平行して試験した。

培地：　ＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＳ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞は、ＲＰＭＩ１６４０／２０％ＦＢＳ／２ｍＭ　グルタミン／１．０　μｇ／ｍｌ　プロマイシン中で育つ。

【０８９７】

マウス抗体－薬剤接合体の効力を、図３１および３２に示す。この検定の結果は、ＩＣ５０としてｍｇ／ｍｌで記述される。ＩＣ５０は、細胞増殖における５０％抑制に必要とされる抗体またはＡＤＣの濃度である。非接合ｈｕ１０Ａ８およびチオ－ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）は、１０ｍｇ／ｍｌのＩＣ５０（検定の濃度滴定の上限）でＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＳ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞に関するin vitro細胞増殖抑制を示さない。Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４およびチオ－ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＨＣ（Ａ１１８Ｃ）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥはともに、それぞれ０．０３および０．０４ｍｇ／ｍｌのＩＣ５０で、ＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＳ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞増殖抑制を示す。さらに、ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４は、より高い濃度で、完全ＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＳ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞増殖抑制を生じる。対照抗体およびＡＤＣのうち、ｈｕ抗－Ｈｅｒ２．４Ｄ５－ＳＰＤＢ　ＤＭ４のみが、１．８ｍｇ／ｍｌのＩＣ５０で、ＯＰＭ２．ＣＭＶ．ＰＳ．ＦｃＲＨ５．ＳＰ．２細胞増殖抑制を示す。ＳＰＤＢ　ＤＭ４は、開裂可能リンカー薬剤であるので、この増殖抑制は、最も考え得るバイスタンダー薬剤活性である。

【０８９８】

実施例８：　ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ．　異種移植片

ベルカド（登録商標）（ボルテゾミブ）と組合せたヒト化（１０Ａ８）薬剤接合体（ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）の効力を試験するために、マウスにおける腫瘍（多発性骨髄腫　ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５異種移植片）に及ぼす接合化抗体の、単独の、およびベルカド（登録商標）と組合せた作用を分析した。

【０８９９】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＯＰＭ２細胞（多発性骨髄腫細胞）における腫瘍を退行させる抗体およびベルカド（登録商標）の能力を検査した。ＯＰＭ２細胞中での線状化ｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、ビオチン（Pierce Biotechnology, Rockford, Il）標識化抗ＦｃＲＨ５抗体（７Ｄ１１）、およびＭＡＣＳ　ＬＳカラム（Miltenyi Biotec, Auburn, Ca）上のＭＡＣＳ抗ビオチン

マイクロビーズを用いて、ＦｃＲＨ５発現細胞に関して分離した。分離後、ＦｃＲＨ５発現を、抗ＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）を用いてＦＡＣＳにより確証し、そしてＯＰＭ２細胞株を、同様にして、陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅでトランスフェクトした。

【０９００】

ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ単独で、およびベルカド（登録商標）と組合せて接合されたｈｕ抗ＦｃＲＨ５１０Ａ８の効力の分析のため、雌ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、２×１０^{7}ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均３３１ｍｍ^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１７２～５１１ｍｍ^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝　０．５ａ×ｂ^{2}（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、ｍｍ^{3}で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。マウスを各々９匹の９つの群に無作為化して、用量投与した。群１には、ビヒクル対照として、０日目にヒスチジンの単一回静脈内（ＩＶ）注射＋２週間、０、３、７および１０日目に週２回の０．９％塩化ナトリウム（食塩水）のＩＶ注射を施した。群２には、接合体対照として、０日目に、１０ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１１３５の単一回ＩＶ注射を施した。群３には、２週間、０、３、７および１０日目に週２回の１ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）を施した。群４～５には、０日目に、それぞれ４または１０　ｍｇ／ｋｇのチオｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＨＣ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１４６５の０単一回ＩＶ注射を施した。群６～７には、０日目に、それぞれ４または１０ｍｇ／ｋｇのｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１５７５の単一回ＩＶ注射を施した。群８には、０日目に４ｍｇ／ｋｇのｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１５７５の単一回ＩＶ注射＋２週間、０、３、７および１０日目に週２回の１ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）を施した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。実験中、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００ｍｍ^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０９０１】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）を包含した。

【０９０２】

Ｂ．結果

１．ＯＰＭ２-FcRH5 異種移植片

薬剤接合体単独およびベルカド（登録商標）と組合せて用いた４５日時間変化で、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたｈｕ１０Ａ８（「ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ」）をベルカド（登録商標）と組合せたものは、陰性対照、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗－Ｈｅｒ２（Ｈｕ－抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）と比較して、ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した（図３９）。薬剤接合体および対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量でＡＤＣを投与した。２週間、０、３、７および１０日目に週２回、ベルカド（登録商標）を投与した。付加的に、４ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを１　ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）と組合せたものは、チオＨｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを４および１０ｍｇ／ｋｇ、Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを４および１０ｍｇ／ｋｇ、そしてベルカド（登録商標）を１ｍｇ／ｋｇとともに用量投与された単一作用物質群と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制した

（図３９）。

【０９０３】

さらに、同一試験において、最初の２４日の体重変化％を、各投与量群で確定した（図４０）。結果は、ベルカド（登録商標）の投与が処置持続期間中に体重の減少または重量損失を引き起こしたが、しかし体重は、用量投与が完了後に回復した。

【０９０４】

さらに、表１４において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ ^{3} ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１４

投与抗体（処置）	TI	PR	CR	用量 薬剤 MMAE ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比（薬剤/Ab）
ビヒクル*	9/9	0	0	N/A	N/A	N/A
Hu 抗-Her2 トラスツズマブ-MC-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	432	10	2.9
Velcade®	9/9	0	0	N/A	1	N/A
チオ Hu 抗-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	112	4	1.94
チオ Hu 抗-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE	9/9	3	0	280	10	1.94
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	198	4	3.44
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE	9/9	6	0	496	10	3.44
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE (4 mg/kg) +ベルカド（登録商標）(1 mg/kg)	7/8	6	3	496	4 / 1	3.44 / N/A

* ビヒクル = 20 mM 酢酸ヒスチジン、 240 mMスクロース、 0.02% PS20, pH 5.5

【０９０５】

実施例９： ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ． 異種移植片

ベルカド（登録商標）と組合せたヒト化（１０Ａ８）薬剤接合体（Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５１０Ａ８－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）の効力を試験するために、マウスにおける腫瘍（多発性骨髄腫 ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５異種移植片）に及ぼす接合化抗体の、単独の、およびベルカド（登録商標）と組合せた作用を分析した。

【０９０６】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＯＰＭ２細胞（多発性骨髄腫細胞）における腫瘍を退行させる抗体およびベルカド（登録商標）の能力を検査した。ＯＰＭ２細胞中での線状化ｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、ビオチン（Pierce Biotechnology, Rockford, Il）標識化抗ＦｃＲＨ５（７Ｄ１１）、およびＭＡＣＳ ＬＳカラム（Miltenyi Biotec, Auburn, Ca）上のＭＡＣＳ抗ビオチンマイクロビーズを用いて、ＦｃＲＨ５発現細胞に関して分離した。分離後、ＦｃＲＨ５発現を、抗ＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）を用いてＦＡＣＳにより確証し、そしてＯＰＭ２細胞株を、同様にして、陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅでトランス

フェクトした。

【０９０７】

ＳＰＤＢ－ＤＭ４単独で、およびベルカド（登録商標）と組合せて接合されたＨｕ抗ＦｃＲＨ５１０Ａ８の効力の分析のため、雌ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、２×１０^{7}ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均３０６ｍｍ^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１９７～４９９ｍｍ^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝　０．５ａ×ｂ^{2}（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、ｍｍ^{3}で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。マウスを各々９匹の６つの群に無作為化して、用量投与した。群１には、２週間、０、３、７および１０日目に週２回の１ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）の静脈内（ＩＶ）注射を施した。群２には、ビヒクル対照として、０日目にヒスチジンの単一回ＩＶ注射＋２週間、０、３、７および１０日目に週２回の０．９％塩化ナトリウム（食塩水）のＩＶ注射を施した。群３には、接合体対照として、０日目に、４ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ＣＮＪ　１４３３の単一回ＩＶ注射を施した。群４には、０日目に、４ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５１０Ａ８　ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ＣＮＪ　１５０３の単一回ＩＶ注射を施した。群５には、０日目に、４ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ＣＮＪ　１４３３の単一回ＩＶ注射＋２週間、０、３、７および１０日目に週２回の１ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）の単一回ＩＶ注射を施した。群６には、０日目に、４ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５１０Ａ８　ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ＣＮＪ　１５０３の単一回ＩＶ注射＋２週間、０、３、７および１０日目に週２回の１ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）のＩＶ注射を施した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。最初の３週間、週２回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００ｍｍ^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０９０８】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＳＰＤＢ－ＤＭ４）を包含した。

【０９０９】

Ｂ．　結果

１．　ＯＰＭ２-FcRH5 異種移植片

薬剤接合体単独およびベルカド（登録商標）と組合せて用いた３７日時間変化で、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）をベルカド（登録商標）と組合せたものは、陰性対照、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗－Ｈｅｒ２（Ｈｕ－抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）と比較して、ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した（図４１）。薬剤接合体および対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量でＡＤＣを投与した。２週間、０、３、７および１０日目に週２回、ベルカド（登録商標）を投与した。付加的に、４ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＳＰＤＢ－ＤＭ４を１　ｍｇ／ｋｇのベルカド（登録商標）と組合せたものは、Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＳＰＤＢ－ＤＭ４を４ｍｇ／ｋｇおよびベルカド（登録商標）を１ｍｇ／ｋｇとともに用量投与される単一作用物質群、ならびにＨｕ－抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４＋ベルカド１ｍｇ／ｋｇの併用群と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制した（図４１）。

【０９１０】

さらに、同一試験において、最初の２１日の体重変化％を、各投与量群で確定した（図４２）。結果は、ヒト化抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣおよびベルカド（登録商標）の投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかった。

【０９１１】

さらに、表１５において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ ^{3} ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１５

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量 薬剤 DM4 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比 (薬 剤 /Ab)
ベルカド（登録商標）	8/8	0	0	N/A	N/A	N/A
ビヒクル*	9/9	0	0	N/A	N/A	N/A
Hu 抗-Her2 トラスツズマブ-SPDB-DM4	8/8	0	0	195	4	3.02
Hu 抗-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg	9/9	1	0	238	4	3.8
Hu 抗-Her2 トラスツズマブ-SPDB-DM4 + ベルカド（登録商標）	8/8	0	0	195 / N/A	4 / 1	3.02 / N/A
Hu 抗-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 06 + ベルカド（登録商標）	1/9	1	8	238 / N/A	4 / 1	3.8 / N/A

* ビヒクル = 20 mM 酢酸ヒスチジン、 240 mMスクロース、 0.02% PS20, pH 5.5

【０９１２】

実施例１０： ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ． 異種移植片

レブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せたヒト化（１０Ａ８）薬剤接合体（Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）の効力を試験するために、マウスにおける腫瘍（多発性骨髄腫 ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５異種移植片）に及ぼすレブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せた接合化抗体の作用を分析した。

【０９１３】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＯＰＭ２細胞（多発性骨髄腫細胞）における腫瘍を退行させる抗体のレブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せた能力を調べた。ＯＰＭ２細胞中での線状化ｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅ．ＦｃＲＨ５のトランスフェクションおよびプロマイシン（Calbiochem, San Diego, CA）選択後、生存細胞を、ビオチン（Pierce Biotechnology, Rockford, Il）標識化抗ＦｃＲＨ５抗体（７Ｄ１１）、およびＭＡＣＳ ＬＳカラム（Miltenyi Biotec, Auburn, Ca）上のＭＡＣＳ抗ビオチンマイクロビーズを用いて、ＦｃＲＨ５発現細胞に関して分離した。分離後、ＦｃＲＨ５発現を、抗ＦｃＲＨ５抗体（１０Ａ８）を用いてＦＡＣＳにより確証し、そしてＯＰＭ２細胞株を、同様にして、陰性対照として、空ベクターｐＲＫ．ＣＭＶ．ＰＤ．ｎｂｅでトランスフェクトした。

【０９１４】

ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたＨｕ抗ＦｃＲＨ５ １０Ａ８の、レブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せた効力の分析のため、雌ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories; Hollister, CAから）に、２×１０ ^{7} ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５細胞を、ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均４４６ｍｍ ^{3} に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均２６３～６３０ｍｍ ^{3} になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝ ０．５ａ×ｂ ^{2}

（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、mm^3で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。マウスを各々８匹の９つの群に無作為化して、用量投与した。群１には、ビヒクル対照として、０～１３日目にＤＭＳＯおよびＭＣＴの混合物の腹腔内（ＩＰ）注射を毎日施した。群２には、接合体対照として、０日目に、６ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１１３５の単一回静脈内（ＩＶ）注射を施した。群３には、０日目に、６ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１６７２の単一回ＩＶ注射を施した。群４には、０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）のＩＰ注射を毎日施した。群５には、０～３および７～１０日目に４日間３ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンの毎日経口（ＰＯ）用量投与と、その後の、３日間隔を置いて２サイクルの投与を施した。群６には、０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）のＩＰ注射を毎日＋０～３および７～１０日目に４日間３ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンの毎日ＰＯ用量投与と、その後の、３日間隔を置いて２サイクルの投与を施した。群７には、０日目に、６ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１１３５の単一回ＩＶ注射＋０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）のＩＰ注射を毎日ならびに０～３および７～１０日目に４日間３ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンの毎日ＰＯ用量投与と、その後の、３日間隔を置いて２サイクルの投与を施した。群８には、０日目に、６ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１６７２の単一回ＩＶ注射＋０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）のＩＰ注射を毎日、ならびに０～３および７～１０日目に４日間３ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンの毎日ＰＯ用量投与と、その後の、３日間隔を置いて２サイクルの投与を施した。群９には、０日目に、６ｍｇ／ｋｇのＨｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、ＣＮＪ　１６７２の単一回ＩＶ注射＋０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）のＩＰ注射を毎日を施した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。実験中、週２回、マウスの体重を測定した。マウスが、０日目の体重と比較して１５％より大きい体重損失を経験した場合、重量が再び増えるまで、または体重損失が２０％より上に達するまで、毎日計量した。０日目の体重と比較して体重損失が２０％より大きくなった場合、腫瘍体積が$３０００mm^3$に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０９１５】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）を包含した。

【０９１６】

Ｂ．結果

１．ＯＰＭ２-FcRH5 異種移植片

薬剤接合体を、レブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せて用いた３８日時間変化で、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）（Ｈｕ－抗ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）をレブリミド（登録商標）およびレブリミド（登録商標）＋デキサメタゾンと組合せたものは、陰性対照、－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗ＨＥＲ２（Ｈｕ抗－Ｈｅｒ２トラスツズマブ－ＭＣ－ｖチャフＰＡＢ－ＭＭＡＥ）と比較して、ＯＰＭ２－ＦｃＲＨ５腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した（図４３）。薬剤接合体および対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量でＡＤＣを投与した。０～１３日目に５０ｍｇ／ｋｇのレブリミド（登録商標）の毎日ＩＰ注射として、レブリミド（登録商標）を投与した。デキサメタソンは、０～３および７～１０日目に４日間３ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンの毎日ＰＯ用量投与と、その後の、３日間隔を置いて２サイクルの投与として施した。付加的に、６ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと５０ｍｇ／ｋｇ　レブリミド（登録商標）との組合せ、および６ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡ

Ｅと５０ｍｇ／ｋｇ　レブリミド（登録商標）＋３ｍｇ／ｋｇ　デキサメタゾンとの組合せはともに、６ｍｇ／ｋｇ　Ｈｕ抗－ＦｃＲＨ５　１０Ａ８－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ、５０ｍｇ／ｋｇ　レブリミド（登録商標）（レナリドミド）および３ｍｇ／ｋｇ　デキサメタゾンを用量投与した単一作用物質群と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制した（図４３）。

【０９１７】

さらに、同一試験において、最初の１７日の体重変化％を、各投与量群で確定した（図４４）。結果は、デキサメタゾンおよびレブリミド（登録商標）の投与が体重の有意の減少または重量損失を引き起こした。

【０９１８】

さらに、表１６において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ ^{3} ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１６

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量 薬剤 MMAE ($\mu g/m^2$)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比 (薬 剤 /Ab)
ビヒクル(DMSO + MCT 緩衝液)	7/7	0	0	N/A	N/A	N/A
Hu 抗 -Her2 トラスツズマブ -MC-vc-PAB-MMAE (単一回 iv)	8/8	0	0	259	6	2.9
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE (単一回 iv)	7/7	2	0	294	6	3.4
レブリミド(ip qdX13)	4/4	0	0	N/A	50	N/A
デキサメタゾン(po qdX4： 4/3/4/3/4 スケジュールで３サイクル)	5/5	0	0	N/A	3	N/A
レブリミド + デキサメタゾン	5/5	3	0	N/A	50 / 3	N/A
Hu 抗 -Her2 トラスツズマブ -MC-vc-PAB-MMAE + レブリミド + デキサメタゾン	6/6	4	0	259	6 / 50 / 3	108
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE + レブリミド + デキサメタゾン	4/4	8	0	294	6 / 50 / 3	3.4
Hu 抗-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE + レブリミド	4/4	8	0	294	6 / 50	3.4

【０９１９】

前記明細書は、当業者が本発明を実行するのには十分であると考えられる。寄託実施形態は本発明のある態様の単一例証として意図されるため、本発明は寄託された構築物により範囲を限定されるものではなく、機能的に等価である任意の構築物は本発明の範囲内である。本明細書中の物質の寄託は、本明細書中に含入される書かれた説明が、本発明の任意の態様、例えばその最良の方式の実行を可能にするのに不適切であるということの容認を与えないし、あるいは、それが表す特定の例証に本発明の範囲を限定するものでもない。実際、本明細書中に示され、記載されたもののほかに、本発明の種々の修正がなされることは、前記の説明から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲にも記載されている。

【０９２０】

実施例１１：　ＦｃＲＨ５二重特異性抗体の産生および特性化

抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体の構築および産生　　ＦｃＲＨ５二重特異性抗体、具体的には抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５　空洞への隆起二重特異性抗体の構築を、以下に記載

する。

【０９２１】

種々の空洞への隆起二重特異性抗体は、以前に記載されている（例えば米国特許第５，７３１，１６８号および第７，１８３，０７６号；Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996)；Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)；Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998)参照）。ある場合には、Chamow et al. J. Immunol. 153:4268 (1994)により前に記載されたヒト化抗ＣＤ３／ＣＤ４－ＩｇＧキメラ間のC_H3界面を操作して、発現構築物で同時トランスフェクトされた哺乳類細胞株から回収され得るヘテロ多量体のパーセンテージを最大にした。本明細書中で用いる場合、「ヘテロ多量体」は、少なくとも第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチド（ここで、第二のポリペプチドはアミノ酸配列の少なくとも１つのアミノ酸残基が第一のポリペプチドと異なる）を含む分子、例えば二重特異性抗体を指す。

【０９２２】

前段落中で引用した文書に記載されているように、ヘテロ多量体形成を行なうために用いる戦術は、第一ポリペプチド、例えば抗体Ｈ鎖のC_H3ドメイン中に１つ以上の「隆起」を導入すること、そしてさらにまた、第二ポリペプチド、例えば第二抗体Ｈ鎖のC_H3ドメイン中に１つ以上の対応する「空洞」を導入することに頼っている。「隆起」突然変異は、小アミノ酸をより大きいものに置き換え、そして「空洞」突然変異は、大型アミノ酸をより小さいもので置き換えた。さらに、隆起および空洞突然変異のほかに、遊離チオール含有残基が２つのポリペプチド、例えば２つのC_H3ドメインの界面に導入されたが、これは、ヘテロ多量体の形成を増強することが示された。ポリペプチド界面に導入される種々の例となる空洞への隆起突然変異および遊離チオール含有残基が記載されている。例えば米国特許第５，７３１，１６８号および第７，１８３，０７６号；Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996)；Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)；Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998)を参照されたい。

【０９２３】

以下の工程を実行して、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体を産生した。ネズミ抗ＣＤ３モノクローナルＡｂ　ＵＣＨＴ１のヒト化抗ＣＤ３軽鎖（Ｌ）および重鎖（Ｈ）変異体をコードする大腸菌発現プラスミド（米国特許第５，８２１，３３７号および第６，４０７，２１３号；Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217 [1992]およびRodrigues et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 45 [1992])）を構築する。多数の適切な大腸菌発現プラスミド、例えばｐＡＫ１９が、当該技術分野で知られている（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。ヒト化抗ＣＤ３Ｈ鎖の（上記のような）C_H3ドメイン中に隆起または空洞を導入する突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発により成される。種々の部位特異的突然変異誘発方法が、当該技術分野で周知である（例えばKunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)参照）。さらに、ヒト化抗ＦｃＲＨ５軽鎖および重鎖、例えば本明細書中に記載されるようなヒト化抗ＦｃＲＨ５軽鎖および重鎖をコードする大腸菌発現プラスミドが、構築される。ヒト化抗ＦｃＲＨ５Ｈ鎖の（上記のような）C_H3ドメイン中に対応する空洞（抗ＣＤ３ドメインが隆起突然変異を有する場合）または対応する隆起（抗ＣＤ３ドメインが空洞突然変異を有する場合）を導入する突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発により作製される。

【０９２４】

二重特異性抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５抗体は、当該技術分野で知られている方法を用いて、上記のような大腸菌発現プラスミドを、適切な大腸菌株、例えば３３Ｂ６中で形質転換することにより産生される（例えばRodrigues et al., Cancer Res. 55:63-70 (1995)参照）。前に記載されたように、１０Ｌ発酵器中で増殖させた形質転換大腸菌により、抗体は分泌される（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。当該技術分野で既知の手法を用いて、抗体は精製され、分析される（例えばAtwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)参照）。

【０９２５】

細胞結合検定：Ｂ細胞およびＴ細胞を結合する抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体の能力を査定するために、当該技術分野で既知の標準手法に従ってフィコール勾配を用いて、ヒト末梢白血球を健常ドナーからの全血から単離する。約１００万個の細胞を、ＰＢＳ中に０．５％ＢＳＡおよび２ｍＭのＥＤＴＡを含有する緩衝液中で氷上で、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体とともにインキュベートする。次いで、細胞を洗浄し、メーカーのプロトコールに従って、ＣＤ８－ＡＰＣおよび抗ＣＤ１３８－ＰＥおよび抗ＣＤ３８－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５抗体とともにＦＩＴＣ接合ヤギ（Ｆａｂ’）２抗ヒトＩｇＧで染色し（BD Biosciences, San Diego, CA）、Ｆｌｏｗｊｏソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR)を用いて分析を実行する。

【０９２６】

in vitro細胞殺害検定：ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２多発性骨髄腫細胞（ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＥＪＭ細胞、ＤＳＭＺ　ＡＣＣ－５６０）を標的細胞として用いて、総ヒト末梢白血球またはＣＤ８＋Ｔ細胞と同時培養する。ＣＤ８＋Ｔ細胞を用いる場合、９６ウェル丸底プレート中でＣＤ８プラスＴ細胞単離キット（Miltenyi Biotech, Auburn, CA）を用いて、陰性選別により、ヒトＰＢＭＣからそれらを精製する。２０，０００ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞を、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体とともに、または伴わずに、標的：エフェクター＝１：１０の比率でウェル当たりで付加する。約１９時間後、メーカーのプロトコール（BD Biosciences, San Diego, CA）に従って、細胞を標識化抗ＣＤ３８－ＦＩＴＣおよび抗ＣＤ１３８－ＰＥで染色し、Ｆｌｕｏｒｅｓｂｒｉｔｅ（登録商標）較正等級６．０ミクロンＹＧマイクロスフェア(Polysciences, Inc., Warrington, PA)と混合する。前方／側方散乱のゲーティングおよびＣＤ３８－ＣＤ１３８染色により、ＦＡＣＳ分析を実行する。標準手法によりヨウ化プロピジウム染色を用いて、死細胞を排除する。以下の方程式に従って、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体の特異的殺害活性を算定する：特異的殺害％＝（１－処理を受けた生ＥＪＭ－ＦＣＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞の数／エフェクター中の生ＥＪＭ－ＦＣＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞＆抗－ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体を伴わないＥＪＭ－ＦＣＲＨ５．ＬＳＰ．２の数）ｘ１００）。

【０９２７】

in vivo効力：ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２多発性骨髄腫細胞を、末梢血単核球と混合し、雌ＮＯＤ．ＣＤ１７－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}／Ｊマウス(Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA)の右胸脇腹部に皮下注射する。次いで、接種マウスを対照および処置群に分ける。対照群には、ビヒクルまたは抗ＣＤ３／Ｈｅｒ２対照二重特異性抗体を投与する。処置群には、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体を投与する。二重特異性抗体を０．０１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲で投与する。細胞接種後１～２時間以内に、対照および処置群に静脈内投与し、５連続日の間、毎日反復する。週２回、カリパスを用いて、２つの寸法（長さおよび幅）で腫瘍を測定する。週２回、マウスを臨床的にモニタリングする。実験終了時に、対照－処置動物の腫瘍サイズを、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体処置動物の腫瘍サイズと比較して、抗ＣＤ３／ＦｃＲＨ５二重特異性抗体処置の効力を査定する。

【０９２８】

実施例１２：　ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ．　異種移植片

種々の投与量でのＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力を試験するために、マウスの腫瘍に及ぼす接合体の作用を分析した。

【０９２９】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＥＪＭ細胞（多発性骨髄腫細胞株）における腫瘍を退行させる抗体の能力を検査した。

【０９３０】

ＥＪＭ（ＡＣＣ－５６０）細胞は、DSMZ（ドイツ）から得られる市販ヒト多発性骨髄腫

細胞株である。ＥＪＭ細胞はＦｃＲＨ５を内因的に発現せず、ＥＪＭをヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトすると、ＥＪＭ．ＣＭＶ．ＰＤ．ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞株を生じた。

【０９３１】

ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥを有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力の分析のため、雌ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、2×10^{7}ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞を、ＣＢ１７　ＩＣＲ　ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均１３４mm^3に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１００～２５０mm^3になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝　０．５ａ×b^2（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、mm^3で表される。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表される。抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣまたは対照抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）を用いて、マウス８匹の群を、１～８ｍｇ　ＡＤＣ／ｋｇの範囲の用量で、１回静脈内（ｉ．ｖ．）処置した。実験中は週１回、腫瘍を測定した。２週間の間、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００mm^3に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０９３２】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの接合体（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ）を包含した。

【０９３３】

Ｂ．結果

１．ＥＪＭ-ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２異種移植片

表１７に示されているような薬剤接合体および用量による８０日時間変化で、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）（ｈｕ１０Ａ８）（「ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ」）は、陰性対照、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥと接合されたヒト化抗－ＨＥＲ２（「Ｈｕ－抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ」）と比較して、ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した。ＡＤＣおよび対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量でＡＤＣを投与した。具体的には、ヒト化抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣの全用量レベルが、腫瘍増殖を有意に抑制した（図４５）。

【０９３４】

さらに、同一試験において、最初の７日の体重変化％を、各投与量群で確定した。結果は、これらのヒト化抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣの投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかったことを示した（図４６）。

【０９３５】

さらに、表１７において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が$0\ ^3$ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１７

投与抗体(処置)	TI	PR	CR	用量薬剤－DM1 (μg/m^2)	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比(薬剤/Ab)
ビヒクル*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu-抗-Her2-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	0	0	346	8	2.9
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	4/6	1	2	49	1	3.4
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	3/5	2	3	98	2	3.4
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	7	1	196	4	3.4
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	1/5	2	6	392	8	3.4

* ビヒクル = 20 mM 酢酸ヒスチジン、 pH 5.5、 240 mMスクロース、0.02% PS20

【０９３６】

実施例１３： ヒト化抗ＦｃＲＨ５薬剤接合体によるin vivo腫瘍増殖の抑制に関する検定

Ａ． 異種移植片

種々の投与量でのＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体（「ｈｕ－抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４」）の効力を試験するために、マウスにおける腫瘍に及ぼす接合抗体の作用を分析した。

【０９３７】

具体的には、ヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトされたＥＪＭ細胞（多発性骨髄腫細胞株）における腫瘍を退行させる抗体の能力を検査した。

【０９３８】

ＥＪＭ（ＡＣＣ－５６０）細胞は、DSMZ（ドイツ）から得られる市販ヒト多発性骨髄腫細胞株である。ＥＪＭ細胞はＦｃＲＨ５を内因的に発現せず、ＥＪＭをヒトＦｃＲＨ５で安定的にトランスフェクトすると、ＥＪＭ．ＣＭＶ．ＰＤ．ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞株を生じた。

【０９３９】

ＳＰＤＢ－ＤＭ４を有するｈｕ１０Ａ８薬剤接合体の効力の分析のため、雌ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウス（６～８週齢；Charles Rivers Laboratories； Hollister, CAから）に、２×１０^{7}ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２細胞を、ＣＢ１７ ＩＣＲ ＳＣＩＤマウスの脇腹に注射により皮下接種して、異種移植片腫瘍を、平均１３４ｍｍ^{3}に増殖させた。０日目は、腫瘍が平均１００～２５０ｍｍ^{3}になった日であり、以下で別記しない限り、初回の、または１回だけの用量の処置が施された時を指す。カリパスを用いて測定した２つの寸法に基づいて、腫瘍体積を算定し、式：Ｖ＝ ０．５ａ×ｂ^2（式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長径および短径である）に従って、ｍｍ^{3}で表した。各実験群から収集したデータは、平均±標準誤差として表した。抗ＦｃＲＨ５ ＡＤＣまたは対照抗体－薬剤接合体（ＡＤＣ）を用いて、マウス８匹の群を、２～８ｍｇ ＡＤＣ／マウス１ｋｇの範囲の１回静脈内（ｉ．ｖ．）用量で処置した。実験中は週２回、腫瘍を測定した。２週間の間、週１回、マウスの体重を測定した。腫瘍が３０００ｍｍ^{3}に達する前、または腫瘍が切迫潰瘍の徴候を示した場合、マウスを安楽死させた。動物プロトコールは全て、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）により認可された。

【０９４０】

陰性対照は、抗ＨＥＲ２（ヘルセプチン（登録商標））（トラスツズマブ））ベースの

接合体（ＳＰＤＢ－ＤＭ４）を包含した。

【０９４１】

Ｂ．結果

１．ＥＪＭ-ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２異種移植片

表１８に示されているような薬剤接合体および用量による２４日時間変化で、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）（ｈｕ１０Ａ８）（ｈｕ－抗－ＦｃＲＨ５（１０Ａ８）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４）は、陰性対照、ＳＰＤＢ－ＤＭ４と接合されたヒト化抗ＨＥＲ２（「Ｈｕ－抗－ＨＥＲ２（４Ｄ５）－ＳＰＤＢ－ＤＭ４」）と比較して、ＥＪＭ－ＦｃＲＨ５．ＬＳＰ．２腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示した。ＡＤＣおよび対照のすべてに関して、０日目に、単一回用量でＡＤＣを投与した。具体的には、８ｍｇ／ｋｇのヒト化抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣが、腫瘍増殖を有意に抑制した（図４７）。

【０９４２】

さらに、同一試験において、最初の７日の体重変化％を、各投与量群で確定した。結果は、これらのヒト化抗ＦｃＲＨ５　ＡＤＣの投与がこの時間中に体重の有意の減少または重量損失を引き起こさなかったことを示した（図４８）。

【０９４３】

さらに、表１８において、部分退行（ＰＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０日目に測定された腫瘍体積の５０％より低下した場合）、完全寛解（ＣＲ；投与後、任意の時点での腫瘍体積が０ ^{3} ｍｍに低下した場合）を示す試験した総数からのマウスの数が示されている（ＮＡ＝適用できない）；（ＴＩ＝試験終了時に観察可能な腫瘍の数）。

表１８

投与抗体（処置）	TI	PR	CR	用量薬剤－DM1（μg/m^2）	用量 Ab (mg/kg)	薬剤比（薬剤/Ab）
ビヒクル*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu-抗-Her2-SPDB-DM4	8/8	0	0	391	8	3.02
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	0	0	119	2	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	7/8	0	1	238	4	3.8
Hu-抗-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	2	0	476	8	3.8

* ビヒクル = 20 mM 酢酸ヒスチジン、pH 5.5、 240 mMスクロース 0.02% PS20

【図１】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１　軽鎖（ＤＮＡ）

CACTCCCAGCTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTA
GTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCCTGCTGACACAATCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGA
AAGAGTCAGTTTCTCCTCCAGGTCCAGTCAGAGCATTGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTT
CTCCAAGGCTTCTCATAAAGTTTGCTTCTGAGTCTCTCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTTTACTCTTAGCATCAATAGTGTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGATTACTACTGTCAACAAAGTAATAGCTG
GCCACTCACGTTCGGTGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGCAGCAGGACAGCA
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT**TAA**GCTTGGCCGCCATGGCCCAAC
TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC （配列
番号１０１）

【図２】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１　軽鎖（アミノ酸）

DILLPQSPALLSVSPGERVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS
VESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号１１）

【図３】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１　重鎖（ＤＮＡ）

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAC
CATTACTAGAAATGGTGGTACCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCA
AGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGTCCTATC
TACTATGATTACGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA
CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGCAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
ATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGAC
CTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT （配列番号１２）

【図４】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５　７Ｄ１１　重鎖（アミノ酸）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATITRNGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMSSLKSEDTAMYYCARGPIYYDYGYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号
１３）

【図５】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０ＡＳ）軽鎖

ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC
TGGAGTACATTCAGATATCGTGATGACCCAGTCTCATAAATTCATGTCCACATCAGTAAGAGACAGGGTCAG
CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCC
TAAACTACTGATTTATTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGG
GACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTT
TAGTAGTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGT**TAA**GCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
CATCACAA （配列番号１４）

【図６】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０ＡＳ）軽鎖

DIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFT
FTISSVQAEDLAVYYCQQHFSSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号１５）

【図７】

キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０ＡＳ）重鎖

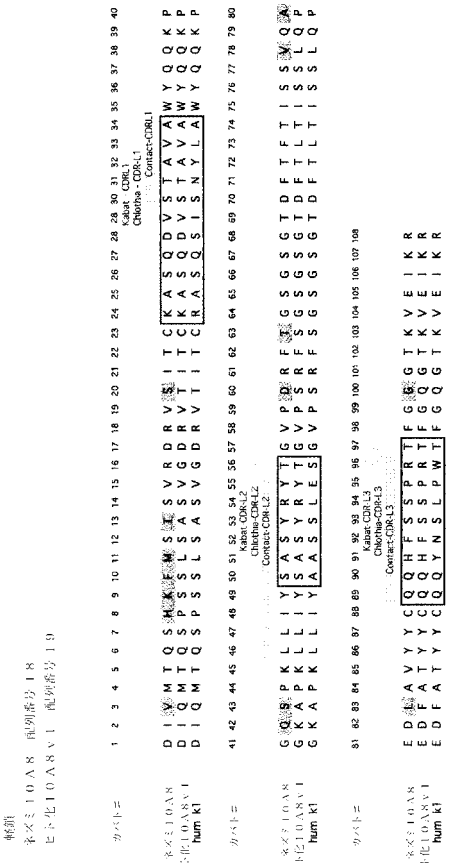
CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA
ACTGGAGTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA
AATCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGA
AGAGGCTGGAGTGGGTCGCTACCATTAGCGATGGTGGTAGTTTGACCTTCTATTTAGACAGTGTGAGGGGT
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGA
CACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCCTATTCCGGATTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTCGACAACAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
AGCACCTGAACCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGG
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTT
TATTGCAG （配列番号１６）

【図８】

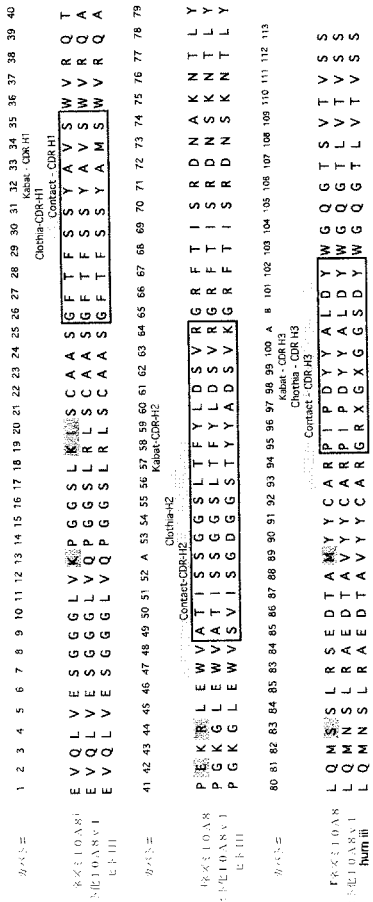
キメラ抗ヒトＦｃＲＨ５（ｍＡｂ１０ＡＳ）重鎖

EVQLVESGGGLVKPGGSLKISCAASGFTFSSYAVSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSLTFYLDSVRGRFTIS
RDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARPIPDYYALDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号１７）

【図９】



【図１０】



【図１１】

Hu10A8 軽鎖

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC （配列番号22）
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY （配列番号23）
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC （配列番号24）
FR4-LC: FGQGTKVEIKR （配列番号25）
HVR1-LC: KASQDVSTAVA （配列番号26）
HVR2-LC: SASYRYT （配列番号27）
HVR3-LC: QQHFSSPRT （配列番号28）

CL: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号29）

LC- 可変領域 :
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKR （配列番号30）
LC－可変領域 － CL：（配列番号66）

Hu10A8 重鎖
FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS （配列番号31）
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV （配列番号32）
FR3-HC: RGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC （配列番号33）
FR4-HC: WGQGTLVTVSS （配列番号34）
HVR1-HC: AASGFTFSSYAVS （配列番号35）
HVR2-HC: ATISSGGSLTFYLDSV （配列番号36）
HVR3-H3: ARPIPDYYALDY （配列番号37）

CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT （配列番号38）

Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号39）

HC- 可変領域 :
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
LDSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSS （配列番号40）
HC－可変領域 － CH1 ＋ Fc：（配列番号67）

【図１２】

抗FcRH5 A118C huMA10AS システイン操作された軽鎖/チオ－MAb

A. 軽鎖配列
チオ-huMA10A8-HC-A118C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFCQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQFSVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号41）

B. 重鎖配列
チオ-huMab10A8-HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFYLDSVRGRFTISRDNSKNT
LQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSSQSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
YECKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号42）

【図１３】

抗FcRH5 V205C huMA10AS システイン操作された軽鎖/チオ－MAb

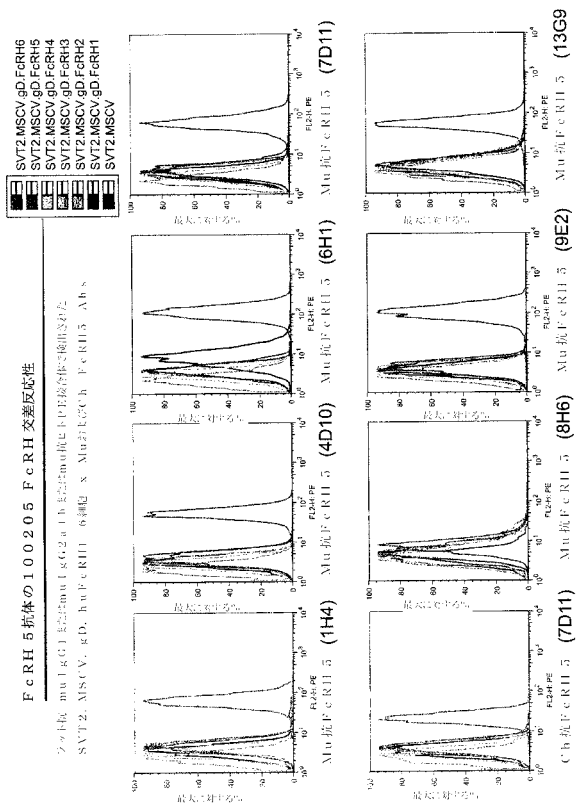
A. 軽鎖配列
チオ-huMab10A8-LC-V205C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC （配列番号43）

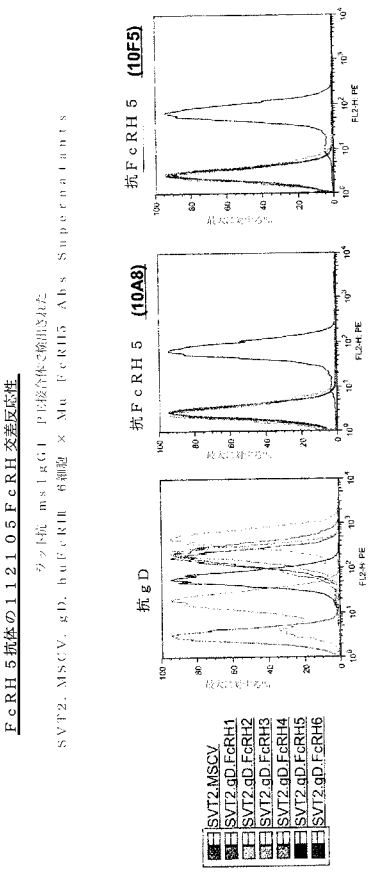
B. 重鎖配列
チオ-huMA10A8-LC-V205C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
LDSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号44）

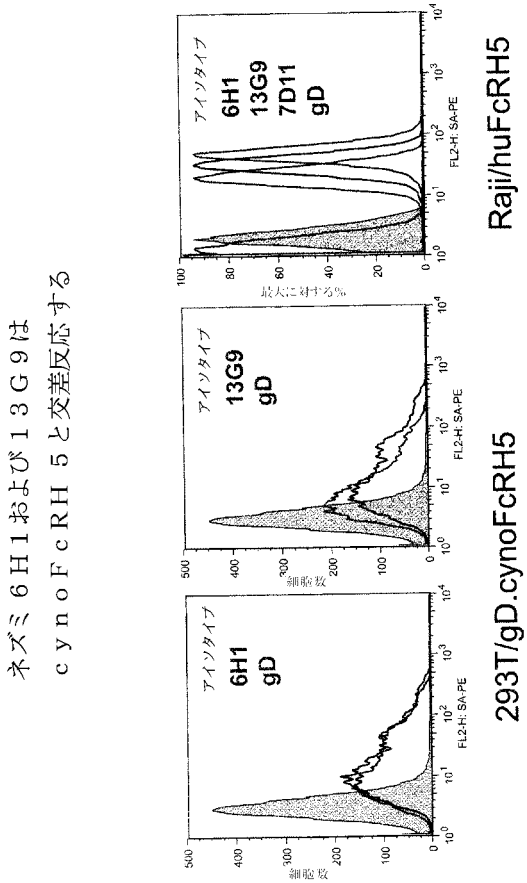
【図１４】



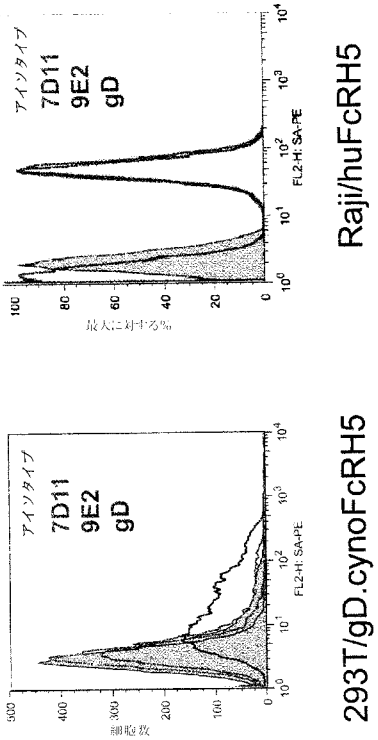
【図１５】



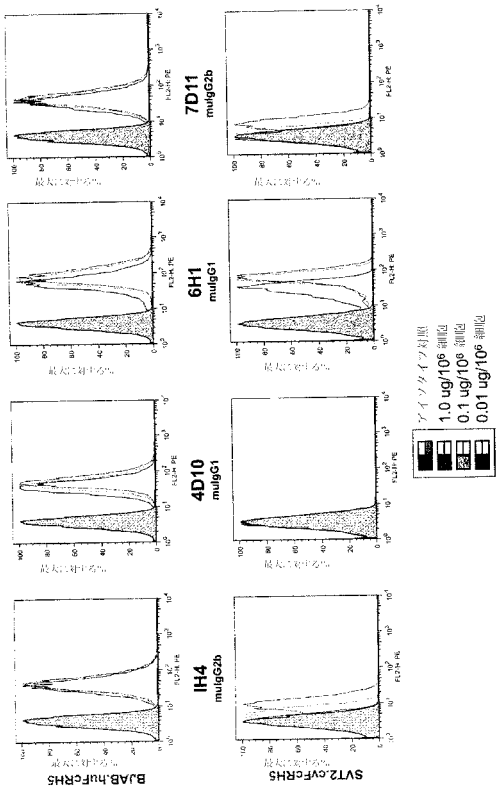
【図１６】



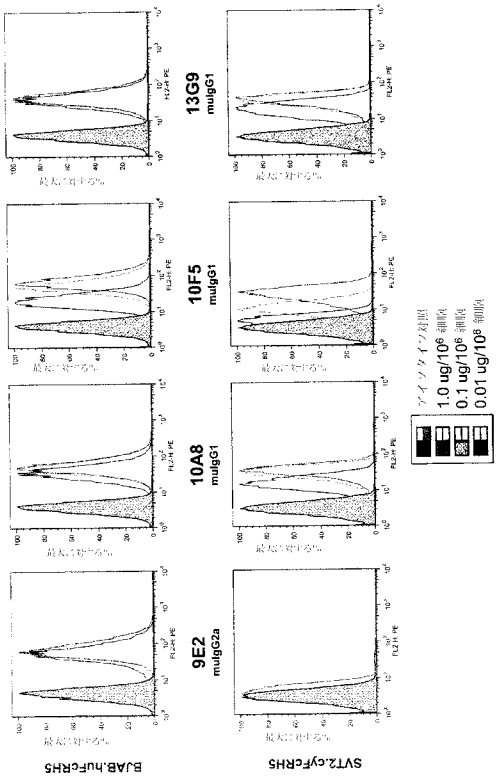
【図１７】



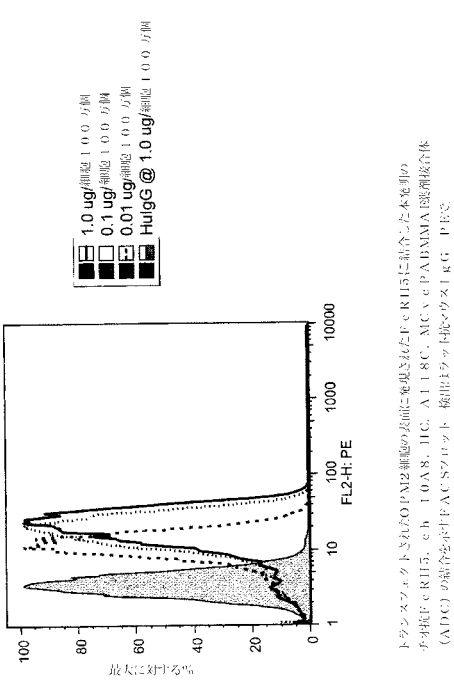
【図１８】



【図１９】

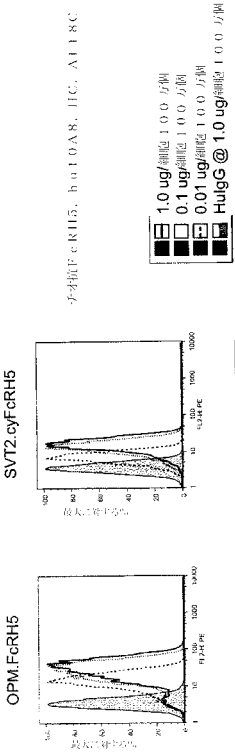


【図２０】



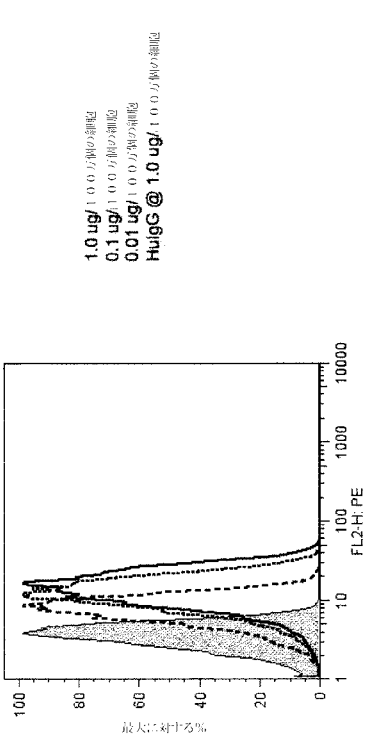
トランスフェクトされたOPM2細胞の表面に発現されたFcRH5に結合した本発明のチオ抗FcRH5，ch 10A8．HC．A118C．MC vc PABMMA抗体複合体（ADC）の濃合を示すFACSヒストグラム　検出はヤギ抗ヒトIgG PE結

【図２１】



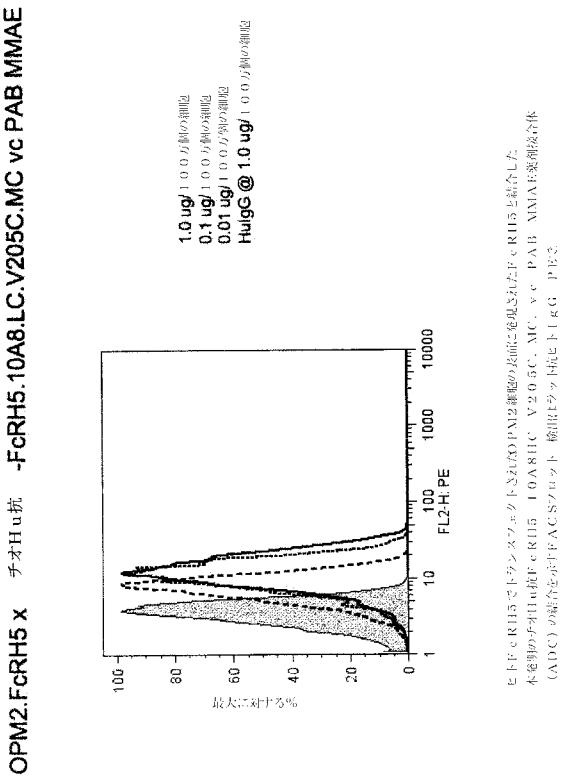
親チオヒト化抗FcRH5．10A8．HC．A118Cおよびチオヒト化抗FcRH5．10A8LC．V205Cと、huFcRH5でトランスフェクトされたOPM2細胞におけるcynoFcRH5でトランスフェクトされたSVT2細胞上の測定結合を示すFACSヒストグラム

【図２２】



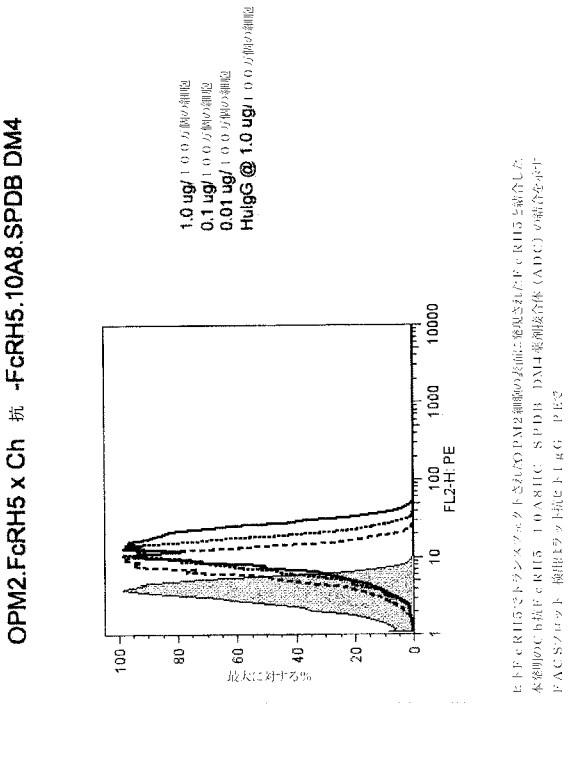
ヒトFcRH5でトランスフェクトされたOPM2細胞の表面に発現されたFcRH5と結合した本発明のチオHu抗FcRH5．10A8．HC．A118C．MC vc PAB MMAE抗体複合体（ADC）の濃合を示すFACSヒストグラム　検出はヤギ抗ヒトIgG PEで

【図２３】



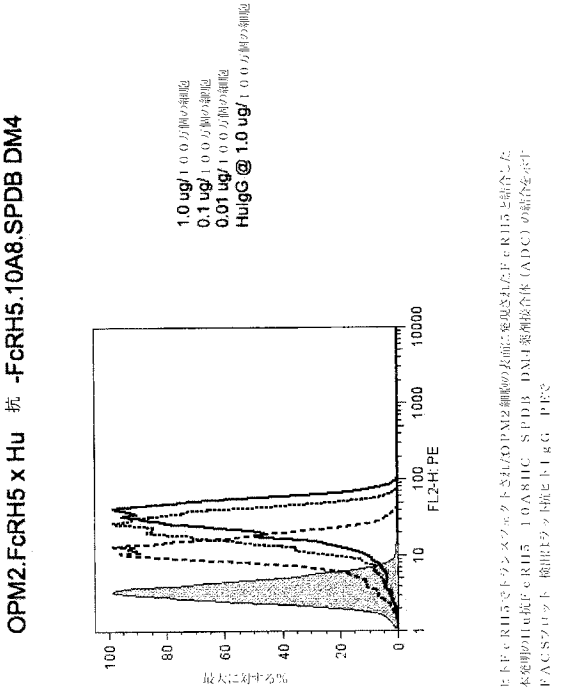
ヒトFcRH5でトランスフェクトされたOPM2細胞の表面に発現されたFcRH5と結合した本発明のチオHu抗FcRH5 10A8HC V205C.MC.vc PAB MMAE薬剤接合体(ADC)の結合を示すFACSプロット 検出はヒトIgG PE。

【図２４】



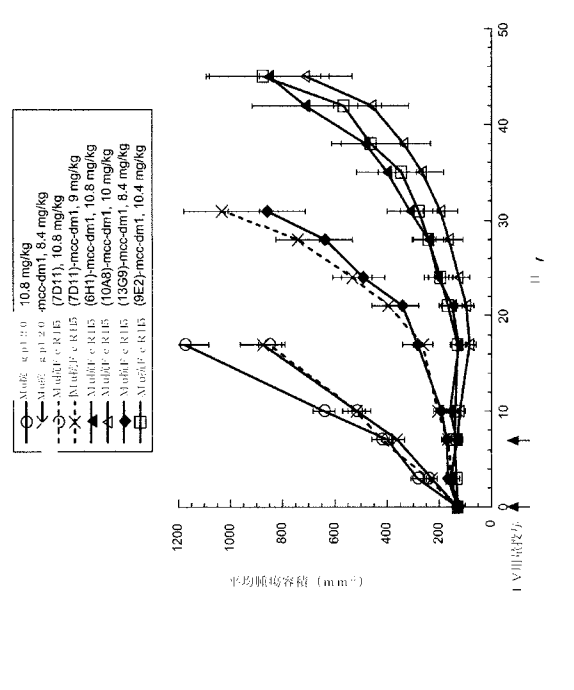
ヒトFcRH5でトランスフェクトされたOPM2細胞の表面に発現されたFcRH5と結合した本発明のCh抗FcRH5 10A8HC SPDB DM4薬剤接合体(ADC)の結合を示すFACSプロット 検出はヒトIgG PE。

【図２５】

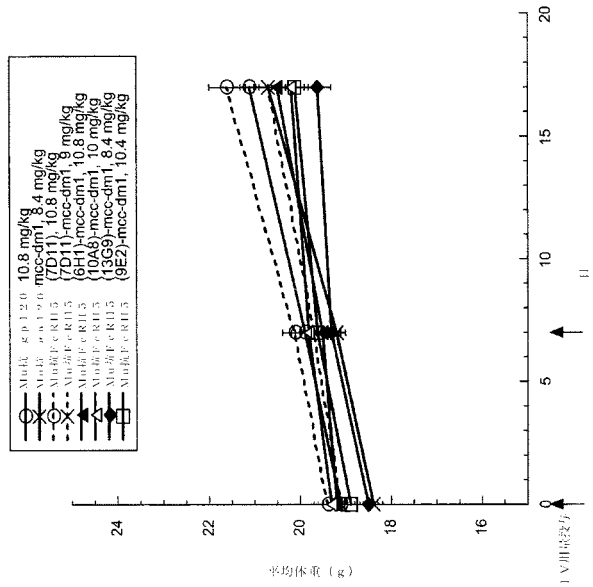


ヒトFcRH5でトランスフェクトされたOPM2細胞の表面に発現されたFcRH5と結合した本発明のHu抗FcRH5 10A8HC SPDB DM4薬剤接合体(ADC)の結合を示すFACSプロット 検出はヒトIgG PE。

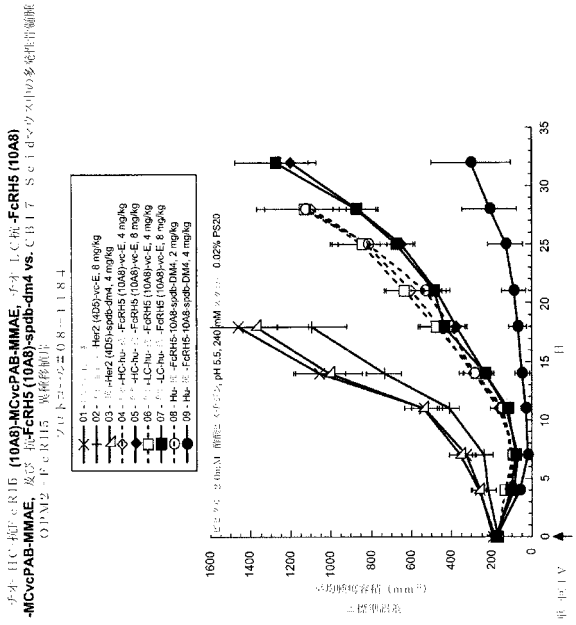
【図２６】



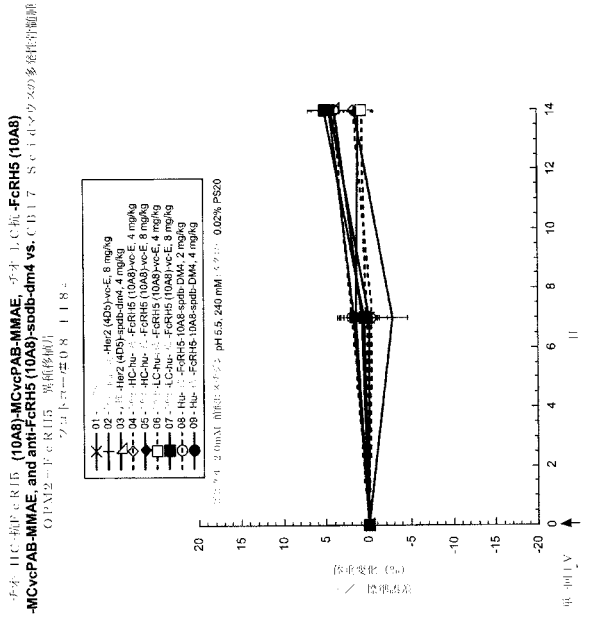
【図２７】



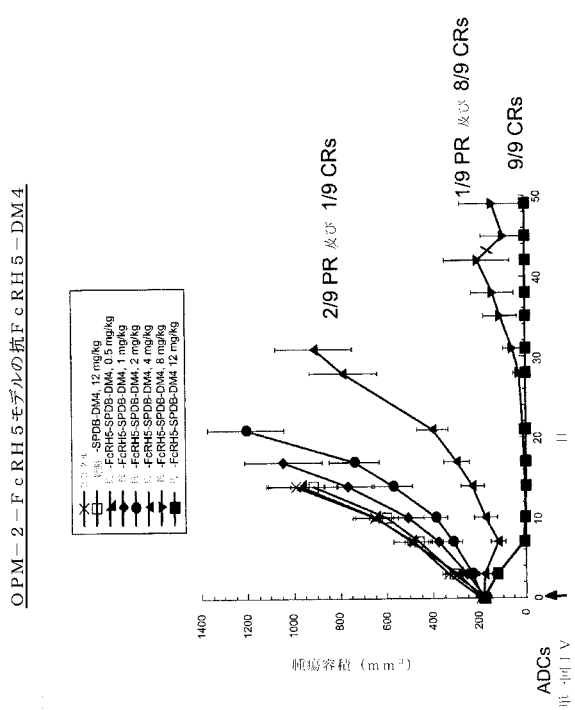
【図２８】



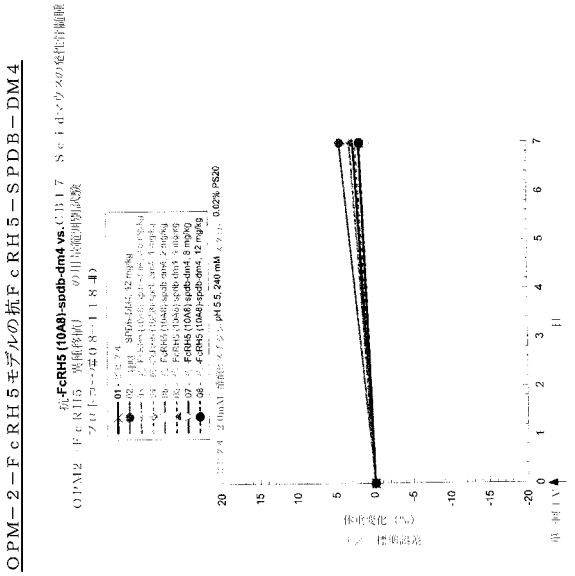
【図２９】



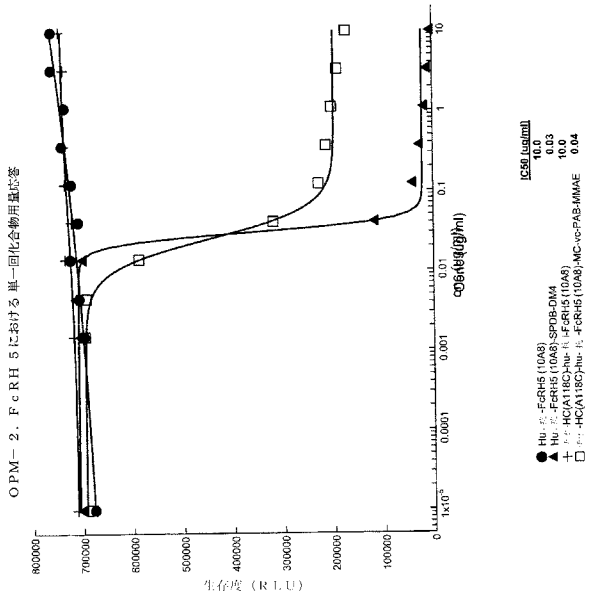
【図３０ａ】



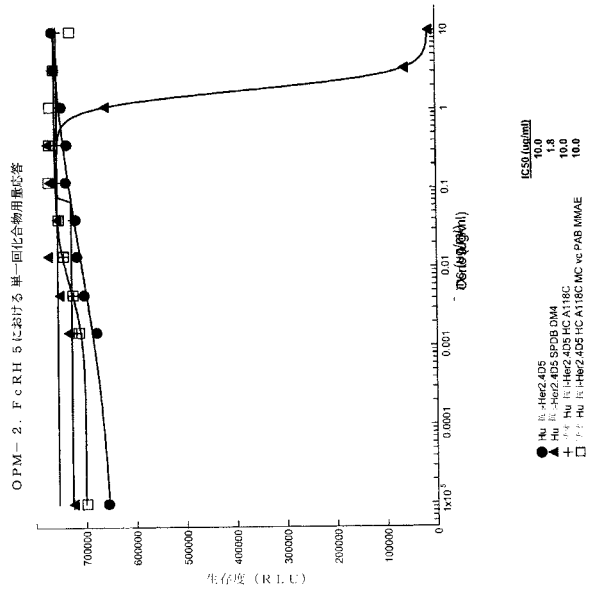
【図３０ｂ】



【図３１】



【図３２】



【図３３】

GATGTGCTCCTTGGAGCTGGTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTT
GGAATTGAGGAAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTC**ATG**CTCTGTGG
GTGATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATTAT
TTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCCTCACTTGCAAGG
GATTTCGCTTCTACTCACCACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTTGGGAAAGAAAT
ACTAAGAGAAACCCCAGACAATATCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAG
GCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTTCTTCAGAGATGGGATTTCCT
CATGCTGCCCAGGCTAATGTTGAACTCCTGGGCTCAAGTGATCTGCTCACC**TAG**GCCTCTCA
AAGCGCTGGGATTACAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACT
CTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAA
TGATAATGTCCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAA

【図３４】

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLGKE
ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSEMGFPPHAAQANVELLGSSDLLT

【図３５Ａ】

AATTCACTAATGCATTCTGCTCTTTTTGAGAGCACAGCTTCTCAGATGTGCTCCTTGGAGCTG
GTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTTGGAATTGAGGAAACTTCTC
TTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTC**ATG**CTGCTGTGGGTGATATTACTGGTCCTG
GCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATTATTTTCCTCCAGCCTCCATG
GACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCCTCACTTGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCAC
CACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTCGGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCCAG
ACAATATCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTC
AGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTTCTTCAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTG
TTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATA
CTATTTACAAGAATGATAATGTCCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCATATTCCTC
ATGCATGTCTCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAAGTTGTTGCCCT
GTTTCTTCCAATACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGCCATTTACACGTCCAGTGCTGAGAGC
CAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAACCCAGTGACCCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTC
TAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCGGTTCCGCTTCTTCAGAGATGACCAGACCCTGGGATTA
GGCTGGAGTCTCTCCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAAAGATTCAGGGTTCTA
CTGGTGTAAGGCAGCAACAATGCCTCACAGCGTCATATCTGACAGCCCGAGATCCTGGATA
CAGGTGCAGATCCCTGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTCAGCCCTGAAAAGGCTCTGAATTTT
GAGGGAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGCGCACTTTGTACA
GGTTTTATCATGAGGGTGTCCCCCTGAGGCACAAGTCAGTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCC
ATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGAATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCT
TGGCGCCAAGCCCAGTAAGGCTGTGAGCCTCTCAGTCACTGTTCCCGTGTCTCATCCTGTCCT
CAACCTCAGCTCTCCTGAGGACCTGATTTTTGAGGGAGCCAAGGTGACACTTCACTGTGAAG
CCCAGAGAGGTTCACTCCCCATCCTGTACCAGTTTCATCATGAGGATGCTGCCCTGGAGCGT
AGGTCGGCCAACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGAGCATTCAGG
GAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTAAGGCGGTGAGCCTCT
CCATCACTGTCCCTGTGTCTCATCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTG
AAGGAGCCACTGTGACACTTCACTGTGAAGTCCAGAGAGGTTCCCCACAAATCCTATACCA
GTTTTATCATGAGGACATGCCCCTGTGGAGCAGCTCAACACCCTCTGTGGGAAGAGTGTCCT
TCAGCTTCTCTCTGACTGAAGGACATTCAGGGAATTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTT
GGTCCCCAGCGCAGTGAAGTGGTGAGCCTTTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTC
ACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGG
CCCCGAGAGGCTCTCCCCCAATCCTGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGC
AGCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGAAGCTTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGG
AAACTACTCATGTGAGGCCAACAATGGCCTAGTGGCCCAGCACAGTGACACAATATCACTC
AGTGTTATAGTTCCAGTATCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGGGCTCCCAGGGCCCAGGCTGT
GGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACT
GGTTTTATCATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCCTCC
TTCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCAGACAATGGTCC
GGAGGCCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTCGCCCCGGTC
CTCACCCTCAGGGCTCCCGGGACCCATGCTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGA
GGCCCTGAGAGGCTCTCCCCTGATCCTGTACCGGTTTTTTCATGAGGATGTCACCCTAGGAA
ATAGGTCGTCCCCCTCTGGAGGAGCGTCCTTAAACCTCTCTCTGACTGCAGAGCACTCTGGA
AACTACTCCTGTGAGGCCGACAATGGCCTCGGGGCCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTT
ATATCACAGGGCTGACCGCGAACAGAAGTG

【図３５Ｂ】

GCCCTTTGCCACAGGAGTCGCCGGGGGCCTGCTCAGCATAGCAGGCCTTGCTGCGGGGGC
ACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAGCCTGCCTCTGACCCCGCCA
GGAGCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACCTATCACAATGTACCAGCCTGGGAAGA
GCTGCAACCAGTGTACACTAATGCAAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAAGTA
CGGATCATCCAAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCTGACCCCAGGCATCTCAGGAACA
AGGGTTCCCCTATCATCTACTCTGAAGTTAAGGTGGCGTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTG
TTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCACAGA**TGA**GTCCACACGTCTCTCCAACTGCTGTTTCAGCCT
CTGCACCCCAAAGTTCCCCTTGGGGGAGAAGCAGCATTGAAGTGGGAAGATTTAGGCTGCC
CCAGACCATATCTACTGGCCTTTGTTTCACATGTCCTCATTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGG
GCCCTGCTGGACTGTCACCTGTTTCCCAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTTAATCCAGT
GGCAAGGTGCTCCCACTCCAGGGCCCAGCACATCTCCTGGATTCCTTAGTGGGCTTCAGCTG
TGATTGCTGTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCCACAGAGGGGGTCTTACCACACAAAG
GGAGAGTGGGCCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCCTAACAGCTCAGGTGCTCCTAAACTCCG
ACACAGAGTTCCTGCTTTGGGTGGATGCATTTCTCAATTGTCATCAGCCTGGTGGGGCTACT
GCAGTGTGCTGCCAAATGGGACAGCACACAGCCTGTGCACATGGGACATGTGATGGGTCTC
CCCACGGGGGCTGCATTTCACACTCCTCCACCTGTCTCAAACTCTAAGGTCGGCACTTGACA
CCAAGGTAACTTCTCTCCTGCTCATGTGTCAGTGTCTACCTGCCCAAGTAAGTGGCTTTCATA
CACCAAGTCCCAAGTTCTTCCCATCCTAACAGAAGTAACCCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGG
ACCAGGGGTGCAGACAGAACACATACTGGAACACAGGAGGTGCTCAATTACTATTTGACTG
ACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAGAAAACTGTGGGTAATCAAACTGGCATAAAAT
CCAGTGCACTCCCTAGGAAATCCGGGAGGTATTCTGGCTTCCCTAAGAAACAACGGAAGAG
AAGGAGCTTGGATGAGGAAACTGTTCAGCAAGAGGAAGGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTT
GTGGATCACCTGAGGATCCTGTGAAAATACAGATACTGATTCAGTGGGTCTGTGTAGAGCCT
GAGACTGCCATTCTAACATGTTCCCAGGGGATGCTGATGCTGCTGGCCCTGGGACTGCACTG
CATGCATGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGAATGTGTGGCTCTG
GCTGCCCAGGGCCCAACTCGGTTCACACGGATCGTGCTGCTCCCTGGCCAGCCTTTGGCCAC
AGCACCACCAGCTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTCTGTGACATGTTGGCTTTCATCAGCC
ACCCTGGGAAGCGGAAAGTAGCTGCCACTATCTTTGTTTCCCCACCTCAGGCCTCACACTTT
CCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCCATTCAGAGTTGTTCTCCCATCT
CTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTATGATATCCATCACATCTTATCTTGATCTTTGC
TCCCAGTGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAGCCCCACGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAA
GGGCATTGGAAGCTCTCTCCACCTGAACCATGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTCAGGGCCTT
GCCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGCTGCCCCAACCTTTCAAGGAGGAAACCAGACACCTG
AGACAGGAGCCTGTATGCAGCCCAGTGCAGCCTTGCAGAGGACAAGGCTGGAGGCATTTGT
CATCACTACAGATATGCAACTAAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCACCGAGG
CCGCTTTTTTAGGCCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTA
AAGAAAAAAATCTGCTCACAGTTTGTTCTGGAGGTCACATCACCAACAAAGCTCACGCCCTA
TGCAGTTCTGAGAAGGTGGAGGCACCAGGCTCAAAAGAGGAAATTTAGAATTTCTCATTGG
GAGAGTAAGGTACCCCCATCCCAGAATGATAACTGCACAGTGGCAGAACAAACTCCACCCT
AATGTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCCTGAGTGTAACAAAAGGGCTTATTCTTC
CTCAAGTAAGGGGGAACTCCTGCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTTCTGCTTTCAGACGCAA
ACTGAAAAATGGCTCTTCTTGGGTCTTGAGCTTGCTGGCATATGGACTGAAAGAAACTATGC
TATTGGATCTCCTGGATCTCCAGCTTGCTGACTGCAGATCTTGAGATATGTCAGCCTCTACAG
TCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATCTTTCTGTAAA

【図３６】

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLGKE
ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCRAKAEVTL
NNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIPHACLKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNTVKIQVQEPFTRPVLR
ASSFQPISGNPVTLTCETQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWSLSPNFQITAMWSKDSGFYWC
KAATMPHSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEGTKVTLHCETQEDSLRTLYRFYHEG
VPLRHKSVRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNGLGAKPSKAVSLSVTVPVSHPVLNLSSPEDLI
FEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAALERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFG
PQRSKAVSLSITVPVSHIPVLTLSSAEALTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPS
VGRVSFSFSLTEGHSGNYYCTADNGFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELH
CEAPRGSPPILYWFYHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSV
IVPVSRPILTFRAPRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSLT
TEHSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPGTHAAVGDLLELHCEALRGSPLIL
YRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYITGLTANRSGPF
ATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLSRKAGRKPASDPARSPPDSDSQEPTYHNVPAWEELQPV
YTNANPRGENVVYSEVRHOEKKKHAVASDPRHLRNKGSPIIYSEVKVASTPVSGSLFLASSAPHR

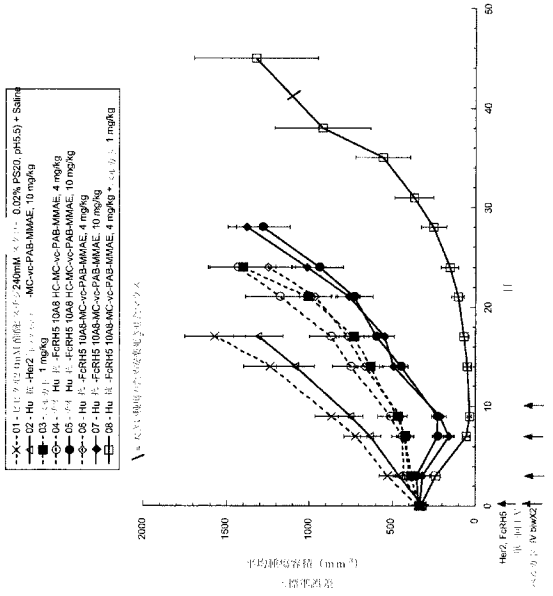
【図３７】

ATGCTGCTGTGGGTGATACTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGTAAGGACATACAAGTC
CATTATTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCGAGGAGAGAGAGTGAATCTGACTTGCAAGG
GATTTGGCTTCTACTCATCACAAAAAACAAAATGGTACTATCGGCACCTTGGGAAAGAAATATCGAGA
GAAACCCAAAAAAATACCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCC
CTCTCAGTAGCCCTGTGTCCTTGGACTTTCTTCAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTT
TGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAAGACTACTATTTAC
AAGAATGAAAATGTCCTGGCATTTCTTAATAAATCAACTGACTTCCATATTTCTCATGCAAGTCTCAAG
GACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAACTTGTTGCCTTGTTTCTTCCAACACAGTCAA
AATCCAAGTCCAAGAGTCATTTACACGTCCAGTGTTGAGAGTCAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGA
GCCCAGTGACCCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTCTAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCAGTTCTGC
TTCTTCAGAAATGACCAGATGCTGGGATCAGGCTGCAGCCTCTCCCCGAAGTTCCGGATTACTGCCAT
GTGGAGTAAAGATTCAGGATCCTACTGGTGTAAGGCAGCAACAATGTGTTATGACACCACATCTAACA
GCTTGAGATCCTGGATACAGGTGCTGATCCCCGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTCAGCCCTGAAAAG
GCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGAAACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGCGCACTTT
GTACAAGTTTTATCATGACGGTGTTCCCCTGAGGTACAAGTCAGTCCGCTGTGAAAAGGGAGCATCCA
TCAGCTTCTCACTGACTACAGAGCATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCATGGTGCC
AAGCCCAGTGAGGCTGTAAGCCTGTCAGTCACTGTCCCTGTGTCTCGCCCTGTCCTCACCCTCAGCTCT
GCAGAGGACCTGATTTCTGAGGGAGCCAAGTTGACACTTCACTGTGAAGCCCAGAGAGGTTCACTCCC
CATCGTGTACCAGTTTCATCATGAGAATGCCTCCCTGGGGAATAGGTCGGCCCACTCTGCAGGAGGAG
TGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGACCATTCGGGGAACTACTACTGCACAGCTAACAATGGCTTT
GGCCCCCAGCGCAGTGAGGCAGTGAGCCTCTCCATCACTGTACCCGTGTCTCGTCCTGTCCTCACCCTC
AGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTGAAGGAGCCACGGTGACACTTTACTGTGAGGTCCAGAGAGGTTC
CCCACGAATCCTATACCAGTTTTATCATGAGGACGTGCCCCTGGGGAGCAACTCAACACCCTCTGTGG
GAAAAGTGTCCTTCAGCTTCTCTCTGACTGCAGCACATTCAGGGAATTACTACTGCACAGCTGACAAC
GGCTTTGGTCCCCAGCGCAGTGAGGCGGTGAGCCTCTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTC
ACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTTCTGGAGCTTCGCTGTGAGGCCCTGAG
AGGCTCTCCCCCGATCATGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGCAGCTCAGTCCCCTC
TGGAGGAGAAGCCTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAAACTACTCATGTGAGGCCA
ACAATGGCCTGGTGGCCCAGCACAGTGATACAATATCACTCAGTGTTATAGTTCCAGTGTCTCGTCCC
ATCCTCACCTTCAGAGCTCCCAGGGCCCAGGCTGTAGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGC
CCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTTATCATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGC
CCCCTCTGGAGGAGGAGCCTACTTCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGA
GGCGGACAATGGTCTGGAGGCCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCT
CGCCCCGTCCTCACCCTCAGGGCTCCCAGGGCCCAGGTTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTG
TGAGGCCCTGAGAGGCTCTCCCCTGATCCTGTACCAGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTAGGAAATA
GCTCAGCCCTCTCTGGAGGAGGCGTTCTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACACTCTGGAAACTACTCCT
GTGAGGCCCGACAATGGTCTGGGGGCCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATCTCACAGGGCTGAC
CGAGAACAGAAGTGGCCCTGTTGCCACGGGTGTCACCGGGGGTCTGCTCAGCCTAGCAGGCCTTGCTG
CTGTGGCACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCAAGAAAAGCAGGGAGAGAGCCTGCCTCTGACCCCTGC
AGGAGCCCTTCAGACTTGGACTCCCAGGAGCCCACCTACCACAATGTACCAGCCTGGGAAGAGCTGC
AACCAGTGTACAGTAATGTGAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAAGTACGGATCATCCG
AGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCTAACCCCAGGCATCTCAGGAACAAGGGTTCCTGTATCATC
TACTCTGAAGTGAAGGTGGCATCAACCCCAGCCTCCAGATGCCTGTTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCAC
AGATGA

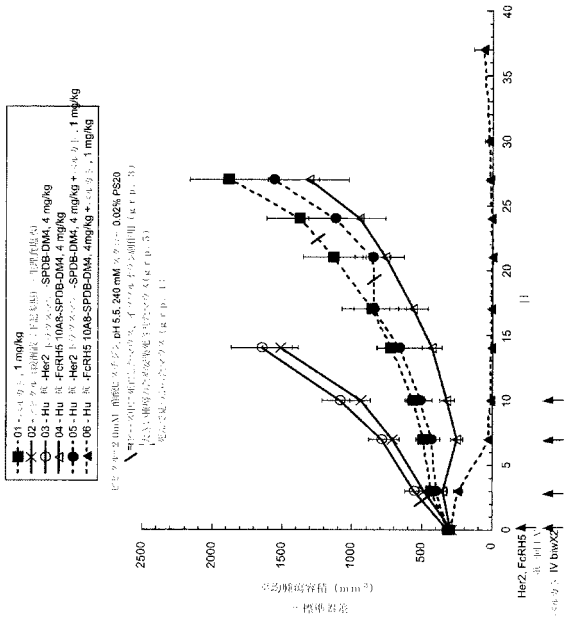
【図３８】

MLLWVILLVLAPVSGQFVRTYKSIIFLQPPWTTVFRGERVNLTCKGFGFYSSQKTKWYYRHLGK
EISRETQKNTLEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVSLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCRAKAEVT
LKTTIYKNENVLAFLNKSTDFHISHASLKDNGAYRCTGYKETCCLVSSNTVKIQVQESFTRPVLR
VSSFQPISGSPVTLTCETQLSLERSDVPLQFCFRNDQMLGSGCSLSPKFRITAMWSKDSGSYWC
KAATMCYDTTSNSLRSWIQVLIPASHPVLTLSPEKALNFEGTKVKLHCETQEDSLRTLYKFYHDG
VPLRYKSVRCEKGASISFSLTTEHSGNYYCTADNGHGAKPSEAVSLSVTVPVSRPVLTLSSAEDLI
SEGAKLTLHCEAQRGSLPIVYQFHHENASLGNRSAHSAGGVAISFSLTADHSGNYYCTANNGFG
PQRSEAVSLSITVPVSRPVLTLSSAEALTFEGATVTLYCEVQRGSPRILYQFYHEDVPLGSNSTPSV
GKVSFSFSLTAAHSGNYYCTADNGFGPQRSEAVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELRC
EALRGSPPIMYWFYHEDVTLGSSSVPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSVI
VPVSRPILTFRAPRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGAYFNLSLTT
EHSGIYSCEADNGLEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPRAQVAVGDLLELHCEALRGSPLIL
YQFYHEDVTLGNSSALSGGAFFNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYLTGLTENRSGP
VATGVTGGLLSLAGLAAVALLLYCWLSRKAGREPASDPCRSPSDLDSQEPTYHNVPAWEELQP
VYSNVNPRGENVVYSEVRHREKKKHAVASNPRHLRNKGSCIIYSEVKVASTPASRCLFLASSAP
HR

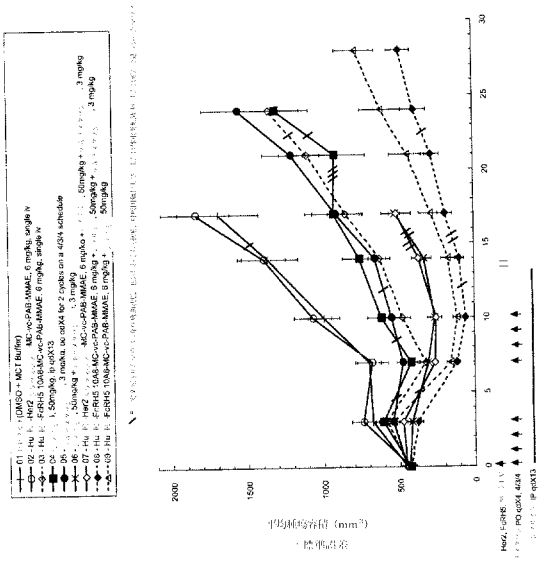
【図３９】



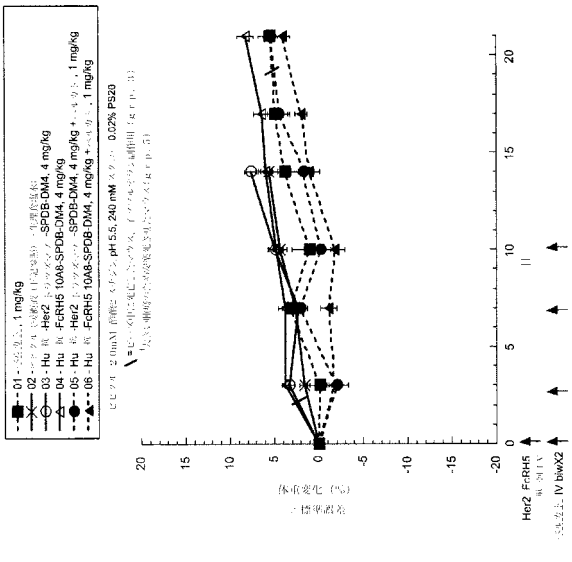
【図４０】



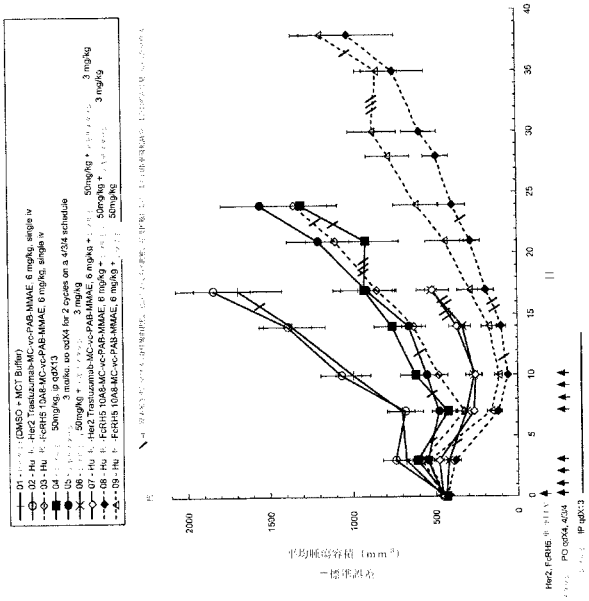
【図４１】



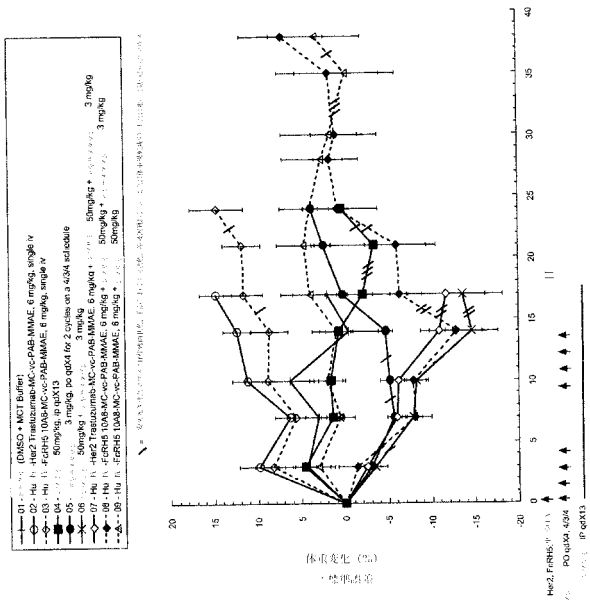
【図４２】



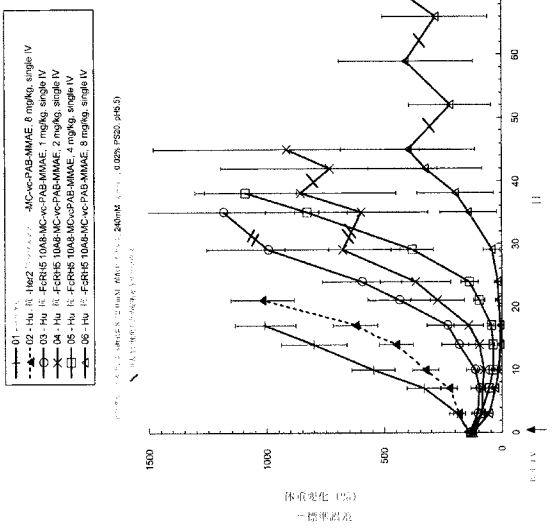
【図４３】



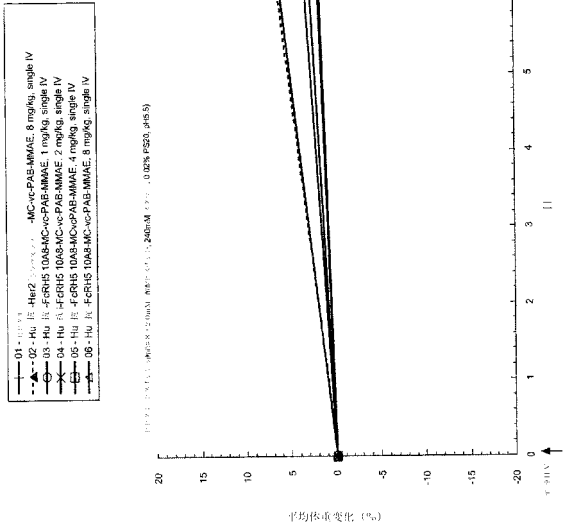
【図４４】



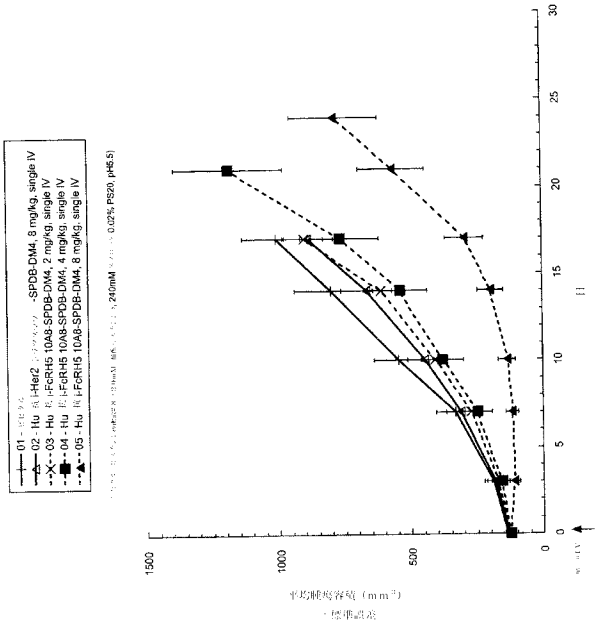
【図４５】



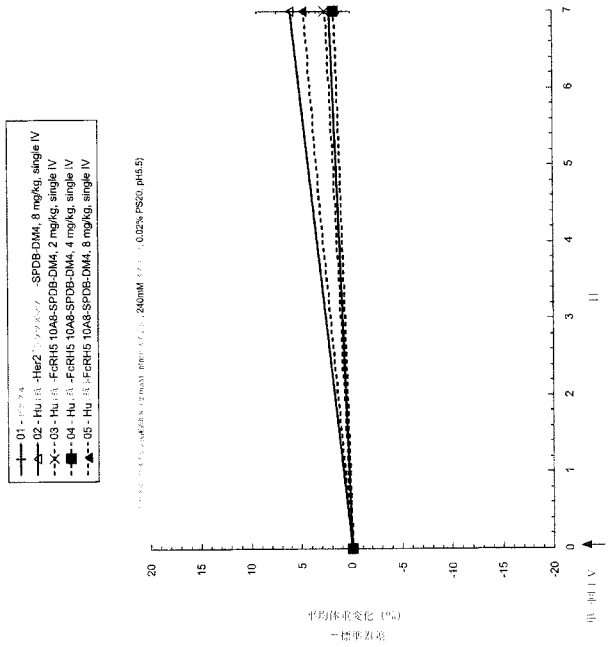
【図４６】



【図４７】



【図４８】



【配列表】
2016063812000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成27年11月20日(2015.11.20)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/0781*	*(2010.01)*	C12N	5/0781		4C084
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4C085
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		4C086
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		4H045
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12Q	*1/02*	*(2006.01)*	C12Q	1/02		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		
C07K	*4/00*	*(2006.01)*	C07K	4/00		
C07K	*5/062*	*(2006.01)*	C07K	5/062		
C07K	*5/08*	*(2006.01)*	C07K	5/08		
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	C07K	7/06		
C07K	*11/00*	*(2006.01)*	C07K	11/00		
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	C	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61K	*47/48*	*(2006.01)*	A61P	43/00	105	
A61K	*38/00*	*(2006.01)*	A61K	47/48		
A61K	*47/42*	*(2006.01)*	A61K	37/02		
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	47/42		
A61K	*31/5365*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	31/5365		
			A61P	43/00	121	
			G01N	33/53	D	

1．ＵＮＩＸ

(72)発明者 エベンズ, アレン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０７０, サン カルロス, アロヨ アベニュー １９３２
(72)発明者 アダムス, カメリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９５１２４, サン ノゼ, レイクバード ドライブ １８９９
(72)発明者 ジェン, ビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０４０, マウンテン ビュー, モンテリーナ コート １５６
(72)発明者 ジュニュチュラ, ジャガス, アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５５５, フリーモント, テューペロ ストリート ３４３９１
(72)発明者 ホンゴ, ジョーアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０６１, レッドウッド シティ, ショー コート ３１
(72)発明者 ウー, ヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティー, ブライス ストリート １１６０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 BA54 CA04 CA06 CA07 DA03 EA04 GA11

	HA01	HA06	HA15							
4B063	QA01	QA07	QA19	QQ03	QQ08	QQ79	QR48	QR72	QR77	QS33
	QS36									
4B064	AG27	CA19	CA20	CC24	CE12	DA05	DA14			
4B065	AA92Y	AA93X	AA94X	AA94Y	AB01	AB05	AC12	AC14	AC20	BA02
	BA08	BB13	BB19	BC12	CA25	CA44	CA46			
4C076	AA95	CC27	CC29	CC41	EE41A	EE59A	FF32	FF68		
4C084	AA02	AA03	AA19	BA01	BA08	BA17	BA18	BA41	MA05	MA16
	MA66	NA05	NA13	ZB211	ZB261	ZB271	ZC751			
4C085	AA13	AA14	AA16	AA19	BB31	BB41	BB42	CC21	CC22	CC23
	EE01	EE03	EE05	GG01	GG02	GG03	GG04	GG05		
4C086	AA01	AA02	CB22	MA02	MA05	MA07	NA05	NA13	ZB21	ZB26
	ZB27	ZC75								
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA11	BA12	BA13	BA14	BA40	BA51
	BA72	CA40	CA50	DA76	DA83	EA28	EA51	FA20	FA50	FA72
	FA74	GA26								

【外国語明細書】
2016063812000001.pdf

专利名称(译)	抗FcRH5抗体和免疫缀合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2016063812A	公开(公告)日	2016-04-28
申请号	JP2015208374	申请日	2015-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	エルキンズクリスティ ポルソンアンドリュー エベンズアレン アダムスカメリア ジェンビン ジュニュチュラジャガスアール ホンゴジョアン ウーヤン		
发明人	エルキンズ, クリスティ ポルソン, アンドリュー エベンズ, アレン アダムス, カメリア ジェン, ビン ジュニュチュラ, ジャガス, アール. ホンゴ, ジョ-アン ウー, ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C07K16/30 C12P21/08 C12N5/09 C12N5/0781 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C07K19/00 C07K4/00 C07K5/062 C07K5/08 C07K7/06 C07K11/00 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 A61K47/48 A61K38/00 A61K47/42 A61K45/00 A61K31/5365 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/138 A61K31/4196 A61K31/454 A61K31/4745 A61K31/517 A61K31/56 A61K31/568 A61K31/5685 A61K31/69 A61K33/24 A61K38/19 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K16/283 C07K2317/24 C07K2317/522 C07K2317/73 G01N33/574 G01N33/6857 Y02A50/473 C07K16/2803 C07K2317/565 A61K39/0011 A61K39/001102 A61K39/39533 A61K39/39558 A61K2039/804 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/46 C07K16/30 C12P21/08 C12N5/09 C12N5/0781 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C07K19/00 C07K4/00 C07K5/062 C07K5/08 C07K7/06 C07K11/00 C07K16/28 A61K39/395.C A61K39/395.L A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.105 A61K47/48 A61K37/02 A61K47/42 A61K45/00 A61K31/5365 A61P43/00.121 G01N33/53.D A61K38/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/14 A61K38/15 A61K38/16 A61K47/50 A61K47/68 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/63.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA06 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA92Y 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BB13 4B065/BB19 4B065/BC12 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC29 4C076/CC41 4C076/EE41A 4C076/EE59A 4C076/FF32 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA41 4C084/MA05 4C084/MA16 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC751 4C085/AA13		

	4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB22 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA07 4C086/NA05 4C086/NA13 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA40 4H045/BA51 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA20 4H045/FA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26
优先权	61/211695 2009-04-01 US 61/266972 2009-12-04 US 61/166217 2009-04-02 US
其他公开文献	JP2016063812A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

为了提供有用的抗FcRH5的抗体在治疗哺乳动物的造血系统肿瘤的。（A）一种抗FcRH5抗体，包括：A（I）HVR-L3（iv）序列GFTFSSYAVS包含HVR-L2（iii）序列QQHFSSPRT包含HVR-L1（ii）序列SASYRYT包含序列KASQDVSTAVA从HVR-H3中选择包含HVR-H2或至少一个HVR序列（vi）SEQ PIPDYYALDY包括HVR-H1（v）的序列ATISSGGSLTFYLDSVR包括;和（b）至少一种变异HVR，该突变HVR包含序列的至少一个残基的修饰。【选择图】无

(21) 出願番号　特願2015-208374 (P2015-208374)
(22) 出願日　平成27年10月22日 (2015.10.22)
(62) 分割の表示　特願2012-503679 (P2012-503679) の分割
原出願日　平成22年3月31日 (2010.3.31)
(31) 優先権主張番号　61/211,695
(32) 優先日　平成21年4月1日 (2009.4.1)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(31) 優先権主張番号　61/266,972
(32) 優先日　平成21年12月4日 (2009.12.4)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(31) 優先権主張番号　61/166,217
(32) 優先日　平成21年4月2日 (2009.4.2)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(特許庁注：以下のものは登録商標)

(71) 出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74) 代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72) 発明者　エルキンズ，　クリスティ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94080，　サウス　サンフランシスコ，　メーブル　アベニュー　524
(72) 発明者　ポルソン，　アンドリュー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94131，　サンフランシスコ，　バークレー　ウェイ　281

最終頁に続く