(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2018-150305
(P2018-150305A)
(43)公開日　平成30年9月27日(2018.9.27)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 88 頁）

(21)出願番号　特願2018-75311(P2018-75311)
(22)出願日　平成30年4月10日(2018.4.10)
(62)分割の表示　特願2016-226619(P2016-226619)の分割
原出願日　平成16年3月19日(2004.3.19)
(31)優先権主張番号　60/456,652
(32)優先日　平成15年3月19日(2003.3.19)
(33)優先権主張国　米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
1．ＴＷＥＥＮ

(71)出願人　501343271
アムジェン・フレモント・インコーポレイテッド
Ａｍｇｅｎ　Ｆｒｅｍｏｎｔ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９１３２０カリフォルニア州サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉　真奈美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）抗原に対する抗体およびその使用。

(57)【要約】
【課題】抗原ＴＩＭ－１に結合する抗体、およびかかる抗体の使用を提供すること。
【解決手段】抗原ＴＩＭ－１に結合する完全ヒトモノクローナル抗体が提供され、重鎖および軽鎖免疫グロブリン分子をコードする単離されたポリヌクレオチド配列およびそれらの分子を含むアミノ酸配列、特にフレームワーク領域（ＦＲ’ｓ）および／または相補性決定領域（ＣＤＲ’ｓ）、とりわけＦＲ１ないしＦＲ４、またはＣＤＲ１ないしＣＤＲ３にわたる、隣接した重鎖および軽鎖の配列に対応する配列が提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその結合フラグメント。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．セクション１１９（ｅ）のもと、米国仮出願第６０／４５６，６５２号（出願日２００３年３月１９日）に対する優先権を主張し、これにより明確に参考文献に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
本明細書中に開示される発明は、Ｔ細胞抗原、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）タンパク質へ結合する抗体およびかかる抗体の使用に関連している。特に、抗原ＴＩＭ－１に結合する完全ヒトモノクローナル抗体が提供される。重鎖および軽鎖の免疫グロブリン分子をコードするヌクレオチド配列、およびそれらを含むアミノ酸配列であって、特にフレームワーク領域および／または相補性決定領域（ＣＤＲｓ）、とりわけＦＲ１ないしＦＲ４、またはＣＤＲ１ないしＣＤＲ３にわたる、隣接した重鎖および軽鎖の配列に対応する配列が提供される。かかる免疫グロブリン分子およびモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマまたは他の細胞株も提供される。
【０００３】
関連技術の説明
Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン（ＴＩＭ）タンパク質（ヒト中３つ、マウス中８つ）をコードする新しい遺伝子ファミリーが、免疫において最近明らかになった性質とともに説明されている（Ｋｕｃｈｒｏｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３：４５４－４６２（２００３）；ＭｃＩｎｔｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：１１０９－１１１６（２００１））。ＴＩＭ遺伝子ファミリーメンバーは染色体領域（ヒト中５ｑ３３．２およびマウス中１１Ｂ１．１）中に存在し、またアレルギーおよび自己免疫疾患に関連している（Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：３８９－４００（２００２）；Ｗｉｌｌｓ－Ｋａｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ４：１０５０－１０５２（２００３））。
【０００４】
ＴＩＭファミリーメンバーの１つであるＴＩＭ－１は、Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体（ＨＡＶｃｒ－１）としても知られており、もともとＡ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）受容体として見出された（（Ｋａｐｌａｎ ｅｔ ａｌ，ＥＭＢＯ Ｊ １５（１６）：４２８２－９６（１９９６））。この遺伝子はその後、腎臓損傷の分子１（ＫＩＭ－１）としてクローニングされた（Ｉｃｈｉｍｕｒａ ｅｔ－ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７３：４１３５－４１４２（１９９８）；Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔ ６２：２３７－２４４（２００２））。
【０００５】
Ｋａｐｌａｎらは、該受容体を発現する主要なアフリカングリーンモンキー（Ａｆｒｉｃａｎ Ｇｒｅｅｎ Ｍｏｎｋｅｙ）腎臓（ＡＧＭＫ）細胞株のｃＤＮＡライブラリーから、Ａ型肝炎ウイルスに関する細胞受容体を単離した（米国特許第５，６２２，８６１号参照）。ポリペプチドおよび核酸の有用性が開示されており、それはＡ型肝炎ウイルスによる感染を診断し、試料中の不純物からＡ型肝炎ウイルスを分離し、Ａ型肝炎ウイルスによる感染を治療し、さらに予防することだった。さらには、該ポリペプチドは形質転換細胞中で発現させることができ、抗Ａ型肝炎ウイルス結合アッセイにおいて、化合物の効力を試験するために用いることが可能である。

【０００６】
ヒト相同体、ｈＨＡＶｃｒ－１（ａｋａ　ＴＩＭ－１）は、Ｆｅｉｇｅｌｓｔｏｃｋらにより（Ｊ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７２（８）：６６２１－６６２８（１９９８））で説明された。同じ分子がＰＣＴの公開番号：ＷＯ　９７／４４４６０およびＷＯ　９８／５３０７１、および米国特許第６，６６４，３８５号で腎臓損傷－関連分子（ＫＩＭ）として説明されており、この分子は腎臓損傷後に腎臓組織中で上方制御されていることが見出された。この分子は様々な治療診断、特に腎臓疾患、障害または損傷において有用であるものとして説明された。例えばＰＣＴの公開番号ＷＯ　０２／０９８９２０は、ＫＩＭの抗体を説明し、また例えば腎臓細胞または腎臓癌細胞のごときＫＩＭ－１発現細胞からのＫＩＭ－１ポリペプチドの流出を阻害する抗体を説明している。
【０００７】
ＴＩＭ－１は、新規の６－システイン免疫グロブリン様ドメインおよびムチンスレオニン／セリン／プロリン（Ｔ／Ｓ／Ｐ）リッチなドメインを含む、タイプ１型の膜タンパク質である。ＴＩＭ－１はもともとラット中で同定された。ＴＩＭ－１はマウス、アフリカングリーンモンキーおよびヒトにおいても見出されている（Ｆｅｉｇｅｌｓｔｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　７２（８）：６６２１－８（１９９８））。アフリカングリーンモンキーの相同分子種はもっとも密接にヒトＴＩＭ－１に関わっていて、並置した３５８のアミノ酸にわたる７７．６％のアミノ酸同一性を示す。ラットおよびマウスの相同分子種はそれぞれ５０％（１５５／３１０）および４５．６％（１２６／２７６）のアミノ酸同一性を示すが、並置した配列部分はアフリカングリーンモンキーについてのものより短い。ＴＩＭ－１のＩｇ様ドメインに対するモノクローナル抗体は、インビトロでＡ型肝炎ウイルスの感染に対して保護的であるということが示されている（Ｓｉｌｂｅｒｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　７５（２）：７１７－２５（２００１））。加えて、Ｋｉｍ－１は正常な腎臓では低いレベルで発現することが示されたが、この発現は虚血後の腎臓において急激に増大する（Ｉｃｈｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７３（７）：４１３５－４２（１９９８））。ＨＡＶＣＲ－１もまた、明細胞癌およびそれに由来する癌細胞株において高レベルで発現する。
【０００８】
ＴＩＭ－１はＰ型「シロツメクサ」ドメインに相同性を示し、このことは他のＰ型シロツメクサファミリーメンバーと同様の生物学的活性を有してもよいということを意味する。いくつかのタンパク質を含むシロツメクサドメインは、腎臓、直腸および乳房腫瘍の細胞株を治療するために用いられる場合に、細胞拡散および侵入を誘発するということが示された（Ｐｒｅｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＡＳＥＢ　Ｊ　１６（６）：５９２－４（２００２））。加えて、いくつかのシロツメクサ含有タンパク質は、アノイキス、上皮中の足場－関連アポトーシス現象へ耐性を与える（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ　２７４（３）：５７６－８２（２０００））。
【０００９】
ＴＩＭ－１は、喘息に関連するマウスのシテニック（ｓｙｔｅｎｉｃ）領域中のＴａｐｒとして知られているヒト染色体５領域に位置する。主要なＴ細胞制御遺伝子座であるＴａｐｒは、気道過敏症の発症を制御する（Ｗｉｌｌｓ－Ｋａｉｐ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２：１０９５－１０９６（２００１）；ＭｃＩｎｔｉｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２：１１０９－１１１６（２００１））。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】ＷＯ９７／４４４６０
【特許文献２】ＷＯ９８／５３０７１
【特許文献３】米国特許第６，６６４，３８５号明細書
【特許文献４】ＷＯ０２／０９８９２０
【非特許文献】

【００１１】
【非特許文献１】Ｋｕｃｈｒｏｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３：４５４－４６２（２００３）
【非特許文献２】ＭｃＩｎｔｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：１１０９－１１１６（２００１）
【非特許文献３】Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：３８９－４００（２００２）
【非特許文献４】Ｗｉｌｌｓ－Ｋａｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ４：１０５０－１０５２（２００３）
【非特許文献５】Ｋａｐｌａｎ ｅｔ ａｌ，ＥＭＢＯ Ｊ １５（１６）：４２８２－９６（１９９６）
【非特許文献６】Ｉｃｈｉｍｕｒａ ｅｔ－ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７３：４１３５－４１４２（１９９８）
【非特許文献７】Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔ ６２：２３７－２４４（２００２）
【非特許文献８】Ｊ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７２（８）：６６２１－６６２８（１９９８）
【非特許文献９】Ｆｅｉｇｅｌｓｔｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７２（８）：６６２１－８（１９９８）
【非特許文献１０】Ｓｉｌｂｅｒｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７５（２）：７１７－２５（２００１）
【非特許文献１１】Ｉｃｈｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７３（７）：４１３５－４２（１９９８）
【非特許文献１２】Ｐｒｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，ＦＡＳＥＢ Ｊ １６（６）：５９２－４（２００２）
【非特許文献１３】Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２７４（３）：５７６－８２（２０００）
【非特許文献１４】Ｗｉｌｌｓ－Ｋａｉｐ，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：１０９５－１０９６（２００１）
【非特許文献１５】ＭｃＩｎｔｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：１１０９－１１１６（２００１）
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１２】
発明の概要
本明細書記載の発明の具体例は、ＴＩＭ－１に結合し、ＴＩＭ－１機能に影響するヒトモノクローナル抗体またはその結合フラグメントの発展に基づいている。ＴＩＭ－１は腫瘍および炎症性疾患のごとき病状において高レベルで発現する。よって、ＴＩＭ－１の生物学的活性を阻害することで、炎症およびＴＩＭ－１誘発細胞増殖を含む他の起こりうる影響を防ぐことが可能である。発明の具体例は、ＴＩＭ－１に特異的に結合する単離された抗体またはその結合フラグメントの産生および同定に基づいている。
【００１３】
したがって、本発明の１つの具体例は、ＴＩＭ－１に特異的に結合する単離された抗体またはその抗体のフラグメントを含む。この分野で知られているように、該抗体は例えば、モノクローナル、キメラおよび／または完全ヒト抗体に有利でありうる。明細書に記載する本発明の具体例は、これらの抗体を産生する細胞も提供する。
【００１４】
明細書に記載する本発明の具体例のいくつかは、ＴＩＭ－１に結合し、ＴＩＭ－１機能に影響するモノクローナル抗体に関連している。他の具体例は、治療的観点から望ましい性質を有する完全ヒト抗－ＴＩＭ－１抗体および抗－ＴＩＭ－１抗体製剤に関連しており、該性質はＴＩＭ－１に対する強い結合アフィニティー、インビトロおよびインビボにお

けるＴＩＭ－１の中和力、およびＴＩＭ－１誘発細胞増殖の阻害力を含む。

【００１５】

好ましい具体例において、本明細書記載の抗体は、非常に高いアフィニティー（Ｋｄ）でＴＩＭ－１に結合する。例えば、ヒト、ウサギ、マウス、キメラまたはヒト化抗体は、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}または10^{-14}Ｍ、もしくは本明細書中のいずれの範囲または値より低いがこれらに限定されないＫｄでＴＩＭ－１に結合することができる。アフィニティーおよび／または結合力は、本明細書で述べるように、ＫｉｎＥｘＡ（登録商標）および／またはＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）により測定することが可能である。

【００１６】

ある具体例において、本発明は、Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する単離された抗体を提供する。いくつかの具体例において、単離された抗体は、配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチドを有する。

【００１７】

別の具体例において、本発明は、Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する単離された抗体を提供し、これらは配列番号：４、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４０、４４、４８および５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチドを有する。

【００１８】

しかしながら、別の具体例において本発明は、ＴＩＭ－１に特異的に結合する単離された抗体を提供し、これらは配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチドを有し、さらに配列番号：４、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４０、４４、４８および５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチドを有する。

【００１９】

本発明の別の具体例は完全ヒト抗体であって、この抗体はＴＩＭ－１に特異的に結合し、表４に示す配列の１つを伴う相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を包含する重鎖ポリペプチドを有する。ＣＤＲの決定は当業者によって容易に達成することができるということが注目される。例えば、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ［１９９１］，ｖｏｌｓ．１－３を参照せよ。

【００２０】

しかしながら別の具体例は、ＴＩＭ－１に特異的に結合し、表５に示す配列の１つを含むＣＤＲを含むアミノ酸配列を包含する軽鎖ポリペプチドを有する。ある具体例において抗体は完全ヒトモノクローナル抗体である。

【００２１】

さらなる具体例は、ＴＩＭ－１に結合し、表４に示すＣＤＲ配列の１つを含むアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチドを包含し、さらに表５に示すＣＤＲ配列の１つを含むアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチドを包含する抗体である。ある具体例において抗体は完全ヒトモノクローナル抗体である。

【００２２】

別の本発明の具体例は、ＴＩＭ－１の相同分子種に結合する完全ヒト抗体である。本明細書中のさらなる具体例は、本明細書記載の完全ヒト抗体とともに、ＴＩＭ－１への結合に関してクロス競合する抗体である。

【００２３】

他の具体例は、ＴＩＭ－１に高いアフィニティーをもつ抗体の産生方法であって、ヒト

ＴＩＭ－１またはそのフラグメント、および１つまたはそれ以上の相同分子種の配列またはそれらのフラグメントで哺乳類を免疫する方法を含む。

【００２４】

発明の具体例が抗体の特定の型に限定されないということは理解されよう。例えば、抗－ＴＩＭ－１抗体はフルレングスの抗体（例えばインタクトなヒトＦｃ領域を有する）または抗体フラグメント（例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖまたは単鎖抗体）であってよい。加えて、抗体は、抗体を分泌するハイブリドーマ、または抗体をコードする１つまたは複数の遺伝子で形質転換または形質移入された組み換え細胞から製造可能である。

【００２５】

本発明の具体例のいくつかは、本明細書記載のいずれの抗－ＴＩＭ－１抗体をコードする単離された核酸分子、抗－ＴＩＭ－１抗体をコードする単離された核酸分子を有するベクター、およびかかる核酸分子で形質転換されたホスト細胞を含む。加えて、本発明の１つの具体例は、抗－ＴＩＭ－１抗体を産生する方法であって、核酸分子が発現される条件下でホスト細胞を培養して抗体を得て、その後ホスト細胞から抗体を回収する条件下でホスト細胞を培養することによる方法である。

【００２６】

他の具体例において、本発明は抗体またはその機能性フラグメント、および医薬上許容される担体を含む組成物を提供する。

【００２７】

いくつかの具体例において、本発明は医薬上許容される担体または希釈剤に混合した有効量の抗－ＴＩＭ－１抗体を有する医薬組成物を含む。しかしながら他の具体例において、抗－ＴＩＭ－１抗体またはそのフラグメントが治療剤にコンジュゲートする。治療剤は例えば毒素、放射性同位元素または化学療法剤である。好ましくは、かかる抗体は例えば腫瘍および癌を含む病状の治療のために用いられることが可能であり、該腫瘍および癌は、例えば卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、直腸、結腸直腸、甲状腺、膵臓、前立腺および膀胱癌、ならびに他の炎症状態を含む。より好ましくは、抗体は腎臓および卵巣癌の治療に用いられることが可能である。

【００２８】

さらなる具体例において、本明細書記載の抗体は、動物においてＴＩＭ－１誘発細胞増殖を効果的に治療するための薬剤調製のためにも用いられることが可能であり、該モノクローナル抗体は特異的にＴＩＭ－１に結合する。

【００２９】

しかしながら別の具体例は、腫瘍および炎症状態のごとき疾患の治療のための薬剤調製における抗－ＴＩＭ－１抗体の使用である。ある具体例において腫瘍は、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、直腸、結腸直腸、甲状腺、膵臓、前立腺および膀胱癌のごとき腫瘍および癌を含むが、これらに限らない。

【００３０】

しかしながら別の態様において、本発明はＴＩＭ－１の発現に関連する病状の有効な治療法を含む。これらの方法は、ＴＩＭ－１の発現に関連する状態について治療の必要のある動物を選択し、該動物へ治療上有効量の、ＴＩＭ－１に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体を投与することを含む。

【００３１】

好ましくは哺乳類、またより好ましくはヒトが抗－ＴＩＭ－１抗体を受け取る。好ましい具体例において、腎臓および膵臓の腫瘍、頭部および頚部癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、肝臓癌、肺癌、腎臓癌、膀胱癌、直腸癌、食道癌および脳腫瘍を含むがこれらに限らない腫瘍が治療される。

【００３２】

さらなる発明の具体例は、動物の腫瘍疾患の有効な治療のための薬剤調製における抗体の使用を含み、ここでモノクローナル抗体は特異的にＴＩＭ－１に結合する。治療可能な

腫瘍疾患は、例えば、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、グリア芽細胞腫、胃癌、子宮内膜癌、腎臓癌、直腸癌、膵臓癌および前立腺癌を含む。

【００３３】

いくつかの具体例において、本発明は、ＴＩＭ－１の発現に関連する細胞増殖を阻害する方法を含む。これらの方法は、ＴＩＭ－１誘発細胞増殖について治療の必要のある動物を選択し、該動物へ治療上有効量の、ＴＩＭ－１に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体を投与することを含む。他の具体例において、ＴＩＭ－１を発現する細胞は、有効量の抗－ＴＩＭ－１抗体またはそのフラグメントで治療される。該方法はインビボで行うことも可能である。

【００３４】

該方法はインビボで行うことが可能であり、好ましくは、患者はヒトである。好ましい具体例において、該方法は腫瘍疾患の治療に関連していて、該疾患は、例えば腎臓癌、膵臓癌、頭部および頚部癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、直腸癌、食道癌および脳腫瘍のごとき腫瘍および癌である。

【００３５】

いくつかの具体例において、抗－ＴＩＭ－１抗体は患者に投与され、その後血液に循環している過剰な抗体を除くために洗浄剤を投与する。

【００３６】

いくつかの具体例において、抗－ＴＩＭ－１抗体は、補体を修復し、補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）に関与する力を高めるために修飾されることができる。ある具体例において、抗－ＴＩＭ－１抗体は、例えばアミノ酸置換により修飾され、体のクリアランスを変化させることができる。あるいは、他のアミノ酸置換のいくつかは、体からの抗体のクリアランスを遅くすることができる。

【００３７】

別の具体例において、本発明は容器を含む製品を提供する。容器は、抗－ＴＩＭ－１抗体を含む組成物、またＴＩＭ－１の過剰発現に特徴づけられる腫瘍または炎症性疾患を治療するために組成物が用いられることができるということを示す添付文書またはラベルを含む。

【００３８】

しかし別の具体例は、患者サンプル中のＴＩＭ－１のレベルを分析し、患者の生物学的サンプルに抗－ＴＩＭ－１抗体を接触させることを含み、サンプル中の抗体およびＴＩＭ－１間の結合レベルを検出するための方法を提供する。より具体的な例において、生物サンプルは血液である。

【００３９】

ある具体例において、本発明は、腫瘍疾患または炎症状態をスクリーニングするために、哺乳類の組織または細胞中のＴＩＭ－１およびＴＩＭ－１相同分子種を検出するためのアッセイキットを含む。該キットは、ＴＩＭ－１に結合する抗体、またＴＩＭ－１が存在する場合にＴＩＭ－１と抗体の反応を示すための方法を含む。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。ある具体例において、ＴＩＭ－１に結合する抗体は標識されている。別の具体例において、抗体は非標識一次抗体であり、キットはさらに一次抗体を検出するための方法を含む。ある具体例において、該方法は、抗免疫グロブリンである標識二次抗体を含む。好ましくは、抗体は蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透過性物質からなる群から選択されるマーカーで標識されている。

【００４０】

本発明の別の具体例は、本明細書記載のように調製された抗体を、患者サンプル中のＴＩＭ－１レベルを検出するために利用する、疾患または状態の診断方法を含む。ある具体例において、患者サンプルは血液または血液血清である。さらなる具体例において、危険因子の同定、疾患の診断および疾患の分類のための方法が提供され、該方法は、抗－ＴＩＭ－１抗体を用いてＴＩＭ－１の過剰発現を同定することを含む。

【００４１】

本明細書記載の発明の具体例は、ＴＩＭ－１アゴニスト（擬態物）またはＴＩＭ－１アンタゴニストとして機能するＴＩＭ－１タンパク質の変異体にも関連している。

【００４２】

本発明の別の具体例は、ＴＩＭ－１抗原に結合するモノクローナル抗体の使用であり、該抗体は、細胞障害の化学療法剤または抗腫瘍治療剤のごとき放射線療法剤とカップリングされる。

【００４３】

ある具体例は、同時にＴＩＭ－１抗原へ結合することを遮断する単離された抗体を提供し、これは配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５４からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖配列を有する抗体による。別の具体例は、ＴＩＭ－１抗原に結合し、配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を有する抗体と交差反応する単離された抗体を提供する。

【００４４】

本発明の別の具体例は、配列番号：５０のＴＩＭ－１抗原上で配列番号：８７のエピトープと結合し、配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を有する抗体と交差反応する単離された抗体を提供する。さらに別の具体例において、本発明は、配列番号：５０のＴＩＭ－１抗原上で配列番号：８７のエピトープと結合する抗体を提供し、該抗体は配列番号：２、６、１０、１４、１８、２２、２６、３０、３４、３８、４２、４６および５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を有する抗体による、ＴＩＭ－１抗原に対する同時結合を遮断する。

【図面の簡単な説明】

【００４５】

【図１】図１はＴＩＭ－１抗原に対する、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体１．２９、２．５６．２、２．５９．２、および２．４５のＥＬＩＳＡアッセイの結果の棒グラフである。

【図２】図２は無関係なタンパク質に対する、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体１．２９、２．５６．２、２．５９．２、および２．４５．１ののＥＬＩＳＡアッセイの結果の棒グラフである。

【図３Ａ】図３Ａは、抗－ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．５９．２での腎臓細胞癌（３Ａ）の染色を示す。

【図３Ｂ】図３Ｂは、抗－ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．５９．２での膵臓癌（３Ｂ）の染色を示す。

【図４】図４は、ＡＣＨＮ腎臓癌細胞系における抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体仲介の毒素殺傷のクローン形成アッセイの結果の棒グラフである。

【図５】図５は、ＢＴ５４９乳癌細胞系における抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体仲介の毒素殺傷のクローン形成アッセイの結果の棒グラフである。

【図６】図６は、アウリスタチン（Ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）Ｅ（ＡＥ）結合抗体で治療したＣＡＫＩ－１細胞のクローン形成アッセイの結果の棒グラフである。

【図７】図７は、アウリスタチン　Ｅ（ＡＥ）結合抗体で治療したＢＴ５４９細胞のクローン形成アッセイの結果の棒グラフである。

【図８】図８は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２、２．５６．２および２．４５．１が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈｌ細胞からのＩＬ－４放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。

【図９】図９は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２および２．４５．１が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈ２細胞からのＩＬ－４放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。

【図１０】図１０は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈｌ細胞からのＩＬ－５放出を有意に阻害することを示す棒グラフ

である。
【図１１】図１１は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２および１．２９対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈ２細胞からのＩＬ－５放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。
【図１２】図１２は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２、１．２９および２．５６．２が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈｌ細胞からのＩＬ－１０放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。
【図１３】図１３は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２、１．２９および２．４５．１が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈ２細胞からのＩＬ－１０放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。
【図１４】図１４は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２、１．２９および２．５６．２が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈｌ細胞からのＩＬ－１３放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。
【図１５】図１５は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２および１．２９が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈ２細胞からのＩＬ－１３放出を有意に阻害することを示す棒グラフである。
【図１６】図１６は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体が対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈｌ細胞からのｉＩＦＮγ放出を阻害しないことを示す棒グラフである。
【図１７】図１７は、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体２．５９．２および２．４５．１が、対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと比べてＴｈ２細胞からのｉＩＦＮγ放出を阻害したことを示す棒グラフである。
【図１８Ａ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｂ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｃ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｄ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｅ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｆ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｇ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｈ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｉ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｊ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｋ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｌ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｍ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｎ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｏ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の

中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｐ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｑ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｒ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｓ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１８Ｔ】図１８Ａないし１８Ｔは、様々なヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和を評価した実験の、ＢｒｄＵ取り込みアッセイ結果を示す棒グラフである。
【図１９Ａ】図１９Ａないし１９Ｄは、ＴＩＭ－１特異的抗体または無関係な抗体にコンジュゲートする植物毒素サポリンを用いて行った抗体コンジュゲート研究の結果を示す折れ線グラフである（図１９Ａないし１９Ｃ）。加えて負の対照として毒素のない無関係の抗体を単独で含めた（図１９Ｄ）。
【図１９Ｂ】図１９Ａないし１９Ｄは、ＴＩＭ－１特異的抗体または無関係な抗体にコンジュゲートする植物毒素サポリンを用いて行った抗体コンジュゲート研究の結果を示す折れ線グラフである（図１９Ａないし１９Ｃ）。加えて負の対照として毒素のない無関係の抗体を単独で含めた（図１９Ｄ）。
【図１９Ｃ】図１９Ａないし１９Ｄは、ＴＩＭ－１特異的抗体または無関係な抗体にコンジュゲートする植物毒素サポリンを用いて行った抗体コンジュゲート研究の結果を示す折れ線グラフである（図１９Ａないし１９Ｃ）。加えて負の対照として毒素のない無関係の抗体を単独で含めた（図１９Ｄ）。
【図１９Ｄ】図１９Ａないし１９Ｄは、ＴＩＭ－１特異的抗体または無関係な抗体にコンジュゲートする植物毒素サポリンを用いて行った抗体コンジュゲート研究の結果を示す折れ線グラフである（図１９Ａないし１９Ｃ）。加えて負の対照として毒素のない無関係の抗体を単独で含めた（図１９Ｄ）。
【発明を実施するための形態】
【００４６】
好ましい具体例の詳細な説明
本明細書記載の発明の具体例は、Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する単離された抗体の産生および同定に基づいている。下記するように、ＴＩＭ－１は明細胞癌およびそれに由来する癌細胞株中、高レベルで発現する。したがって、ＴＩＭ－１に結合する抗体は癌の治療および阻害に有用である。加えて、ＴＩＭ－１に結合する抗体は、細胞遊走を減少し、また腎臓癌細胞のアポトーシスを高めるために有用でもある。
【００４７】
したがって、本明細書記載の発明の具体例は、ＴＩＭ－１に結合する単離された抗体またはそれらの抗体のフラグメントを提供する。この分野で知られているように、該抗体は有利には、例えばモノクローナル、キメラおよび／またはヒト抗体でありうる。本明細書記載の発明の具体例は、これらの抗体を産生する細胞も提供する。
【００４８】
本発明の別の具体例は、診断または治療目的のためのこれらの抗体を提供する。例えば、発明の具体例は、細胞増殖に関連するＴＩＭ－１の発現を阻害するための方法および抗体を提供する。好ましくは、抗体は、腎臓および膵臓腫瘍、頭部および頚部癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膀胱癌、直腸癌、食道癌および脳腫瘍のごとき腫瘍を治療するために用いられる。かかる治療に関連して、これらの抗体を含む製品が提供される。加えて、これらの抗体を含むアッセイキットが、癌または腫瘍をスクリーニングするために提供される。
【００４９】

加えて、本明細書記載の核酸、ならびにそのフラグメントおよび変異体が用いられてもよく、例えば（ａ）組み換えまたは異種遺伝子産物として、対応するコードされたタンパク質、ポリペプチド、フラグメントおよび変異体の生合成の指示（ｂ）本明細書記載の核酸の検出および定量化のためのプローブとして（ｃ）アンチセンス分子を調製するための配列テンプレートとして、などであるがこれらに限定されない。かかる使用は下記の開示においてより十分に説明されている。

【００５０】

さらに、本明細書記載のＴＩＭ－１タンパク質およびポリペプチド、ならびにそのフラグメントおよび変異体が用いられてよく、その様式は（ａ）抗－ＴＩＭ－１抗体の産生を刺激するために免疫原として役立つ（ｂ）かかる抗体のための免疫原アッセイにおいて抗原を捕獲する（ｃ）本明細書記載のＴＩＭ－１ポリペプチドに結合する物質のスクリーニングのための標的として、および（ｄ）ＴＩＭ－１特異的抗体のための標的であって、かかる抗体での治療が標的によって仲介される分子および／または細胞機能に影響することを含むものである。ＴＩＭ－１ポリペプチド発現または活性は、細胞生存および／または転移能を促進することができる。逆に、ＴＩＭ－１ポリペプチド発現における減少またはその機能の阻害は、腫瘍細胞の生存および侵襲性を、治療上有利な様式で減少する。

【００５１】

ＴＩＭ－１に特異的である単鎖抗体（ｓｃＦｖ’ｓ）および二重特異性抗体が特に有用であり、というのも、全ＩｇＧ分子に比べてより小さいサイズのために、腫瘤により容易に貫通してもよいからである。全ＩｇＧ分子およびｓｃＦｖ’ｓ間の腫瘍貫通の比較研究が明細書中に説明されている。ｓｃＦｖは、ＴＩＭ－１抗原を発現する腫瘍細胞を破壊するために、毒素または放射性核種で誘導体化することができ、その様式は、抗－ＴＩＭ－１毒素標識したＩｇＧ２またはＩｇＧ４、またはすでに述べた放射性核種で誘導体化された全抗体と同様のものであるが、より十分に腫瘍に貫通することができるという利点を有し、翻訳されて、腫瘍を根絶する効力を増大してもよい。生物学的活性のある抗－ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖの具体例が本明細書で提供される。

【００５２】

配列表

典型的なヒト抗－ＴＩＭ－１抗体の重鎖および軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列が配列表で提供され、その内容は下記の表１にまとめられる。

【００５３】

表１

【表１－１】

mAb ID No.:	配列	配列番号
1.29	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	1
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	4
1.37	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	5
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	6
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	7
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	8
2.16	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	9
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	12

【表１－２】

2.17	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	13
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	14
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	15
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	16
2. 24	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	17
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	20
2.45	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	21
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	24
2.54	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	25
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	28
2.56	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	29
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	30
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	31
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	32

【表１－３】

2.59	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	33
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	34
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	35
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	36
2.61	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	37
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	38
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	39
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	40
2.70	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	41
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	42
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	43
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	44
2.76	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	45
	重鎖の可変領域のアミノ酸配列	46
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	47
	軽鎖の可変領域のアミノ酸配列	48
2.70.2	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	49
	重鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	50
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	51
	軽鎖の可変領域および定常領域部分をコードするヌクレオチド配列	52

【００５４】

定義

特記しない限り、本明細書記載の発明に関連して用いる科学的および技術的用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するだろう。さらに、文脈上必要とされない限り、単数形は複数形を含み、複数形は単数形を含むだろう。通常は、本明細書記載の細胞および組織培養、分子生物学、タンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学、およびハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法およびそれらの技法は、この分野でよく知られており、一般的に用いられているものである。標準的な技法が、組み換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、さらに組織培養および形質転換（例えば電気穿孔法およびリポフェクション）のために用いられる。酵素反応および精製技法が、製造者の説明に従って、この分野で一般的に達成されているように、あるいは本明細書中の説明のように行われる。通常は、前記の技法および製法は、この分野でよく知られている慣用法、および本明細書に引用し述べている様々な一般的およびより具体的な参考文献で説明されている方法で行われる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋらの（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎ

ｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））を参照とし、この参照により本明細書中に組み込まれる。本明細書で説明する分析化学、有機合成化学、医化学および薬化学に関連して利用する命名法、およびそれらの実験室製法および技法は、この分野でよく知られており、一般的に用いられているものである。標準的な技法が化学合成、化学分析、薬剤調製、処方、デリバリー、および患者の治療のために用いられる。

【００５５】

本開示に従って利用されるように、下記の語は特記しない限り、下記の意味を有すると理解されよう。

【００５６】

「ＴＩＭ－１」なる語は、Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１を言う。ある具体例において、ＴＩＭ－１は配列番号：５０のアミノ酸配列を含むポリペプチドを言う。

【００５７】

「ポリペプチド」なる語は本明細書では属名として用いられ、未変性タンパク質、フラグメントまたはポリペプチド配列の類似体を言う。よって、未変性タンパク質、フラグメントおよび類似体はポリペプチド属の種である。好ましいポリペプチドは、本発明にしたがって、ヒト重鎖免疫グロブリン分子およびヒトカッパ軽鎖免疫グロブリン分子、さらに例えばカッパ軽鎖免疫グロブリン分子のごとき軽鎖免疫グロブリン分子とともに重鎖免疫グロブリン分子を含む組み合わせにより形成される抗体分子、およびその逆、またはそのフラグメントおよび類似体を含む。

【００５８】

本明細書中で用いる「ポリヌクレオチド」なる語は、少なくとも長さ１０塩基の重合型ヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチド、あるいは修飾されたいずれかの型のヌクレオチドを意味する。この語は、単鎖および二重鎖ＤＮＡ型を含む。

【００５９】

本明細書中で用いる「単離されたポリヌクレオチド」なる語は、ゲノム、ｃＤＮＡまたは合成由来、もしくはそのいくつかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味し、これらは、その由来によって、単離されたポリヌクレオチドは（１）単離されたポリヌクレオチドが自然界で見出されたポリヌクレオチドのすべてまたは一部分と関連していない（２）自然界で連結していないポリヌクレオチドと操作可能なものとして連結している（３）より大きな配列の部分として自然界に存在しない。

【００６０】

本明細書中で用いる「単離されたタンパク質」なる語は、ｃＤＮＡ、組み換えＲＮＡ、または合成由来、もしくはそのいくつかの組み合わせのタンパク質を意味し、これらは、その由来または派生源によって、「単離されたタンパク質」は（１）自然界で見出されたタンパク質と関連していない（２）同じ起源からの他のタンパク質がない、例えばマウスタンパク質がない（３）異なる種由来の細胞によって発現する、または（４）自然界に存在しない。

【００６１】

本明細書中で用いる「オリゴヌクレオチド」なる語は、天然に存在するオリゴヌクレオチド、および天然に存在するオリゴヌクレオチド結合および天然に存在しないオリゴヌクレオチド結合により結合された修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、通常は長さが２００塩基またはそれより少ない塩基から成るポリヌクレオチドサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは長さが１０ないし６０塩基、およびもっとも好ましくは、長さが１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０ないし４０塩基である。オリゴヌクレオチドは例えばプローブのためにはたいてい単鎖であり；しかしながらオリゴヌクレオチドは例えば遺伝子変異体の構築に用いるためには二重鎖である。本明細書に記載するオリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチ

ドでありうる。

【００６２】

同様に、特記しない限り、単鎖ポリヌクレオチド配列の左末端は５’末端であり；二重鎖ポリヌクレオチド配列の左方向は５’方向を言う。新生ＲＮＡ転写の５’ないし３’の付加方向は転写方向を言い；ＲＮＡと同配列を有し、ＲＮＡ転写の５’ないし５’末端である、ＤＮＡ鎖上の配列領域は、上流配列を言い；ＲＮＡと同配列を有し、ＲＮＡ転写の３’ないし３’末端である、ＤＮＡ鎖上の配列領域は、下流配列を言う

【００６３】

対象に適用されるように、本明細書中で用いる「天然に存在する」なる語は、その対象が自然界で見出すことが可能であるという事実を言う。例えば、生物中に存在する（ウイルスを含む）か、自然界起源のものから単離可能か、また実験室またはその他で人間によって意図的に修飾されないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然に存在する。

【００６４】

本明細書中で用いる「天然に存在するヌクレオチド」なる語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。本明細書中で用いる「修飾ヌクレオチド」なる語は、修飾または置換された糖基などをもつヌクレオチドを含む。本明細書中で用いる「オリゴヌクレオチド結合」なる語は、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート，ホスホロアニラダート、ホスホロアミダートなどのオリゴヌクレオチド結合を含む。例えば、ＬａＰｌａｎｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：９０８１（１９８６）；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０６：６０７７（１９８４）；Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：３２０９（１９８８）；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ６：５３９（１９９１）；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｐｐ．８７－１０８（Ｆ．Ｅｃｋｓｔｅｉｎ，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｅｎｇｌａｎｄ（１９９１））；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．，米国特許番号第５，１５１，５１０号；Ｕｈｌｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｅｙｍａｎ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ９０：５４３（１９９０）であり、この参照により本明細書中に組み込まれる。オリゴヌクレオチドは所望により検出のための標識を含む。

【００６５】

本明細書中で用いる「操作可能的に結合した」なる語は、記載されているように、意図した様式でそれらに機能を与えることのできる関係にある構成成分の位置を言う。コード配列に操作可能的に結合した対照配列は、対照配列と両立できる条件下でコード配列の発現を達成できるような様式で結合される。

【００６６】

本明細書中で用いる「対照配列」なる語は、結合しているコード配列の発現およびプロセシングをもたらすために必要であるポリヌクレオチド配列を言う。かかる対照配列の性質はホスト生物によって異なり；原核生物中、通常はかかる対照配列は、プロモーター、リボソーム結合部位および転写終止配列を含み；真核生物中、通常はかかる対照配列は、プロモーターおよび転写終止配列を含む。対照配列なる語は、発現およびプロセシングにその存在が必須であるすべての構成成分を最小限で含むことを意図され、またその存在が有利であるさらなる構成成分も含み、例えばリーダー配列および融合パートナーの配列である。

【００６７】

本明細書中で用いる「選択的ハイブリダイズ」なる語は、検出可能および特異的結合を意味する。本明細書に記載のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそのフラグメントを、大量の検出可能な非特異的核酸への結合を最小化するハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、核酸鎖に選択的ハイブリダイズさせる。この分野で知られていて、また本明細書に記載するように、高ストリンジェンシーの条件が選択的ハイブリダイゼーシ

ョン条件を達成するために用いられることが可能である。通常は、本明細書で説明するポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびフラグメントと目的とする核酸配列間の核酸配列相同性は、少なくとも８０％、より典型的には、少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％および１００％の好ましくも増大した相同性を有する。

【００６８】

配列間に部分的または完全な同一性があるならば、２つのアミノ酸配列は相同である。例えば８５％相同性は、２つの配列が最大のマッチングで並置されている場合に、８５％のアミノ酸が同一であるということを意味する。（マッチした２つの配列のどちらかにおける）ギャップは、最大のマッチングであってよく；長さ５またはそれ未満のギャップが好ましく、２またはそれ未満のものはより好ましい。あるいは、また好ましくは、もしＡＬＩＧＮプログラムを、変異データマトリックスおよび６またはそれ以上のギャップペナルティーとともに用いて、５（標準偏差単位）以上のアライメントスコアを有するならば、２つのタンパク質配列（または少なくとも長さが３０アミノ酸のもの由来のポリペプチド配列）は相同であり、この語は本明細書で用いるとおりである。Ｄａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．，ｉｎ Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，ｐｐ．１０１－１１０（Ｖｏｌｕｍｅ５，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ（１９７２））ａｎｄ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ ２ ｔｏ ｔｈｉｓ ｖｏｌｕｍｅ，ｐｐ．１－１０を参照せよ。より好ましくは、ＡＬＩＧＮプログラムを用いて最適に並置している場合に、アミノ酸の同一性が５０％以上かまたは同等であるならば、２つの配列またはその一部分は相同である。

【００６９】

本明細書中で用いる「対応する」なる語は、ポリヌクレオチド配列が参照のポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同である（すなわち厳密に進化的に関連はしていないが同一である）か、またはポリペプチド配列が参照のポリペプチド配列と同一であるということを意味する。

【００７０】

対照的に、本明細書中で用いる「相補的である」なる語は、相補的配列が参照のポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同であるということを意味する。例としては、ヌクレオチド配列「ＴＡＴＡＣ」は参照の配列「ＴＡＴＡＣ」に対応し、また参照の配列「ＧＴＡＴＡ」と相補的である。

【００７１】

下記の語は、２またはそれ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の配列関係を説明するために用いられる：「参照の配列」「比較ウィンドウ」「配列同一性」「配列同一性の割合」および「実質上同一」。「参照の配列」は配列比較のための基礎として用いられる確定した配列であり；参照の配列は、例えば配列表中の完全長ｃＤＮＡまたは遺伝子配列のセグメントのごとき、より大きな配列のサブセットであってよく、または完全長ｃＤＮＡまたは遺伝子配列を含んでもよい。通常は参照の配列は長さが少なくとも１８ヌクレオチドまたは６アミノ酸であり、高い頻度で長さは少なくとも２４ヌクレオチドまたは８アミノ酸であり、また多くの場合長さは少なくとも４８ヌクレオチドまたは１６アミノ酸である。２つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列はそれぞれ（１）２分子間で同様である配列（すなわち、完全長ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一部）を含み、また（２）さらに２つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間で異なる配列を含んでもよいので、典型的に、２つ（またはそれ以上）の分子間の配列比較は、比較ウィンドウ上の２分子の配列を比較することにより行い、部分領域の配列の類似性を同定しまた比較する。

【００７２】

本明細書中で用いる「比較ウィンドウ」は、少なくとも１８の連続したヌクレオチドの位置または６アミノ酸の概念的なセグメントを言い、ここでポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は少なくとも１８の連続したヌクレオチドまたは６アミノ酸配列の参照の配列と比較されてよく、また比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列部分は２つの配列の

最適なアライメントに関して、参照の配列（付加または欠失を含まない）と比較して、２０パーセントまたはそれ未満の付加、欠失、置換など（すなわちギャップ）を含んでよい。比較ウィンドウを並置するための最適なアライメントは、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎの部分的相同性アルゴリズム（Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．，２：４８２（１９８１））によってか、ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈの相同性アライメントアルゴリズム（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４３（１９７０））によってか、ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎの同様の方法に関する探求（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ），８５：２４４４（１９８８））によってか、これらのアルゴリズムのコンピューターソフト（ウィスコンシンジェネティクスソフトウェアパッケージリリース７（ジェネティクスコンピューターグループ、５７５　サイエンス　Ｄｒ．、マディソン、ウィスコンシン）、ジーンワークスまたはマックベクターソフトウェアパッケージ）中の、ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ）によってか、またはインスペクション法により行われてよく、さらに様々な方法によって生み出される最善のアライメント（すなわち、比較ウィンドウ上でもっとも高い割合の相同性を生じる）が選択される。

【００７３】

「配列同一性」なる語は、２つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が比較ウィンドウ上で同一である（すなわちヌクレオチドに対してヌクレオチド、または残基に対して残基に基づいて）ということを意味する。「配列同一性の割合」なる語は、２つの最適に並置した配列を比較ウィンドウ上で比較し、同一の核酸塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、ＵまたはＩ）または残基が両配列中に存在する位置数を決定して、マッチした位置数を得て、比較ウィンドウ中の全位置数（すなわちウィンドウサイズ）でマッチした位置数を割り、結果を１００倍して配列同一性の割合を出すことによって、算出される。

【００７４】

本明細書中で用いる「実質上同一」なる語は、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の特徴を意味し、ここでポリヌクレオチドまたはアミノ酸は、少なくとも１８ヌクレオチド（６アミノ酸）の位置の比較ウィンドウ上で、より頻繁には、少なくとも２４ないし４８ヌクレオチド（８ないし１６アミノ酸）の位置のウィンドウ上で比較して、少なくとも８５パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも９０ないし９５パーセントの配列同一性、より一般的には、少なくとも９９パーセントの配列同一性を有する配列を含み、ここで、配列同一性の割合は、参照の配列を、比較ウィンドウ上の参照の配列と比べて２０パーセントまたはそれ未満の欠失または付加を含んでよい配列と比較することによって算出される。参照の配列は、より大きい配列のサブセットであってよい。

【００７５】

本明細書で用いるように、２０の慣用的なアミノ酸およびそれらの省略形は慣用的な使用に従う。Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ　ａｎｄ　Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ，Ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．（１９９１））を参照とし、この参照によって本明細書に組み込まれる。２０の慣用的なアミノ酸、α－，α－二置換アミノ酸のごとき非天然アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸および他の慣用的でないアミノ酸の立体異性体（例えばＤ－アミノ酸）もまた本明細書で記載するポリペプチドのための適当な構成成分であってよい。慣用的でないアミノ酸の例は：４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、σ－Ｎ－メチルアルギニンおよび他の同様のアミノ酸およびイミノ酸（例えば４－ヒドロキシプロリン）である。本明細書で用いるポリペプチド記号において、標準的な使用および慣例に従って、左方向はアミノ末端方向であり、右方向はカルボキシ末端方向である。

【００７６】

ポリペプチドに適用するとして、「実質上同一」なる語は、例えばデフォルトギャップ

ウェイトを用いるプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴによってのように最適に並置した場合に、２つの配列が少なくとも８０パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも９０パーセントの配列同一性、より好ましくは、少なくとも９５パーセントの配列同一性、もっとも好ましくは、少なくとも９９パーセントの配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基位置は保存的アミノ酸置換によって異なる。保存的アミノ酸置換は、同様の側鎖を有する残基の互換性を言う。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり；側鎖に脂肪族ヒドロキシルを有するアミノ酸の群は、セリンおよびトレオニンであり；側鎖にアミドを含むアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニンおよびヒスチジンであり；また側鎖に硫黄を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換基は：バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸、およびアスパラギン酸－グルタミン酸である。

【００７７】

本明細書で説明するように、アミノ酸配列における変異が、本明細書に記載する抗体または免疫グロブリン分子に少なくとも７５％、より好ましくは、少なくとも８０％、９０％、９５％、またもっとも好ましくは９９％の配列同一性を維持するので、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列中の小さな変異は、本明細書に記載する発明によって包含されることが意図される。特に保存的アミノ酸置換が意図される。保存的置換は、側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内で起こるものである。

【００７８】

遺伝的にコードされたアミノ酸は、通常は、次のファミリーに分けられ、それは：（１）酸性＝アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩；（２）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；（３）非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；また（４）無電荷極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。より好ましいファミリーは：セリンおよびトレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり；アスパラギンおよびグルタミンはアミドを含むファミリーであり；アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり；またフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、アスパラギン酸塩をグルタミン酸塩で、トレオニンをセリンで単独で置換すること、またはアミノ酸を構造的に関連のあるアミノ酸で同様に置換することは、生じた分子の結合または性質に重要な影響は有さないだろうということを期待することは、特にもしその置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を含まないのならば、妥当である。アミノ酸変化が結果として機能性ペプチドを生じるかどうかは、ポリペプチド誘導体の特異的活性を分析することにより容易に決定することが可能である。分析は本明細書で詳細に述べる。抗体または免疫グロブリン分子のフラグメントまたは類似体は、当業者によって容易に調製することが可能である。フラグメントまたは類似体の好ましいアミノ－およびカルボキシ－末端は、機能ドメインの境界近くに存在する。構造および機能ドメインはヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列データを公または特許の配列データベースと比較することにより同定が可能である。好ましくは、既知の構造および／または機能をもつ他のタンパク質中に存在する配列モチーフまたは予想されるタンパク質コンフォメーションのドメインを同定するために、コンピューターによる比較方法が用いられる。既知の三次元構造へ折り重なっているタンパク質配列を同定する方法が知られている（Ｂｏｗｉｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１６４（１９９１））。よって、前記の例は、当業者が、本明細書に記載する構造および機能ドメインを定義するために用いられてよい配列モチーフおよび構造コンフォメーションを認識することができるということ実証する。

【００７９】

好ましいアミノ酸置換は：（１）タンパク質分解への感受性を減少する（２）酸化への感受性を減少する（３）タンパク質複合体を形成するための結合アフィニティーを変える（４）結合アフィニティーを変える、および（５）かかる類似体の他の物理化学的または機能的性質を与えるかまたは修飾する。類似体は天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々な突然変異タンパク質を含むことができる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換（好ましくは保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列中（好ましくは、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチド部分）でなされてよい。保存的アミノ酸置換は、実質的には、親配列の構造的特徴を変化すべきではない（例えば、アミノ酸置換はどちらかといえば親配列中に存在するらせんを壊すべきではないし、または親配列を特徴づける他の二次構造の型を破壊するべきでもない）。当該分野で認知されているポリペプチドの二次および３次構造の例は、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））；およびＴｈｏｎ－ｔｏｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５４：１０５（１９９１）であり、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【００８０】

本明細書で用いる「ポリペプチドフラグメント」なる語は、アミノ末端および／またはカルボキシ末端を欠失を有するポリペプチドを言うが、ここで残存するアミノ酸配列は、例えば全長ｃＤＮＡ配列に由来する天然に存在する配列中の対応する位置と同じである。典型的に、フラグメントの長さは、少なくとも５、６、８または１０アミノ酸、好ましくは、少なくとも１４アミノ酸、より好ましくは、少なくとも２０アミノ酸、通常は、少なくとも５０アミノ酸、またさらにより好ましくは、少なくとも７０アミノ酸である。

【００８１】

本明細書で用いる「類似体」なる語は、由来のアミノ酸配列部分と実質上同一である、少なくとも２５アミノ酸のセグメントからなり、また下記性質の少なくとも１つを有するポリペプチドを言う：（１）適当な結合条件のもとでのＴＩＭ－１への特異的結合（２）適当なＴＩＭ－１結合を遮断する能力、または（３）インビトロまたはインビボにおいてＴＩＭ－１発現細胞の成長および／または生存を阻害する能力。典型的に、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に関して、保存的アミノ酸置換（もしくは付加または欠失）を含む。典型的に、類似体の長さは、少なくとも２０アミノ酸、好ましくは、少なくとも５０アミノ酸またはそれ以上であり、またしばしば全長の天然に存在するポリペプチドと同じ長さであることができる。

【００８２】

一般的にペプチド類似体は、鋳型ペプチドの性質に類似の性質を有する非ペプチド薬として医薬産業で用いられる。これらの型の非ペプチド化合物は、ペプチド擬態物または擬態ペプチドと言われる。Ｆａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．，１５：２９（１９８６）；Ｖｅｂｅｒ ａｎｄ Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ，ＴＩＮＳ，ｐ．３９２（１９８５）；およびＥｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，３０：１２２９（１９８７）は、参照により本明細書に組み込まれる。かかる化合物はコンピューター分子モデルのおかげにより、たびたび発展をとげている。治療上有用であるペプチドに構造的に同様である擬態ペプチドは、同等の治療または予防効果を生み出すために用いられてよい。通常は、擬態ペプチドは、ヒト抗体のごとき模範的なポリペプチド（すなわち生化学的性質または薬理活性を有するポリペプチド）と構造的に同様であるが、－－CH_2ＮＨ－－、－－CH_2Ｓ－－、－－CH_2－CH_2－－、－－ＣＨ＝ＣＨ－－（シスおよびトランス）、－－$COCH_2$－－、－－ＣＨ（ＯＨ）CH_2－－および－CH_2ＳＯ－－：からなる群から選択される結合で、またこの分野でよく知られている方法を用いて、所望により置換されてよい、１つまたはそれ以上ペプチド結合を有する。

【００８３】
同じ型のＤ－アミノ酸でコンセンサス配列の１つまたはそれ以上アミノ酸を系統的に置換すること（例えばＬ－リジンの代わりにＤ－リジン）は、より安定なペプチドを産生するために用いられてよい。加えて、コンセンサス配列または実質的に同一であるコンセンサス配列の変異形を含む拘束性ペプチドは、この分野で知られている方法により産生されてよく（Ｒｉｚｏ ａｎｄ Ｇｉｅｒａｓｃｈ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，６１：３８７（１９９２）：参照により本明細書に組み込まれる）；例えば、ペプチドを環化する分子間ジスルフィド架橋を形成することのできる内部システイン残基を付加することによる。

【００８４】
「抗体」または「抗体ペプチド」は、特異的結合に関してインタクトな抗体と競合するインタクトな抗体、またはその結合フラグメントを言う。結合フラグメントは、組み換えＤＮＡ技法、またはインタクトな抗体の酵素的または化学的分解により生成される。結合フラグメントはＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖおよび単鎖抗体を含む。二重特異性または二重機能性以外の抗体は、その結合部位のそれぞれが同一であると理解される。過剰な抗体が、受容体とカウンター受容体間の結合量を、少なくとも約２０％、４０％、６０％または８０％、より一般的には、約８５％以上（インビトロ競合結合アッセイで測定するとして）で減少する場合に、実質的に、抗体は受容体がカウンター受容体に接着するのを阻害する。

【００８５】
パパイン酵素での抗体の消化は、結果として２つの同一の抗原－結合フラグメントを生じ、これらは「Ｆａｂ」フラグメントおよび「Ｆｃ」フラグメントとして知られており、抗原結合活性を有さないが、結晶化力は有する。ペプシン酵素での抗体の消化は、結果として「Ｆ（ａｂ）$_2$」フラグメントを生じ、該フラグメントにおいて、抗体分子の２つのアームは結合したままであり、２つの抗原結合部位を含む。Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは抗原と架橋することができる。

【００８６】
本明細書で用いる「Ｆｖ」は、抗原認識および抗原結合部位間に保持される抗体の最小フラグメントを言う。

【００８７】
本明細書で用いる「Ｆａｂ」は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖のＣＨ１ドメインを含む抗体のフラグメントを言う。

【００８８】
「エピトープ」なる語は、免疫グロブリンまたはＴ細胞受容体に特異的に結合ができるタンパク質決定因子を含む。エピトープの決定因子はたいてい、アミノ酸や糖側鎖のごとき分子の表面に化学的に活性のある基からなり、たいていは、荷電の特徴が特異的であることに加えて、特異的三次元構造という特徴を有する。解離定数が１μＭ以下、好ましくは、１００ｎＭ以下、もっとも好ましくは１０ｎＭ以下の場合に、抗体は特異的に抗原に結合すると言われている。

【００８９】
本明細書では、「剤」なる語は、化学物質、化学物質の混合物、生物のマクロ分子または生物物質の抽出物を意味する。

【００９０】
本明細書で用いる「薬剤」または「薬」なる語は、患者に適当に投与される場合に、望ましい治療効果を生じることのできる化学物質または組成物を言う。本明細書中他の化学用語は、この分野での慣用的な使用にしたがって用いられ、例えばＴｈｅ ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｒｍｓ（Ｐａｒｋｅｒ，Ｓ．，Ｅｄ．，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ（１９８５））により例証され、また参照により本明細書に組み込まれる。

【００９１】

本明細書で用いる「抗腫瘍剤」なる語は、ヒト中の腫瘍、特に癌腫、肉腫、リンパ腫または白血病のごとき悪性（癌性）障害の発症および進行を阻害する機能的性質を有する剤を言う。転移の阻害は、抗腫瘍剤のよくある性質である。

【００９２】

本明細書で用いるように、「実質的に純粋」は、対象種が存在している優性種であり（すなわちモルベースで、組成物中いずれの他の個々の種より豊富である）、また好ましくは、実質的に精製された画分が、対象種が存在するすべてのマクロ分子種の少なくとも約５０パーセント（モルベースで）を構成する組成物であることを意味する。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物中、存在するすべてのマクロ分子種の約８０パーセント以上、より好ましくは約８５％、９０％、９５％および９９％以上を含む。もっとも好ましくは、対象種は精製されて、本質的に同種となり（汚染種は慣用的な検出方法により組成物から検出することはできない）、該組成物は、本質的に単一のマクロ分子種から成る。

【００９３】

ＴＩＭ－１ポリペプチドに関しての「有効な」または「活性」は、天然のＴＩＭ－１ポリペプチドの生物または免疫活性を有する、ＴＩＭ－１ポリペプチドの部分を言う。本明細書で用いられる場合に、「生物学的」なる語は、天然のＴＩＭ－１ポリペプチドの活性に由来する生物学的機能を言う。好ましい生物学的活性は、例えば、細胞増殖の調節である。

【００９４】

本明細書で用いる「標識」または「標識された」なる語は、ポリペプチドに検出可能な部分を付加することを言い、例えば、放射標識、蛍光標識、酵素標識、化学ルミネセンス標識またはビオチン標識である。放射性同位元素または放射性核種は、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉを含んでよく、蛍光標識はローダミン、ランタニドのリン光またはＦＩＴＣを含んでよく、また酵素標識はセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼを含んでよい。

【００９５】

本明細書で用いられる場合に、「哺乳類」は、哺乳類とみなされるいずれの動物も言う好ましくは、哺乳類はヒトである。

【００９６】

本明細書で用いられる場合に、「リポソーム」は、本明細書に記載するＴＩＭ－１ポリペプチドまたはかかるＴＩＭ－１ポリペプチドに対する抗体をはじめとする薬剤のデリバリーに有用でありうる小胞をいう。

【００９７】

「患者」なる語は、ヒトおよび動物の対象を含む。

【００９８】

抗体の構造

基本的な完全抗体の構造ユニットは４量体を含むことが知られている。各々の４量体は２つの同一なポリペプチド鎖の対から成り、各々の対は「軽鎖」（約２５ｋＤａ）および「重鎖」（約５０ないし７０ｋＤａ）を有する。各々の鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に関与する約１００ないし１１０またはそれ以上のアミノ酸可変ドメインを含む。各々の鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖に分類される。ヒト重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンに分類され、抗体のアイソタイプは各々ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＥで定義される。軽鎖および重鎖内では、可変および定常領域は、約１２またはそれ以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結されており、また重鎖は、約１０またはそれ以上のアミノ酸の「Ｄ」領域も含む。一般的に、Ｆｕｎｄａｆｎｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｄ ｅｄ． Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））を参照せよ（参照によりすべての目的のために完全に本明細書に組み込まれる）。軽鎖／重鎖対の各々の可変領域は、抗体結合部位を形成

する。

【００９９】

可変ドメインはすべて、３つの超可変領域により連結されている、相補鎖決定領域またはＣＤＲｓとも呼ばれる、相対的に保存されているフレームワーク領域（ＦＲ）と同一の一般構造を示す。各々の対の重鎖および軽鎖のＣＤＲｓは、フレームワーク領域によって並べられており、特異的エピトープに結合することが可能である。

【０１００】

Ｎ－末端ないしＣ－末端の軽鎖および重鎖は、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４を含む。各々の領域へのアミノ酸の帰属は、Ｋａｂａｔの定義による〔Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７ａｎｄ１９９１））〕または（Ｃｈｏｔｈｉａ＆Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３４２：８７８－８８３（１９８９））。

【０１０１】

二重特異性または二重機能をもつ抗体は、２つの異なる重鎖／軽鎖対、および２つの異なる結合部位を有する、人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’フラグメントの連結を含む様々な方法で産生されることが可能である。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ＆Ｌａｃｈｍａｎｎ，Ｃｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５－３２１（１９９０），Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照せよ。二重特異性抗体は、単一の結合部位を有するフラグメントの形態（例えばＦａｂ、Ｆａｂ’およびＦｖ）では存在しない。

【０１０２】

かかる二重機能または二重特異性抗体が本発明により熟考され包含されることは理解されよう。細胞毒性Ｔリンパ球上のＴＩＭ－１およびＣＤ３抗原に特異的である、二重特異性単鎖抗体は、ＴＩＭ－１を発現する腫瘍細胞にこれらのＴ細胞を結合し、腫瘍のアポトーシスおよび撲滅を起こすために用いられることが可能である。この目的のための２つの二重特異性ｓｃＦｖ構築物は本明細書中に記載されている。ＴＩＭ－１に特異的であるｓｃＦｖ成分は、本明細書に記載する抗－ＴＩＭ－１抗体由来であることができる。

【０１０３】

いくつかの具体例において、表４および５中に開示されている抗－ＴＩＭ－１抗体成分は、ＴＩＭ－１に結合する生物学的活性のあるｓｃＦｖｂｅを産生するために用いられることが可能である。好ましい具体例において、ｓｃＦｖ成分は、ｍＡｂ２．７０に由来する。治療上二重特異的であるｓｃＦｖの抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ成分は、ジェンバンク中に置かれている配列（アクセス番号ＣＡＥ８５１４８）に由来していた。ＣＤ３を標的することが知られている別の抗体または他のＴ細胞抗原は、単鎖バックボーンかまたは完全型ＩｇＧ上で抗－ＴＩＭ－１とカップリングさせる場合に、悪性腫瘍の治療に同様に有効である。

【０１０４】

ヒト抗体および抗体のヒト化

本明細書に記載する本発明の具体例は、ヒト抗体を熟考し、包含する。ヒト抗体は、マウスまたはラットの可変および／または定常領域を有する抗体に関連する特定の問題を回避する。かかるマウスまたはラット由来のタンパク質の存在により、抗体の迅速なクリアランスを導き、また齧歯類以外の哺乳類による抗体に対して、免疫反応を生じさせることが可能である。

【０１０５】

ヒト抗体

ＹＡＣｓ中のメガベースの大きさのヒトｌｏｃｉを単離し、再構築し、それをマウス生

殖系列へ導入する力は、ヒト疾患の有用なモデルを生み出すことに加えて、非常に大きくまたは粗くマッピングされたｌｏｃｉの機能成分を解明するための、強力なアプローチを提供する。かかる戦略の重要で実際的な応用は、マウス体液性免疫システムの「ヒト化」である。ヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）ｌｏｃｉを、内因性Ｉｇ遺伝子が不活性であるマウスへ導入することにより、マウス中にヒト抗体を発現する機会が提供される。完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス由来のＭａｂｓに本来備わっている免疫およびアレルギー応答を最小化し、ヒトへ投与される抗体の効力および安全性を増大することが期待される。完全ヒト抗体の使用は、炎症、自己免疫疾患および癌のごとき、慢性および再発性のヒト疾患の治療において実質的な利点を提供することを期待することができ、該治療においては、繰り返し抗体を投与することが必要とされる。

【０１０６】

この目的に対する１つのアプローチは、マウスが、マウス抗体がないために多量のヒト抗体を産生するだろうということを予測して、ヒトＩｇ　ｌｏｃｉの大きなフラグメントを用いて、マウス抗体産生が欠損したマウス株を得ることだった。この一般的な戦略は、１９９４年に公開された我々の初めてのＸｅｎｏＭｏｕｓｅＸ（登録商標）株の産生に関連して、実証された。Ｇｒｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　７：１３－２１（１９９４）を参照せよ。ＸｅｎｏＭｏｕｓｅＸ（登録商標）株は、それぞれヒト重鎖遺伝子座およびカッパ軽鎖遺伝子座にある、２４５ｋｂおよび１９０ｋｂの大きさの生殖系列配置のフラグメントを含む、酵母人工染色体（ＹＡＣｓ）で操作し、該フラグメントは核となる可変および定常領域配列を含んでいた。ＸＥＮＯＭｏｕｓｅ（登録商標）株はアブジェニック社（フリモント、ＣＡ）から入手可能である。ヒト抗体量のおよそ８０％以上が、ＸＥＮＯＭｏｕｓｅ（登録商標）マウスを作り出すために、各々ヒト重鎖遺伝子座およびカッパ軽鎖遺伝子座にあるメガベースの大きさの生殖系列配置のＹＡＣフラグメントを用いて、導入された。

【０１０７】

ＸＥＮＯＭｏｕｓｅ（登録商標）の産出は、以下の特許でさらに議論され詳しく描写されている：米国特許出願第０７／４６６，００８号（出願日１９９０年1月１２日）、第０７／６１０，５１５号（出願日１９９０年１１月８日）第０７／９１９，２９７（出願日１９９２年7月２４日）、第０７／９２２，６４９号（出願日１９９２年7月３０日）第０８／０３１，８０１号（出願日１９９３年3月１５日）、第０８／１１２，８４８号（出願日１９９３年8月２７日）第０８／２３４，１４５号（出願日１９９４年4月２８日）、第０８／３７６，２７９号（出願日１９９５年1月２０日）、第０８／４３０，９３８号（１９９５年4月２７日）、第０８／４６４，５８４号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４６４，５８２号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４６３，１９１号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４６２，８３７号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４８６，８５３号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４８６，８５７号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４８６，８５９号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／４６２，５１３号（出願日１９９５年6月5日）、第０８／７２４，７５２（出願日１９９６年１０月2日）および第０８／７５９，６２０号（出願日１９９６年１２月3日）、ならびに米国特許第６，１６２，９６３号、第６，１５０，５８４号、第６，１１４，５９８号、第６，０７５，１８１号および第５，９３９，５９８号、ならびに日本特許第３０６８　１８０　Ｂ２号、第３０６８　５０６　Ｂ２号および第３０６８　５０７　Ｂ２号。Ｍｅｎｄｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１５：１４６－１５６（１９９７）およびＧｒｅｅｎ　ａｎｄ　Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ，Ｊ　Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８：４８３－４９５（１９９８）もまた参照せよ。ヨーロッパ特許第ＥＰ　０　４６３　１５１Ｂ１号（公告日１９９６年6月１２日）、国際特許出願ＷＯ　９４／０２６０２（公開日１９９４年2月3日）、国際特許出願ＷＯ　９６／３４０９６（公開日１９９６年１０月３１日）、ＷＯ９８／２４８９３（公開日１９９８年6月１１日）、ＷＯ　００／７６３１０（公開日２０００年１２月２１日）もまた参照せよ。上で引用した特許、特許出願および参考文献の各々の開示は、参照により本明細書

にそのすべてが組み込まれる。

【０１０８】

別のアプローチは、「ミニ遺伝子座」アプローチを利用しており、該アプローチにおいて、外来性のＩｇ遺伝子座は、Ｉｇ遺伝子座からのフラグメント（個々の遺伝子）を含むために擬態物である。よって、１つまたはそれ以上のV_H遺伝子、１つまたはそれ以上のD_H遺伝子、１つまたはそれ以上のJ_H遺伝子、ミュー定常領域および第二の定常領域（好ましくは、ガンマ定常領域）が、動物へ挿入するための構築物を形成する。このアプローチは、下記に記載されている：米国特許第５，５４５，８０７号（Ｓｕｒａｎｉｅｔら）、および米国特許第５，５４５，８０６号、第５，６２５，８２５号、第５，６２５，１２６号、第５，６３３，４２５号、第５，６６１，０１６号、第５，７７０，４２９号、第５，７８９，６５０号、第５，８１４，３１８号、第５，８７７，３９７号、第５，８７４，２９９号、および第６，２５５，４５８号（各々ＬｏｎｂｅｒｇおよびＫａｙ）、また米国特許第５，５９１，６６９号および第６，０２３，０１０号（ＫｒｉｍｐｅｎｆｏｒｔおよびＢｅｒｎｓ）、米国特許第５，６１２，２０５号、第５，７２１，３６７号、および第５，７８９，２１５号（Ｂｅｒｎｓら）、および米国特許第５，６４３，７６３号（ＣｈｏｉおよびＤｕｎｎ）、およびジェンファームインターナショナル社の米国特許第０７／５７４，７４８号（出願日１９９０年８月２９日）、第０７／５７５，９６２号（出願日１９９０年８月３１日）、第０７／８１０，２７９号（出願日１９９１年１２月１７日）、第０７／８５３，４０８号（出願日１９９２年３月１８日）、第０７／９０４，０６８号（出願日１９９２年６月２３日）、第０７／９９０，８６０号（出願日１９９２年１２月１６日）、第０８／０５３，１３１号（出願日１９９３年４月２６日）、第０８／０９６，７６２号（出願日１９９３年７月２２日）、第０８／１５５，３０１号（出願日１９９３年１１月１８日）、第０８／１６１，７３９号（出願日１９９３年１２月３日）、第０８／１６５，６９９号（出願日１９９３年１２月１０日）、第０８／２０９，７４１号（出願日１９９４年３月９日）。これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。ヨーロッパ特許第０　５４６　０７３　Ｂ１号、国際特許ＷＯ　９２／０３９１８、ＷＯ　９２／２２６４５、ＷＯ　９２／２２６４７、ＷＯ　９２／２２６７０、ＷＯ　９３／１２２２７、ＷＯ　９４／００５６９、ＷＯ９４／２５５８５、ＷＯ　９６／１４４３６、ＷＯ９７／１３８５２およびＷＯ９８／２４８８４、ならびに米国特許第５，９８１，１７５号も参照とし、これらの開示は参照によって本明細書に完全に組み込まれる。さらにＴａｙｌｏｒら（１９９２）、Ｃｈｅｎら（１９９３）、Ｔｕａｉｌｌｏｎら（１９９３）、Ｃｈｏｉら（１９９３）、Ｌｏｎｂｅｒｇら（１９９４）、Ｔａｙｌｏｒら（１９９４）、Ｔｕａｉｌｌｏｎら（１９９５）、およびＦｉｓｈｗｉｌｄら（１９９６）を参照とし、これらの開示は参照によって本明細書に完全に組み込まれる。

【０１０９】

キメラ抗体はヒト定常領域およびマウス可変領域を有しているが、特に抗体を慢性的に、または複数投与で利用する場合に、特定のヒト抗－キメラ抗体（ＨＡＣＡ）応答が観察されるだろうことが期待される。よって、ヒト抗－マウス抗体（ＨＡＭＡ）またはＨＡＣＡ応答の関係および／または効果を損なうために、ＴＩＭ－１に対する完全ヒト抗体を提供することは望ましいだろう。

【０１１０】

ヒト化およびディスプレイ技法

推定の免疫原性を有する抗体は、ヒト化およびライブラリーディスプレイ技法を用いて産生されることが可能である。この分野でよく知られている技法を用いて、抗体をヒト化または霊長類化することが可能であることは理解されよう。例えばＷｉｎｔｅｒ　ａｎｄ　Ｈａｒｒｉｓ，Ｉｍｍｎｏｌ　Ｔｏｄａｙ　１４：４３－４６（１９９３）、およびＷｒｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｒｉｔ，Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：１２５－１６８（１９９２）を参照せよ。目的の抗体は組み換えＤＮＡ技法により操作され、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジドメインおよび／またはフレームワークドメインを、対応するヒト配列で置換することが可能である（ＷＯ　９２／０２１９０ならびに米国

特許第５，５３０，１０１号、第５，５８５，０８９号、第５，６９３，７６１号、第５，６９３，７９２号、５，７１４，３５０号および第５，７７７，０８５号参照）。キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのＩｇ　ｃＤＮＡの使用もまたこの分野で知られている（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐ．Ｎ．Ａ．Ｓ．８４：３４３９（１９８７）およびＪ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１（１９８７））。ｍＲＮＡは抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞から単離され、ｃＤＮＡを作成するために用いられる。目的のｃＤＮＡは、特異的プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により増幅可能である（米国特許第４，６８３，１９５号および第４，６８３，２０２号）。あるいは、抗体の可変領域をコードする目的の配列を単離するために、発現ライブラリーが作られ、またスクリーニングされ、ついでヒト定常領域配列に融合される。ヒト定常領域遺伝子の配列は、Ｋａｂａｔらの（“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”，Ｎ．Ｉ．Ｈ．ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　ｎｏ．９１－３２４２（１９９１））中に見出すことが可能である。ヒトＣ領域遺伝子は、既知のクローンから容易に手に入る。アイソタイプの選択は、抗体依存性細胞障害活性の補体修復または活性のごとき所望のエフェクター機能により導かれるだろう。好ましいアイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４である。ヒト軽鎖定常領域、カッパまたはラムダのいずれかも使用可能である。ついで、キメラヒト化抗体は慣用法により発現する。発現ベクターは、プラスミド、レトロウィルウス、ＹＡＣｓ、ＥＢＶ由来エピソームなどを含む。

【０１１１】

Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦａｂ抗体フラグメントは、例えばプロテアーゼまたは化学分解による、インタクトなタンパク質の分解によって調製可能である。あるいは、切断型遺伝子がデザインされる。例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント部分をコードするキメラ遺伝子は、Ｈ鎖のＣＨ１ドメインおよびヒンジ領域をコードするＤＮＡ配列を含み、その後、翻訳終止コドンにより、切断型分子を産出する。

【０１１２】

ＨおよびＬ　Ｊ領域のコンセンサス配列は、Ｖ領域セグメントをヒトＣ領域セグメントへ引き続き連結するために、Ｊ領域へ有用な制限部位を導入するためのプライマーとして用いるためのオリゴヌクレオチドを設計するために用いられることができる。Ｃ領域ｃＤＮＡは部位特異的変異誘発によって修飾され、ヒト配列中の類似の位置にある制限部位に位置することができる。

【０１１３】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウィルス、ＹＡＣｓ、ＥＢＶ由来エピソームなどを含む。便利なベクターは、ＶＨまたはＶＬ配列が容易に挿入されまた発現することが可能なように操作された適当な制限部位を有する完全ヒトＣＨまたはＣＬ免疫グロブリン配列を機能的にコードするものである。かかるベクターにおいて、スプライシングは、たいてい挿入されたＪ領域中のスプライスドナー部位およびヒトＣ領域の前にあるスプライスアクセプター部位の間、およびヒトＣＨエキソン内に存在するスプライス領域でも起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域下流のネイティブな染色体部位で起こる。生じたキメラ抗体は、例えば、ＳＶ－４０初期プロモーター（Ｏｋａｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏ．３：２８０（１９８３）），Ｒｏｕｓ　ｓａｒｃｏｍａ　ｖｉｒｕｓ　ＬＴＲ（Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐ．Ｎ．Ａ．Ｓ．７９：６７７７（１９８２））、およびモロニーマウス白血病ウィルスＬＴＲ（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌ　ｅｔａｌ．，Ｃｅｌｌ　４１：８８５（１９８５））などのレトロウィルスＬＴＲｓを含む、いずれの強力なプロモーターに結合されることが可能である。ネイティブＩｇプロモーターなどが使用可能であることもまた理解されよう。

【０１１４】

さらに、ヒト抗体または他の種由来の抗体は、ファージディスプレイ、レトロウィルスディスプレイ、リボソームディスプレイおよび他の技法を含むがこれらに限らないディスプレイ型の技法によって、この分野でよく知られている技法を用いて、産生されることが

可能であり、生じた分子は、アフィニティーマチュレーションのごときさらなるマチュレーションにさらすことができ、かかる技法はこの分野でよく知られている[Ｗｒｉｇｈｔ and Ｈａｒｒｉｓ，ｓｕｐｒａ．，Ｈａｎｅｓ ａｎｄ Ｐｌｕｃｔｈａｕ，ＰＮＡＳ ＵＳＡ９４：４９３７－４９４２（１９９７）（ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｄｉｓｐｌａｙ），Ｐａｒｍｌｅｙ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｇｅｎｅ７３：３０５－３１８（１９８８）（ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ），Ｓｃｏｔｔ，ＴＩＢＳ １７：２４１－２４５（１９９２），Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ＵＳＡ８７：６３７８－６３８２（１９９０），Ｒｕｓｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２１：１０８１－１０８５（１９９３），Ｈｏｇａｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｉｅｗｓ１３０：４３－６８（１９９２），Ｃｈｉｅｗｅｌｌ ａｎｄ ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ １０：８０－８４（１９９２），ａｎｄ Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．５，７３３，７４３]。ディスプレイ技法がヒトでない抗体を産生するために利用されるならば、かかる抗体は上記のようにヒト化されることが可能である。

【０１１５】

これらの技法を用いて、抗体が、ＴＩＭ－１発現細胞、ＴＩＭ－１そのもの、ＴＩＭ－１の型、それらのエピトープまたはペプチドおよびその発現ライブラリー（例えば米国特許第５，７０３，０５７号参照）に対して産生されることが可能であり、その後上記の活性について上記のようにスクリーニングされることが可能である。

【０１１６】

抗体治療剤

ある点において、ＴＩＭ－１に対する治療剤候補としての抗体の産生に関連して、抗体は補体を修復し、また補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）に関与することができるということが望ましくありうる。かかる抗体は、下記：マウスＩｇＭ、マウスＩｇＧ２ａ、マウスＩｇＧ２ｂ、マウスＩｇＧ３、ヒトＩｇＭ、ヒトＩｇＧ１およびヒトＩｇＧ３を含むがこれらに限らない。産生された抗体は、初めにかかるアイソタイプを持つ必要はないが、産生された抗体は、いずれのアイソタイプを持つことが可能であり、また抗体は、その後この分野でよく知られている技法を用いてスイッチされるアイソタイプであることができるということが理解されよう。かかる技法は、直接組み換え技法の使用を含み（例えば米国特許第４，８１６，３９７号参照）、特に細胞融合技法（例えば米国特許第５，９１６，７７１号および第６，２０７，４１８号）である。

【０１１７】

細胞－細胞融合技法において、いずれの所望のアイソタイプを有する重鎖を持つ骨髄腫または他の細胞株が調製され、および軽鎖を有する別の骨髄または他の細胞株が調製される。その後かかる細胞は融合され、インタクトな抗体を発現する細胞株を単離することができる。

【０１１８】

実施例によって、本明細書に記載するＴＩＭ－１抗体は、ヒト抗ＴＩＭ－１ ＩｇＧ２抗体である。かかる抗体が所望のＴＩＭ－１分子との結合を有するならば、容易にアイソタイプはスイッチされ、ヒトＩｇＭ、ヒトＩｇＧＩまたはヒトＩｇＧ３アイソタイプを産出し、一方で同じ（抗体特異的およびそのアフィニティーのいくつかを決定する）可変領域を依然として有している。かかる分子は、補体を修復し、またＣＤＣに関与することができるだろう。

【０１１９】

他の治療剤の設計および製造

腎臓および膵臓の腫瘍、頭部および頚部癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膀胱癌、直腸癌、食道癌および脳腫瘍に関連するために、抗－ＴＩＭ－１抗体を含む抗悪性腫瘍剤は本発明によって熟考されまた包含される。

【０１２０】

さらに、ＴＩＭ－１に関して本明細書中で産生されまた特徴付けられる抗体活性に基づ

いて、抗体部分を超えた他の治療様式の設計が促進される。かかる様式は、二重特異性抗体、免疫毒素および放射標識治療剤のごとき発展した抗体治療剤、ペプチド治療剤の産出、遺伝子治療、特に細胞内抗体、アンチセンス治療剤および低分子を含むがこれらに限らない。

【０１２１】

補体修復が所望の特性である、発展した抗体治療剤の産生に関連して、例えば二重特異性、免疫毒素または放射標識の使用を通して、細胞殺傷のための補体依存を回避することが可能である。

【０１２２】

例えば、二重特異性抗体に関連して、二重特異性抗体が産生されることが可能であり、該抗体は（ｉ）１つはＴＩＭ－１に特異的なものであり、またもう１つは一緒にコンジュゲートしている２番目の分子に特異的なものである、２つの抗体（ｉｉ）ＴＩＭ－１に単鎖特異的であって、２番目の分子に二本鎖特異的である単一抗体、または（ｉｉｉ）ＴＩＭ－１に特異的である単鎖抗体および他の分子を含む。かかる二重特異性抗体は、よく知られている技法を用いて産生することが可能であり、例えば（ｉ）および（ｉｉ）に関連しては、例えばＦａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ４：７２－８１（１９９４）ａｎｄ Ｗｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ，ｓｕｐｒａを参照に、また（ｉｉｉ）に関しては例えば、Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ：Ｃａｎｃｅｒ（Ｓｕｐｐｌ．） ７：５１－５２（１９９２）を参照せよ。各々の場合において、第二の特異性は、ＣＤ１６またはＣＤ６４（例えばＤｅｏ ｅｔ ａｌ．，１８：１２７（１９９７）参照）またはＣＤ８９（例えばＶａｌｅｒｉｕｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ９０：４４８５－４４９２（１９９７）参照）を含むがこれらに限らない、重鎖活性化受容体である。前記にしたがって調製された二重特異性抗体は、ＴＩＭ－１を発現する細胞、特に本明細書に記載するＴＩＭ－１抗体が有効である細胞を殺すだろう。

【０１２３】

免疫毒素に関して、抗体は修飾され、この分野でよく知られている技法を利用して免疫毒素として作用することができる。例えばＶｉｔｅｔｔａ，ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ １４：２５２（１９９３）を参照せよ。米国特許第５，１９４，５９４もまた参照せよ。放射標識抗体の製剤に関連して、かかる修飾抗体はこの分野でよく知られている技法を利用して容易に調製することも可能である。例えばＪｕｎｇｈａｎｓ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ６５５－６８６（２ｄ ｅｄ．，Ｃｈａｆｎｅｒ ａｎｄ Ｌｏｎｇｏ，ｅｄｓ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｒａｖｅｎ（１９９６））を参照せよ。米国特許第４，６８１，５８１号、第４，７３５，２１０号、第５，１０１，８２７号、第５，１０２，９９０号（ＲＥ３５，５００）、第５，６４８，４７１号および第５，６９７，９０２号もまた参照せよ。各々の免疫毒素および放射標識分子はＴＩＭ－１発現細胞、特に本明細書記載の抗体が有効である細胞を殺すだろう。

【０１２４】

治療ペプチドの産生に関連して、本明細書記載の抗体（低分子に関連して下で述べるように）またはペプチドライブラリーのスクリーニングのごとき、ＴＩＭ－１およびその抗体に関連する構造情報の利用によって、ＴＩＭ－１に結合する治療ペプチドが産生可能である。ペプチド治療剤の設計およびスクリーニングはＨｏｕｇｈｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１（１９９２），Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ８２：５１３１－５１３５（１９８５），Ｐｉｎａｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：９０１－９０５（１９９２），Ｂｌａｋｅ ａｎｄ Ｌｉｔｚｉ－Ｄａｖｉｓ，ＢｉｏＣｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．３：５１０－５１３（１９９２）に関連して論じられている。免疫毒素および放射標識分子もまた、抗体に関連して上記したようにペプチド部分に関して同様の様式で、調製可能である。

【０１２５】

ＴＩＭ－１分子（またはスプライスバリアントまたはその代替型のような型）は疾患プロセスにおいて機能的に有効であるということを想定して、慣用法を用いて遺伝子およびそのアンチセンス治療剤を設計することも可能であろう。かかる様式は、ＴＩＭ－１機能の調節に関して利用可能である。それとともに抗体に関連して、本明細書に記載するように、それに関連する機能アッセイの設計および使用を促進する。アンチセンス治療剤のための設計および戦略は、国際特許の出願ＷＯ　９４／２９４４４で詳しく述べられている。遺伝子治療のための設計および戦略はよく知られている。しかしながら、特に細胞内抗体を含む遺伝子治療技法の使用は、とくに有利であると証明することができる。例えば、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　５：５９５－６０１（１９９４）ａｎｄ　Ｍａｒａｓｃｏ，Ｇｅｎｅ　ｔｈｅｒａｐｙ　４：１１－１５（１９９７）を参照せよ。遺伝子治療剤に関する一般的な設計および熟考は、国際特許の出願ＷＯ　９７／３８１３７にも論じられている。

【０１２６】

低分子治療剤もまた構想することができる。薬剤は本明細書記載のように、ＴＩＭ－１活性を調節するように設計されることができる。本明細書記載のように、ＴＩＭ分子の構造および本明細書記載の抗体のごとき他の分子との相互作用から集められた知見およびその他は、さらなる治療様式を設計するために合理的に利用されることができる。この観点において、Ｘ線結晶学、コンピューターによる分子モデリング（ＣＡＭＭ）、定量的または定性的構造活性相関（ＱＳＡＲ）および同様の技法のごとき合理的な薬剤設計技法が利用されることができ、薬剤発見の努力を集結する。合理的な設計によって、分子またはその特異型と相互作用でき、ＴＩＭ－１活性を修飾または調節するために用いられることができるタンパク質または合成構造を予想することができる。かかる構造は、化学的に合成されるか、または生物学的なシステムにおいて発現されることができる。このアプローチは、［Ｃａｐｓｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇｓ（Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９８８））］で論じられている。さらに、ライブラリーの組み合わせが設計、合成され、ハイスループットスクリーニングエフォート（ｈｉｇｈ　ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　ｅｆｆｏｒｔｓ）のごときスクリーニングプログラムにおいて用いられることができる。

【０１２７】

ＴＩＭ－１アゴニストおよびアンタゴニスト

本明細書記載の発明の具体例は、ＴＩＭ－１アゴニスト（擬態物）か、またはＴＩＭ－１アンタゴニストとして機能するＴＩＭ－１タンパク質変異体にも関連している。ＴＩＭ－１タンパク質変異体は、例えばＴＩＭ－１タンパク質別個のポイントミューテーションまたは切断のごとき突然変異誘発により産生されることが可能である。ＴＩＭ－１タンパク質アゴニストは実質的には、天然に存在する形態のＴＩＭ－１タンパク質の生物学的活性と同じものか、またはそのサブセットを保持できる。ＴＩＭ－１タンパク質アゴニストは、天然に存在する型のＴＩＭ－１タンパク質の活性の１つまたはそれ以上を、例えばＴＩＭ－１タンパク質を含む細胞シグナルカスケードの上流または下流メンバーに競合結合することによって、阻害することができる。よって、特異的生物学的な効果が、限定された機能の変異体での治療により導かれることができる。ある具体例において対象を、天然に存在する形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する変異体で治療することは、天然に存在する形態のＴＩＭ－１タンパク質での治療と比べて、対象中により低い副作用しか起こさない。

【０１２８】

ＴＩＭ－１アゴニスト（擬態物）またはＴＩＭ－１アンタゴニストとして機能するＴＩＭ－１タンパク質の変異体は、タンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性について、例えば、切断変異体のごときＴＩＭ－１タンパク質の変異体のライブラリーの組み合わせをスクリーニングすることにより同定可能である。ある具体例において、ＴＩＭ－１変異体の多彩なライブラリーは、例えば核酸レベルでの突然変異誘発の組み合わせにより作

成でき、また多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。ＴＩＭ－１変異体の多彩なライブラリーは、例えば合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲーションする。該遺伝子配列は、縮重した潜在的なＴＩＭ－１配列のセットが、個々のポリペプチドとして、あるいはＴＩＭ－１配列のセットを含むより大きな融合タンパク質（例えばファージディスプレイのための）として発現が可能であるようなものである。変性オリゴヌクレオチド配列から潜在的なＴＩＭ－１変異体のライブラリーを作成するために用いることのできる様々な方法がある。変性遺伝子配列の化学合成は、自動ＤＮＡシンセサイザー中で行われることができ、ついで合成遺伝子は、適当な発現ベクターにライゲートされる。縮重した遺伝子のセットにより、潜在的にＴＩＭ－１変異体配列を有する所望のセットをコードする配列のすべての１つの混合物において提供されてよい。変性オリゴヌクレオチドの合成方法はこの分野で知られている（例えばＮａｒａｎｇ，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　３９：３（１９８３）；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３（１９８４）；Ｉｔａｋｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８：１０５６（１９８４）；Ｉｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１１：４７７（１９８３）。

【０１２９】

放射免疫および免疫化学治療の抗体

癌の細胞毒の化学療法または放射線療法は、悪性細胞に選択的ではないために、毒性ないし感度のいい正常細胞に起こる、重大で時には命をおびやかすこともある副作用によって制限されている。よって、選択性を促進する必要がある。１つの戦略は、治療剤を、腫瘍関連抗原を認識する抗体へカップリングさせることである。このことは、悪性細胞をリガンド標的治療剤にさらすことを増大させるが、同じ剤に正常細胞をさらすことを減少させる。Ａｌｌｅｎ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ　２（１０）：７５０－６３（２００２）を参照せよ。

【０１３０】

ＴＩＭ－１抗原は、ＦＡＣＳおよびＩＨＣによる腫瘍細胞の細胞膜状での特異的発現によって示されるように、これらの腫瘍関連抗原の１つである。よって、本発明の１つの具体例は、ＴＩＭ－１抗原に結合しているモノクローナル抗体の使用であり、該抗原は、抗腫瘍治療剤として細胞毒素化学療法剤または放射線療法剤にカップリングしている。

【０１３１】

放射標識はこの分野で知られており、診断または治療放射免疫コンジュゲートに関して用いられてきた。放射標識の例は、下記：放射性同位元素または放射性核種（例えば３Ｈ、１４Ｃ、１５Ｎ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ９、ｌｌｌＩｎｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、Ｒｈｅｎｉｕｍ－１８６、Ｒｈｅｎｉｕｍ－１８８、Ｓａｍａｒｉｕｍ－１５３、Ｃｏｐｐｅｒ－６４、Ｓｃａｎｄｉｕｍ－４７）を含むが限定されない。例えば、臨床診断に導かれる放射免疫コンジュゲートにおいて用いられてきた放射性核種は：１３１Ｉ、１２５Ｉ、１２３Ｉ、９９Ｔｃ、６７Ｇａおよび１１１Ｉｎを含むが限定されない。

【０１３２】

抗体は、標的免疫療法において用いられうる様々な放射性核種でも標識されている（Ｐｅｉｒｅｒｓｚ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７参照）。モノクローナル抗体のコンジュゲートは、癌の診断および治療に関しても用いられる（例えばＩｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．６５：１１１－１２５）。これらの放射性核種は、例えば１８８Ｒｅ、１８６Ｒｅおよび９０Ｙを含み、またより限定的には、１９９Ａｕおよび６７Ｃｕ．Ｉ－（１３１）もまた治療目的で用いられる。米国特許第５，４６０，７８５号は、かかる放射性同位元素のリストを提供する。放射療法のキレートおよびキレートコンジュゲートがこの分野で知られている。米国特許第４，８３１，１７５号、第５，０９９，０６９号、第５，２４６，６９２号、第５，２８６，８５０号および第５，１２４，４７１号を参照せよ。

【０１３３】

抗－ＴＩＭ－１抗体を利用する免疫放射薬剤は、この分野でよく知られている技法を利

用して調製される。例えばＪｕｎｇｈａｎｓ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ６５５－６８６（２ｄ ｅｄ．，Ｃｈａｆｎｅｒ ａｎｄ Ｌｏｎｇｏ，ｅｄｓ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｒａｖｅｎ（１９９６））、米国特許第４，６８１，５８１号、第４，７３５，２１０号、第５，１０１，８２７号、ＲＥ３５，５００号、第５，６４８，４７１号および第５，６９７，９０２号を参照せよ。

【０１３４】

細胞毒性免疫コンジュゲートはこの分野で知られており、また治療剤として用いられている。かかる免疫コンジュゲートは、例えばメイタンシノイド（米国特許第６，４４１，１６３号）、チューブリンの重合反応阻害剤、アウリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）（Ｍｏｈａｍｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．１５（２）：３６７－７２（１９９９）；Ｄｏｒｏｎｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ２１（７）：７７８－７８４（２００３））、ドラスタチン誘導体（Ｏｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｘｉｃｏｌ Ｌｅｔｔ．１２１（２）：９７－１０６（２００１）；２１（３）７７８－７８４）、マイロターグ（登録商標）（ワイスラボラトリーズ、フィラデルフィア）；メイタンシノイド（ＤＭ１）、タキサンまたはメルタンシン（ｍｅｒｔａｎｓｉｎｅ）（ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ社）を用いてよい。抗－ＴＩＭ－１抗体を利用する免疫毒素は、この分野でよく知られている技法により調製されてよい。例えばＶｉｔｅｔｔａ，Ｉｍｍｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ１４：２５２（１９９３）；米国特許第５，１９４，５９４号を参照せよ。

【０１３５】

二重特異性抗体は、例えばこの分野でよく知られている技法を用いて産生されてよく、例えばＦａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ４：７２－８１（１９９４）；Ｗｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ，ｓｕｐｒａ；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ（Ｓｕｐｐｌ．） ７：５１－５２（１９９２）を参照せよ。各々の場合において、はじめの特異性はＴＩＭ－１に対してであり、２番目の特異性はＣＤ１６またはＣＤ６４（例えばＤｅｏ ｅｔ ａｌ．，１８：２７（１９９７））またはＣＤ８９（例えばＶａｌｅｒｉｕｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ９０：４４８５－４４９２（１９９７））を含むがこれらに限らない重鎖活性化受容体に対して生じてもよい。前記にしたがって調製される二重特異性抗体はＴＩＭ－１発現細胞を殺傷するだろう。

【０１３６】

抗体の目的とされる使用、すなわち診断または治療試薬としての使用によって、放射標識はこの分野で知られており、また同様の目的のために用いられる。例えば、臨床診断で用いられる放射性核種は：ｓｕｐ．１３１Ｉ、．ｓｕｐ．１２５Ｉ、．ｓｕｐ．１２３Ｉ、．ｓｕｐ．９９Ｔｃ、．ｓｕｐ．６７Ｇａおよびｓｕｐ．１１１Ｉｎ．を含むが限定されない。抗体は、標的免疫療法において用いられうる様々な放射性核種で標識もされる。Ｐｅｉｒｅｒｓｚ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）を参照せよ。モノクローナル抗体のコンジュゲートもまた、癌の診断および治療のために用いられる。例えばＩｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．６５：１１１－１２５を参照せよ。これらの放射性核種は、例えばｓｕｐ．１８８Ｒｅ、．ｓｕｐ．１８６Ｒｅおよび．ｓｕｐ．９０Ｙを含み、より限定的には．ｓｕｐ．１９９Ａｕおよび．ｓｕｐ．６７Ｃｕ．Ｉ－（１３１）は治療目的のためにも用いられる。米国特許第５，４６０，７８５号はかかる放射性同位元素のリストを提供する。

【０１３７】

放射療法のキレートおよびキレートコンジュゲートに関連する特許はこの分野で知られている。例えばＧａｎｓｏｗの米国特許第４，８３１，１７５号は、多置換ジエチレントリアミン五酢酸のキレート、および同じものを含むタンパク質コンジュゲート、ならびにそれらの調製方法に関連している。Ｇａｎｓｏｗの米国特許第５，０９９，０６９号。第５，２４６，６９２号、第５，２８６，８５０号および第５，１２４，４７１号もまた多

置換ＤＴＰＡキレートに関連している。

【０１３８】

細胞毒性の化学療法がこの分野で知られており、また同様の目的のために用いられる。例えば、米国特許第６，４４１，１６３号は、メイタンシノイドｓ　ａｎｄ　抗体　のｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　コンジュゲートの製造方法について説明している。チューブリンの重合反応抗阻害剤、アウリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）ＰＥの腫瘍活性もまたこの分野で知られている（Ｍｏｈａｍｍａｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．１５（２）：３６７－７２（Ａｕｇ　１９９９））。

【０１３９】

抗体の調製

簡潔にいうと、マウスのＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）株は、ＴＩＭ－１タンパク質で免疫され、リンパ細胞（例えばＢ細胞）は抗体を発現するマウスから取り出され、不死化ハイブリドーマ細胞株を調製するために骨髄型細胞株と融合し、またかかるハイブリドーマ細胞株は、ＴＩＭ－１特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定するためにスクリーニングされ、また選択される。あるいは、骨髄腫細胞と融合しハイブリドーマを産生する代わりに、ＴＩＭ－１に対する活性（例えばＴＩＭ－１－Ｈｉｓタンパク質を用いるＥＬＩＳＡによって決定される）を有する、マウスの免疫ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）株から単離して取り出したＢ細胞は、ついでＴＩＭ－１特異的溶血プラークアッセイを用いて単離される。Ｂａｂｃｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９３：７８４３－７８４８（１９９６）。このアッセイにおいて、ヒツジ赤血球細胞（ＳＲＢＣｓ）のごとき標的細胞は、ＴＩＭ－１抗原でコーティングされる。抗－ＴＩＭ－１抗体および補体を分泌するＢ細胞培養のもとで、プラーク形成は、標的細胞の特異的ＴＩＭ－１－仲介の溶解を示す。プラークの中心の単一の抗原－特異的形質細胞を単離し、単一の形質細胞から単離された抗体の特性をコードする遺伝情報を得た。

【０１４０】

逆転写ＰＣＲを用いて、分泌される抗体の可変領域をコードするＤＮＡをクローニングし、適当な発現ベクター、好ましくは、ｐｃＤＮＡのごときベクターカセット、より好ましくは、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の定常ドメインを含むｐｃＤＮＡベクター、へ挿入する。生じたベクターは、ついでホスト細胞、好ましくは、ＣＨＯ細胞に形質移入され、またプロモーターの誘発、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適当なように変更した、慣用的な栄養培地中で培養した。

【０１４１】

一般に、抗体は上記の細胞株により産生され、ヒトカッパ軽鎖とともに完全ヒトＩｇＧ２重鎖を有する。固相かまたは液相のどちらかによって測定される場合に、抗体は、高いアフィニティーを有し、典型的に約１０－６から約１０－１１ＭのＫｄ値を有する。これらのｅｍＡｂｓは、下で述べるように、抗原結合競合研究に基づいて、群または「ビン」に分類されることができる。

【０１４２】

本明細書に記載する抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株で発現することができるということは理解されよう。特定の抗体をコードする配列は、適当な哺乳類のホスト細胞の形質転換のために用いることができる。形質転換は、例えばウィルス（またはウィルス性のベクター）中のポリヌクレオチドのパッケージングを含む、ポリヌクレオチドをホスト細胞へ導入するためのいずれの既知法により、または米国特許第４，３９９，２１６号、第４，９１２，０４０号、第４，７４０，４６１号および第４，９５９，４５５号（ここで、これらの特許は参照により本明細書に組み込まれる）により実証されているごときこの分野で知られている形質移入法により行われてよい。用いられる形質転換法は、形質転換されるホストに依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳類細胞へ導入するための方法はこの分野で知られており、デキストラン仲介形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン仲介形質移入、プロトプラスト融合、電気穿孔法、リポソーム中のポリヌクレオチ

ドの被覆、および核酸へのＤＮＡのダイレクトマイクロジェクションを含む。

【０１４３】

発現に関してホストとして有効である哺乳類細胞株はこの分野で知られており、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝臓（ｈｅｐａｔｏ）細胞癌細胞（例えばＨｅｐＧ２）および多くの他の細胞株を含むが限定されない、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ （ＡＴＣＣ）から入手可能な多くの不死化細胞株を含む。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、本質的にＴＩＭ－１結合特性をもつ抗体を産生するのかを決定することをとおして、選択される。

【０１４４】

治療的投与および処方

標準的慣習に従って、例えば担体、賦形剤中に本発明の化合物を処方する。用語「医薬上許容される担体」は、それとともに変異プロトー癌遺伝子または変異癌タンパク質が混合されて適用を容易ならしめる、１またはそれ以上の有機または無機成分を意味し、それは天然物であっても合成品であってもよい。適当な担体は、滅菌セイラインを包含するが、医薬上許容されることが知られている他の水性および非水性等張滅菌溶液ならびに滅菌懸濁液が当業者に知られている。この点において、用語「担体」はリポソームおよび抗体（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．， Ａｎａｌ． Ｂｉｏｃｈｅｍ． ２２７：１６８－１７５（１９９５）参照）ならびにプラスミドおよびウイルス発現ベクターを包含する

【０１４５】

本発明のいずれの新規ペプチドを医薬上許容される塩の形態として使用してもよい。本発明のポリペプチドとともに塩を形成しうる適当な酸および塩基は当業者によく知られており、無機および有機酸および塩基を包含する。

【０１４６】

治療上有効量の本発明の化合物を対象に投与する。該量は、処置すべき個々の状態に対して医学的に望ましい結果、作用または影響を生じさせる化合物の量を意味する。有効量の本発明の化合物は、疾病のある、変性した、あるいはダメージを受けた状態を改善し、あるいはその進行を遅延させうる。有効量は個体に応じて決定でき、一部には対象の特質、処置すべき徴候および求められる結果に基づくであろう。有効量は、かかる因子を用いて、そして常套的な実験以上のことをせずに、当業者により定められ得る。

【０１４７】

本医学的に許容されるいずれの方法により発明の化合物を投与してもよい。これには静脈内、血管内、動脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、腹腔内、脳室内、硬膜内その他のごとき非経口経路による注射のほか、経口、鼻腔内、目からの、直腸からの、あるいは局所的投与が含まれる。デポット注射または崩壊可能インプラントのごとき手段による持続的放出投与もまた、特に本発明に用いられる。カテーテルによる腎動脈または局在化した腫瘍への血管のごとき１またはそれ以上の動脈への局部的デリバリーが特に企図される。

【０１４８】

本明細書に記載の生物学的に活性のある抗－ＴＩＭ－１抗体を滅菌医薬調合物または処方中に処方して、設計ＴＩＭ－１レベルを低下させ、そのことにより、例えばＴＩＭ－１が異常に上昇したごとき病的状態を効果的に処置することができる。好ましくは、抗－ＴＩＭ－１抗体はＴＩＭ－１を標的治療レンジにまで強力に抑制するための十分なアフィニティーを有するものであり、そして好ましくは、頻繁でない投与を可能にする十分な作用時間を有するものである。長い作用持続時間により、皮下または筋肉内注射のごとき交互の（alternate）非経口経路による、より頻繁でなく、より便利な投与計画が可能となるであろう。

【０１４９】

インビボ投与に用いる場合、抗体処方を滅菌しなくてはならない。例えば、凍結乾燥および復元を行う前あるいは後に滅菌済み濾過膜で濾過することにより、このことは容易に達成される。通常には、抗体を凍結乾燥形態または溶液として保存する。一般的に、治

療抗体組成物は、例えば、皮下注射針により貫通可能なストッパーのごとき処方の回収を可能にするアダプターを有する静脈溶液バッグまたはバイアルのごとき滅菌アクセスポートを有する容器中に入れられる。

【０１５０】

抗体投与経路は既知の方法に従うものであり、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、鞘内からの注射または輸液、吸入または傷の中への経路、あるいは下記の持続性放出系による。好ましくは、輸液またはボーラス注射により抗体を連続的に投与する。

【０１５１】

治療的に用いられる抗体の有効量は、例えば、治療目的、投与経路、および患者の状態に左右されるであろう。したがって、治療担当者が必要に応じて用量を決定し、投与経路を変更して、最適治療効果を得ることが好ましい。典型的には、医師が、所望効果を達成する用量に至るまで抗体を投与するであろう。この治療の進行は、慣用的なアッセイにより、あるいは本明細書記載のアッセイにより、容易にモニターされる。

【０１５２】

本明細書記載の抗体を、医薬上許容される担体との混合物として調製することができる。この治療組成物を静脈内投与し、あるいは鼻または肺を通して、好ましくは液体または粉末エアロゾル（凍結乾燥品）として投与することができる。全身投与する場合、治療組成物は滅菌済みのパイロジェン不含のものであり、ｐＨ、等張性および安定性の点で満足すべき非経口的に許容される溶液中にあるべきである。これらの条件は当業者に知られている。簡単に説明すると、本明細書記載の化合物の投与処方を、所望程度の純度を有する化合物を医薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより調製し、保存または投与する。かかる材料は、使用される用量および濃度において受容者に無毒であり、Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ、リン酸、クエン酸、酢酸および他の有機酸のごときバッファー；抗酸化剤；ポリアルギニンのごとき低分子量（約１０残基未満の）ペプチド、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのごときタンパク質；ポリビニルピロリドンのごとき親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのごときアミノ酸；単糖類、二糖類、およびセルロースまたはその誘導体を包含する他の炭水化物、グルコース、マンノースまたはデキストリン類；ＥＤＴＡのごときキレート剤マンニトールまたはソルビトールのごとき糖アルコール類；ナトリウムのごとき対イオンおよび／またはＴＷＥＥＮ、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳまたはポリエチレングリコールのごとき非イオン性界面活性剤を包含する。

【０１５３】

Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ（２０ｔｈ　ｅｄ，　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｅｎｓ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（２００３））中に記載されたような慣用的な製薬慣習に従って注射用滅菌組成物を処方することができる。例えば、水またはゴマ油、ピーナッツ油もしくは綿実油のごとき天然植物油またはオレイン酸エチル等のごとき合成油脂担体中への活性化合物の溶解が望ましい。許容されている製薬慣習に従ってバッファー、保存料、抗酸化剤等を含めることができる。

【０１５４】

持続性放出調合物の適当な例は、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半分透過性マトリックスであって、成型物、フィルムまたはマイクロカプセルの形態のものである。持続性放出マトリックスの例は、ポリエステル、Ｌａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ　Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．，（１９８１）１５：１６７－２２７およびＬａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．，（１９８２）１２：９８－９５に記載のようなヒドロゲル（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）、ポリアクチド（米国特許第３７７３９１９号、欧州特許第５８４８１号）、Ｌ－グルタミン酸とガンマエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，（１９８３）２２：５４７－５５６）、非分解性エ

チレン－ビニルアセテート（Ｌａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，上記文献）、ＬＵＰＲＯＮ　Ｄｅｐｏｔ™（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびリュープロリドから構成される注射可能な微小球）およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸のごとき分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（欧州特許第１３３９８８号）を包含する。

【０１５５】

エチレン－ビニルアセテートおよび乳酸－グリコール酸のごときポリマーは１００日間以上にわたる放出を可能にし、ある種のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル封入されたタンパク質が長時間体内に留まる場合、３７℃における水分にさらされた結果としてそれらは変性または凝集し、生物学的活性を失い、免疫原性が変化しうる。関与する機構に応じてタンパク質安定化のための合理的な戦略を工夫することができる。例えば、凝集機構が分子間ジスルフィド交換によるＳ－Ｓ結合形成によるものとわかった場合、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含量を制御し、適当な添加剤を使用し、そして特別な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を行うことができる。

【０１５６】

持続性放出組成物は、懸濁状態で結晶を維持しうる適当な処方中に懸濁された抗体の結晶の調合物も包含する。これらの調合物は、皮下または腹腔内注射された場合、持続性放出効果を生じうる。他の組成物はまた、リポソームに封入された抗体包含する。かかる抗体を含有するリポソームは、自体公知の方法：米国特許第３２１８１２１号；Ｅｐｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，（１９８５）８２：３６８８－３６９２；Ｈｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，（１９８０）７７：４０３０－４０３４； 欧州特許第５２３３２号；欧州特許第３６６７６号；欧州特許第８８０４６号；欧州特許第１４３９４９号；欧州特許第１４２６４１号；日本国特許出願第８３－１１８００８号；米国特許第４４８５０４５号および米国特許第４５４４５４５号；ならびに欧州特許第１０２３２４号に記載の方法により調製される。

【０１５７】

患者に対する抗体処方の用量は、担当医が、疾病の重さおよびタイプ、体重、性別、食事療法、投与時間および経路、他の投与薬剤ならびに他の関連した臨床的因子を包含する薬剤の作用を変化させることが知られている種々の因子を考慮することにより、決定されるであろう。インビトロまたはインビボ法により治療上有効な用量を決定することができる。

【０１５８】

治療的に用いられる本明細書記載抗体の有効量は、例えば、治療目的、投与経路、および患者の状態に左右されるであろう。したがって、治療担当者が必要に応じて用量を決定し、投与経路を変更して、最適効果を得ることが好ましい。典型的な１日の用量は、上記因子にもよるが、約０．００１ｍｇ／ｋｇないし１００ｍｇ／ｋｇまであるいはそれ以上の範囲であろう。典型的には、臨床医が、所望効果が達成される用量となるまで、治療抗体を投与するであろう。この治療の進行は慣用的なアッセイまたは本明細書記載のようにして容易にモニターされる。

【０１５９】

本明細書記載の組成物および方法により、改善された輸送、デリバリー、耐性等を提供するために処方中に含有される適当な担体、賦形剤および他の剤とともに治療物質が投与されるであろうことが理解されるであろう。これらの処方は、例えば、粉末、パスタ、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、小胞を含有する油脂（Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ™のごとき）（カチオン性またはアニオン性）、ＤＮＡ抱合体、無水吸収性パスタ、水中油および油中水エマルジョン、エマルジョンカルボワックス（種々の分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、ならびにカルボワックスを含有する半固体混合物を包含する。上記マトリックスのいずれもが本発明による処置および治療に適当であり得るが、ただし、処方中の活性成分が処方により不活性化されないこと、ならびに処方が投与経路に関して

生理学的に適合性を有し、耐えられるものであることが条件となる。薬化学者によく知られた処方、賦形剤および担体に関するさらなる情報についてはＢａｌｄｒｉｃｋ Ｐ．“Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ：ｔｈｅ ｎｅｅｄ ｆｏｒ ｐｅｒｃｌｉｎｉｃａｌ ｇｕｉｄａｎｃｅ”Ｒｅｇｕｌ．Ｔｏｘｏｃｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３２（２）：２１０－８（２０００）、Ｗａｎｇ Ｗ．“Ｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ｓｏｌｉｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ．”Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．２０３（１－２）：１－６０（２０００）、Ｃｈａｒｍａｎ ＷＮ “Ｌｉｐｉｄｓ，ｌｉｏｐｈｉｌｉｃ ｄｒｕｇｓ，ａｎｄ ｏｒａｌ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ－ｓｏｍｅ ｅｍｅｒｇｉｎｇ ｃｏｎｃｅｐｔｓ．”Ｊ Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８９（８）：９６７－７８（２０００）、Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ”ＰＤＡ Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌ．５２：２３８－３１１（１９９８）およびそれらの中の引用文献も参照のこと。

【０１６０】

本明細書記載の抗体はＴＩＭ－１発現から生じる徴候および症状の処置において治療上有効性を有すると考えられる。特別な具体例において、本明細書記載の抗体および方法は、癌の徴候を包含するＴＩＭ－１発現から生じる徴候の処置に関するものである。さらなる具体例は、肺、大腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌のごとき癌を処置するための本明細書記載の抗体および方法の使用を包含する。

【０１６１】

診断用途

ＴＩＭ－１は、正常腎臓において低レベルで発現されるが、虚血後の腎臓においてその発現が劇的に増大することが見出されている。Ｉｃｈｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３（７）：４１３５－４２（１９９８）。抗－ＴＩＭ－１抗体を用いた免疫組織学的染色は、腎臓、前立腺および卵巣の癌腫の陽性染色を示すので（下記参照）、正常組織と比較した場合のＴＩＭ－１の過剰発現は、かかる疾病の診断マーカーとして役立ちうる。

【０１６２】

抗体フラグメントを包含する抗体を用いて、ＴＩＭ－１タンパク質の発現を定性的または定量的に検出することができる。上記のごとく、好ましくは、抗体に検出可能な、例えば蛍光標識を付して、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリーまたは当該分野において知られた他の方法により結合をモニターすることができる。これらの方法は、増幅された遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば成長因子をコードしている場合に、特に適したものである。かかる結合アッセイは、当該分野において知られているようにして行われる。

【０１６３】

ＴＩＭ－１タンパク質への抗体結合のｉｎ ｓｉｔｕ検出を、例えば、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡により行うことができる。この目的のために、組織標本を患者から採取し、好ましくは生物学的試料上に抗体を重層することにより標識抗体をそれに適用する。この手順は、試験すべき組織中のマーカー遺伝子産物の分布を調べることも可能にする。広範な組織学的方法をｉｎ ｓｉｔｕ検出に利用できることが、当業者に明かであろう。

【０１６４】

エピトープマッピング

抗体により認識されるタンパク質免疫原の特定部分を、タンパク質の部分、例えばＮ末端側半分およびＣ末端側半分に対する抗体の反応性をアッセイすることにより決定してもよい。そして、得られた反応性フラグメントをさらに分断し、その後、最小の反応性ペプチドが決定されるまで、抗体を用いて免疫原の小さい部分についてアッセイすることができる。抗原配列から設計された重複ペプチドに対する反応性に関して抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ ２．７０．２をアッセイし、ＴＩＭ－１免疫原のアミノ酸１８９－２０２（配列番

号：５０）に対応するアミノ酸配列ＰＬＰＲＱＮＨＥ（配列番号：９６）を特異的に認識することがわかった。さらにそのうえ、アラニンスキャンニング法を用いて、第２のプロリンおよびアスパラギン残基がｍＡｂ　２．７０．２の結合に重要であろうと決定された。

【０１６５】

別法として、還元剤の不存在または存在下におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥにＴＩＭ－１免疫原を付し、免疫ブロッティングにより分析することにより、本発明の抗－ＴＩＭ－１抗体により結合されるエピトープを決定してもよい。ＳＥＬＤＩを用いてエピトープマッピングを行ってもよい。ＳＥＬＤＩ　ＰｒｏｔｅｉｎＣｈｉｐ（登録商標）（ＬｕｍｉＣｙｔｅ）アレイを用いてタンパク質－タンパク質相互作用部位を決定してもよい。ＰＲＯＴＥＩＮＣＨＩＰアレイ表面上に共有結合により固定化された抗体によりＴＩＭ－１タンパク質抗原またはそのフラグメントを特異的に捕捉してもよい。レーザー誘導脱離法により結合抗原を検出し、それらの分子量を直接分析し決定してもよい。

【０１６６】

線状ファージ上にディスプレイされるランダムペプチド１２量体のコンビナトリアルライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）にＰＲＯＴＥＩＮＣＨＩＰアレイを曝露することにより本明細書記載の抗－ＴＩＭ－１抗体により認識されるエピトープを決定してもよい。抗体－結合ファージを溶離し、次いで、増幅し、さらなる結合および増幅サイクルを経て、結合配列に関してプールを豊富化させてもよい。３または４ラウンド後に、抗体被覆ウェル上で行われるファージＥＬＩＳＡアッセイにより個々の結合クローンを結合に関してさらに試験し、陽性クローンの特定のＤＮＡ配列により特徴づける。

【実施例】

【０１６７】

実施例

行われた実験および得られた結果を含む下記実施例は、説明のためだけに提供され、本明細書記載の発明を限定するものとは解されない。

【０１６８】

実施例１

ＴＩＭ－１に結合するモノクローナル抗体の製造

ＴＩＭ－１の可溶性細胞外ドメインを免疫原として用いて、ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）動物における免疫応答を刺激した。ＴＩＭ－１細胞外ドメインのアミノ酸配列（推定Ｎ末端シグナルペプチドを除く）をコードするＤＮＡ（ＣＧ５７００８－０２）をサブクローンし、ｐＢｌｕｅＢａｃバキュロウイルス発現系（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）を用いて発現させ、ウエスタンブロット分析により確認した。下記ヌクレオチド配列は、抗体を得るために用いたポリペプチドをコードしている。

【表２】

TCTGTAAAGGTTGGTGGAGAGGCAGGTCCATCTGTCACACTACCCTGCCACTACA
GTGGAGCTGTCACATCAATGTGCTGGAATAGAGGCTCATGTTCTCTATTCACATG
CCAAAATGGCATTGTCTGGACCAATGGAACCCACGTCACCTATCGGAAGGACAC
ACGCTATAAGCTATTGGGGGACCTTTCAAGAAGGGATGTCTCTTTGACCATAGAA
AATACAGCTGTGTCTGACAGTGGCGTATATTGTTGCCGTGTTGAGCACCGTGGGT
GGTTCAATGACATGAAAATCACCGTATCATTGGAGATTGTGCCACCCAAGGTCA
CGACTACTCCAATTGTCACAACTGTTCCAACCGTCACGACTGTTCGAACGAGCAC
CACTGTTCCAACGACAACGACTGTTCCAACGACAACTGTTCCAACAACAATGAG
CATTCCAACGACAACGACTGTTCCGACGACAATGACTGTTTCAACGACAACGAG
CGTTCCAACGACAACGAGCATTCCAACAACAACAAGTGTTCCAGTGACAACAAC
GGTCTCTACCTTTGTTCCTCCAATGCCTTTGCCCAGGCAGAACCATGAACCAGTA
GCCACTTCACCATCTTCACCTCAGCCAGCAGAAACCCACCCTACGACACTGCAG
GGAGCAATAAGGAGAGAACCCACCAGCTCACCATTGTACTCTTACACAACAGAT
GGGAATGACACCGTGACAGAGTCTTCAGATGGCCTTTGGAATAACAATCAAACT
CAACTGTTCCTAGAACATAGTCTACTG（配列番号:53）

【０１６９】
それによりコードされるアミノ酸配列は以下のとおり：
【表３】

SVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDT
RYKLLGDLSRRDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITVSLEIVPPKVTTTP
IVTTVPTVTTVRTSTTVPTTTTVPTTTVPTTMSIPTTTTVPTTMTVSTTTSVPTTTSIPTT
TSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSY
TTDGNDTVTESSDGLWNNNQTQLFLEHSLL（配列番号:50）

【０１７０】
組み換えＴＩＭ－１の精製を容易にするために、発現構築物にＶ５結合ドメインＶ５およびＨＩＳタグのコーディング配列を含ませることができる。Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．（１９９９）に記載されたようにして、マウス抗体を産生しないように、そしてヒト重鎖およびカッパ軽鎖遺伝子座由来のメガベースサイズのフラグメント上のヒト抗体遺伝子レパートリーの大部分を含むように処理加工されたヒト抗体産生ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）株から、ＴＩＭ－１に指向された完全なヒトＩｇＧ２およびＩｇＧ４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）を得た。２つのＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）株、ｈＩｇＧ２（ｘｍｇ－２）株およびＩｇＧ４（３Ｃ－１）株をＴＩＭ－１抗原（配列番号：５０）で免疫した。両方の株は免疫に対して十分に応答した（表２および３）。

【表４】

表 2

TIM-1 抗原で免疫した XENOMOUSE® $hIgG_2$ 株の血清力価

グループ 1: 5 マウス ($hIgG_2$ 株); 免疫モード = フットパッド

	TIM-1に対する反応性 力価 (hIgG 経由)	
マウス番号	出血 (4 inj. 後)	出血 (6 inj. 後)
M716-1	600,000	600,000
M716-2	600,000	500,000
M716-3	200,000	400,000
M716-4	300,000	200,000
M716-5	400,000	400,000
負の対照	75	110
正の対照	-	600,000

【表５】

表 3

TIM-1 抗原で免疫した XENOMOUSE® IgG_4 株の血清力価

グループ 2: 5 マウス (IgG_4 株); 免疫モード = フットパッド

	TIM-1に対する反応性 力価 (hIgG 経由)	
マウス番号	出血 (4 inj. 後)	出血 (6 inj. 後)
M326-2	15,000	73,000
M326-3	7,500	60,000
M329-1	27,000	30,000
M329-3	6,500	50,000
M337-1	2,500	16,000
負の対照	<100	90
正の対照	-	600,000

【０１７１】

免疫したマウスからハイブリドーマ細胞系を得た。１．２９、１．３７、２．１６、２．１７、２．２４、２．４５、２．５４、２．５６、２．５９、２．６１、２．７０および２．７６と命名された選択されたハイブリドーマ（およびそれらのサブクローン）をさらに特徴づけた。細胞系１．２９および１．３７により産生された抗体は、ヒトカッパ軽鎖を伴う完全なヒトＩｇＧ２重鎖を有しており、細胞系２．１６、２．１７、２．２４、２．４５、２．５４、２．５６、２．５９、２．６１、２．７０および２．７６により産生された抗体は、ヒトカッパ軽鎖を伴う完全なヒトＩｇＧ４重鎖を有していた。

【０１７２】

１２種の抗－ＴＩＭ－１抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それらの生殖系の配列とともに下表４に示す。対応する軽鎖可変ドメイン領域のアミノ酸配列を下表５に示す。「Ｘ」はいずれかのアミノ酸、好ましくは対応アミノ酸位置における生殖系の配列を示す。免疫グロブリン中のＣＤＲｓ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）およびＦＲｓ（ＦＲ１、ＦＲ２およびＦＲ３）を個々の欄の上部に示す。

【表６】

表 4. 重鎖分析

mAb	配列番号:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	55	生殖細胞系	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	XXDY	WGQGTLVTVSSA
2.54	26	VH3-33/--/JH4b	QVQLEQSGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFTNYGLH	WVRQAPGKG LDWVA	VIWYDGSHKFYADSVKG	RFTISRDNSKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCTR	DLDY	WGQGTLVTVSSA
	56	生殖細胞系	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAX	XXYDSSXXXYGMDV	WGQGTTVTVSSA
2.76	46	VH3-33/D3-22/JH6b	XXXXEQSGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMY	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	DFYDSSRYHYGMDV	WGQGTTVTVSSA
	57	生殖細胞系	QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVS	GGSISSGGYYWS	WIRQHPGKG LEWIG	YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	XXXXSSSWYXXFDY	WGQGTLVTVSSA
2.59	34	VH4-31/D6-13/JH4b	XXXXXQSGPRLVKP SQTLSLTCTVS	GGSISSDGYYWS	WIRQHPGKG LEWIG	YIYYSGSTFYNPSLKS	RVAISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	ESPHSSNWYSGFDC	WGQGTLVTVSSA
	58	生殖細胞系	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	DYYDSSXXXXXFDY	WGQGTLVTVSSA
2.70	42	VH3-33/D3-22/JH4b	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFIFSRYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSNKLYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	DYYDNSRHHWGFDY	WGQGTLVTVSSA
2.24	18		QVQLEQSGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSRYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSNKLYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	DYYDNSRHHWGFDY	WGQGTLVTVSSA
2.61	38		QVQLVEAGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFRSYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSNKYYTDSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVR	DYYDNSRHHWGFDY	WGQGTLVTVSSA
2.56	30		QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSHKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYSAR	DYYDTSRHHWGFDC	WGQGTLVTVSSA
	59	生殖細胞系	EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKG LEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTX	XDXXXDY	WGQGTLVTVSSA
2.16	10	VH3-15/D3-16/JH4b	XXXXEQSGGGVVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMT	WVRQAPGKG LEWVG	RIKRRTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMN NLKNEDTAVYYCTS	VDNDVDY	WGQGTLVTVSSA
	60	生殖細胞系	QVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVS	GGSVSSGGYYWS	WIRQPPGKG LEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADAAVYYCAR	XXXWXXXFDY	WGQGTLVTVSSA
1.29	2	VH4-61/D1-7/JH4b	QVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVS	GGSVSSGGYYWS	WIRQPPGKG LEWIG	FIYYTGSTNYNPSLKS	RVSISVDTSKNQFSLKLS SVTAADAAVYYCAR	DYDWSFHFDY	WGQGTLVTVSSA
	61	生殖細胞系	EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKG LEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTT	XXXSGDY	WGQGTLVTVSSA
2.45	22	VH3-15/D6-19/JH4b	XXXXXQSGGGLVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMT	WVRQAPGKG LEWVG	RIKRKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSENTLYLQMN SLETEDTAVYYCTT	VDNSGDY	WGQGTLVTVSSA
	62	生殖細胞系	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSSYWMS	WVRQAPGKG LEWVA	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	XDY	WGQGTLVTVSSA
1.37	6	VH3-7/--/JH4b	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFTNYWMS	WVRQAPGKG LEWVA	NIQQDGSEKYYVDSVRG	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDSAVYYCAR	WDY	WGQGTLVTVSSA
	63	生殖細胞系	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKG LEWVS	YISSSSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCAX	XFDY	WGQGTLVTVSSA
2.17	14	VH3-48/--/JH4b	QVQLEQSGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSTYSMN	WVRQAPGKG LEWVS	YIRSSTSTIYYAESLKG	RFTISSDNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCAR	DFDY	WGQGTLVTVSSA

【表７】

表 5. 軽鎖分析

mAb	配列番号:	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	64	生殖細胞系	EIVLTQSPGTLSLS PGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPR LLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC	QQYGSSXXLT	FGGGTKVEIKR
2.54	28	A27/JK4	ETQLTQSPGTLSLS PGERVTLSC	RASQSVSNNYLA	WYQQKPGQAPR LLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDCAECYC	QQYGSSLPLT	FGGGTKVEIKR
	65	生殖細胞系	DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLHSNGYN YLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQALQTXXT	FGGGTKVEIKR
2.16	12	A3/JK4	XXXLTQSPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLHSNGYN YLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDIGLYYC	MQALQTPLT	FGGGTKVDIKR
2.45	24		XXXXTQSPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLHSNGYN YLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQALQTPLT	FGGGTKVEIKR
	66	生殖細胞系	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAPK RLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYC	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIKR
1.29	4	A30/JK4	DIQMTQSPSSLSAS IGDRVTITC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAPK RLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYC	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIKR
	67	生殖細胞系	DIVMTQTPLSSPVT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLS	WLQQRPGQPPR LLIY	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQATQFPXIT	FGQGTRLEIKR
2.17	16	A23/JK5	EIQLTQSPLSSPVT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGDT YLN	WLQQRPGQPPR LLIY	KISTRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRV ETDDVGIYYC	MQTTQIPQIT	FGQGTRLEIKR
	68	生殖細胞系	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPK LLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYC	QQSYSTPPT	FGQGTKVEIKR
2.24	20	O12/JK1	DIQLTQSPSSLSAS VGDRVTITC	RASQSIYSYLN	WYQQKPGKAPK LLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYC	QQSYSTPPT	FGQGTKVEIKR
	69	生殖細胞系	DIVMTQTPLSSPVT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLS	WLQQRPGQPPR LLIY	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQATQFPQT	FGQGTKVEIKR
1.37	8	A23/JK1	DIVMTQTPLSSTVI LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLN	WLQQRPGQPPR LLIY	MISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQATESPQT	FGQGTKVEIKR
	70	生殖細胞系	DIVMTQTPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLDSDDGN TYLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	TLSYRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQRIEFPIT	FGQGTRLEIKR
2.70	44	O1/JK5	DIVMTQTPLSLPVT PGEPASISC	RSSRSLLDSDDGN TYLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	TLSYRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQRVEFPIT	FGQGTRLEIKR
2.56	32		EIVMTQTPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLDSEDGN TYLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	TLSHRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYCC	MQRVEFPIT	FGQGTRLEIKR
2.76	48		XXXXTQCPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLLDSDDGN TYLD	WYLQKPGQSPQ LLIY	TVSYRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQRIEFPIT	FGQGTRLEIKR
	71	生殖細胞系	EIVLTQSPDFQSVT PKEKVTITC	RASQSIGSSLH	WYQQKPDQSPK LLIK	YASQSFS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL EAEDAATYYC	HQSSSLPFT	FGPGTKVDIKR
2.59	36	A26/JK3	XXXXTQSPDFQSVT PKEKVTITC	RASQSIGSRLH	WYQQKPDQSPK LLIK	YASQSFS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL EAEDAATYYC	HQSSNLPFT	FGPGTKVDIKR
	72	生殖細胞系	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAPK RLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYC	LQHNSYPXX	FGQGTKLEIKR
2.61	40	A30/JK2	DIQMTQSPSSRCAS VGDRVTITC	RASQGIRNDLA	WYQQKPGKAPK RLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSRSGTEFTLTISSL QPEDFAAYYC	LQHNSYPPS	FGQGTKLEIKR

【０１７３】

ヒト抗体の重鎖ＶＨ３－３３が、ＴＩＭ－１と首尾よく結合する抗体を産生するための生産的再構成において、高い頻度で選択された。ＴＩＭ－１に対する抗体を産生する生産的再構成におけるヒト抗体ＶＨ３－３３生殖細胞系列のいずれの変種も本発明の範囲内にある。ＴＩＭ－１結合抗体にて選択される他の重鎖Ｖ領域として、ＶＨ４－３１、ＶＨ３

－１５、ＶＨ４－６１、ＶＨ３－７およびＶＨ３－４８が挙げられる。選択される軽鎖Ｖ領域として、Ａ２７、Ａ３、Ａ３０、Ａ２３、Ｏ１２、Ｏ１およびＡ２６が挙げられる。λκＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）を用い、ラムダＶ領域を利用して抗－ＴＩＭ－１抗体を生成してもよいことが理解される。

【０１７４】

１２種の抗－ＴＩＭ－１抗体の重鎖可変ドメインの生殖細胞系の使用を表６に示す。軽鎖可変ドメインの生殖細胞系の使用を表７（後記する）に示す。

【表８】

表6. 重鎖可変ドメイン領域の生殖細胞系の使用

mAb	V 鎖	V 配列	#N's	N	D1	D1 配列	#N's	N	D2	D2 配列	#N's	N	JH	J 配列	定常領域	CDR1	CDR2	CDR3
2.16	VH3-15 (1-285)	TGTACC	5	TCAGT	D3-16 (291-296)	CGATAA	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	7	TGACGTG	JH4b (304-343)	GACTAC	G4 (344-529)	64-93	136-192	289-309
2.70	VH3-33 (1-290)	GAGAGA	0		D3-22 (291-306)	TTACTATGATAATAGT（配列番号: 73)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	15	AGACATCACTGGGGG（配列番号: 74)	JH4b (322-364)	TTTGAC	G4 (365-502)	70-99	142-192	289-330
2.59	VH4-31 (2-284)	GAGAGA	8	ATCCCCTC	D6-13 (293-309)	ATAGCAGCAACTGGTAC（配列番号: 75)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	5	TCGGG	JH4b (315-358)	CTTTGA	G4 (359-545)	61-96	139-186	283-324
2.24	VH3-33 (1-296)	GAGAGA	0		D3-22 (297-312)	TTACTATGATAATAGT（配列番号: 76)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	15	AGACATCACTGGGGG（配列番号: 77)	JH4b (328-370)	TTTGAC	G4 (371-568)	76-105	148-198	295-336
1.29	VH4-61 (1-293)	GAGAGA	5	TTATG	D1-7 (299-304)	ACTGGA	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	6	GCTTCC	JH4b (311-355)	ACTTTG	G2 (356-491)	70-105	148-195	292-321
2.61	VH3-33 (1-296)	GAGAGA	0		D3-22 (297-312)	TTACTATGATAATAGT（配列番号: 78)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	15	AGACATCACTGGGGG（配列番号: 79)	JH4b (328-370)	TTTGAC	G4 (371-534)	76-105	148-198	295-336
2.76	VH3-33 (1-281)	TGCGAG	6	GGATTT	D3-22 (288-300)	CTATGATAGTAGT（配列番号: 80)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	7	CGTTACC	JH6b (308-358)	ACTACG	G4 (359-544)	64-93	136-186	283-324
2.54	VH3-33 (1-296)	GCGAGA	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	2	TC	JH4b (299-340)	TTGACT	G4 (341-537)	76-105	148-198	295-306
1.37	VH3-7 (7-300)	GCGAGA	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	3	TGG	JH4b (304-343)	GACTAC	G2 (344-469)	82-111	154-204	301-309
2.17	VH3-48 (2-291)	TGTGCG	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	5	CGGGA	JH4b (297-340)	CTTTGA	G4 (341-538)	76-105	148-198	295-306
2.45	VH3-15 (2-286)	CCACAG	7	TCGATAA	D6-19 (294-299)	CAGTGG	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	0		JH4b (300-340)	TGACTA	G4 (341-526)	61-90	133-189	286-306
2.56	VH3-33 (1-290)	GAGAGA	0		D3-22 (291-301)	TTACTATGATA（配列番号: 81)	- N.A -	- N.A -	- N.A -	- N.A -	20	CGAGTCGGCATCACTGGGGG（配列番号: 82)	JH4b (322-364)	TTTGAC	G4 (365-527)	70-99	142-192	289-330

【表９】

表７．軽鎖可変ドメイン領域の生産細胞系の使用

mAb	VL	V 配列	軽N's	N	JL	J 配列	定常領域	CDR1	CDR2	CDR3
2.70	O1 (46-348)	TTTCCCT	0		JK5 (349-385)	ATCACC	IGKC (386-522)	115-165	211-231	328-354
2.59	A26 (1-272)	TTTACC	0		JK3 (273-310)	ATTCAC	IGKC (311-450)	58-90	136-156	253-279
2.24	Q12 (1-287)	CCCTCC	0		JK1 (288-322)	GACGTT	IGKC (323-472)	70-102	148-168	265-291
1.29	A30 (46-331)	ACCCTC	0		JK4 (332-367)	TCACTT	IGKC (368-504)	115-147	193-213	310-336
2.56	O1 (46-348)	TTTCCT	0		JK5 (349-385)	ATCACC	IGKC (386-521)	115-165	211-231	328-354
2.61	A30 (1-287)	CCCTCC	3	CAG	JK2 (291-322)	TTTTGG	IGKC (323-470)	70-102	148-168	265-291
2.76	O1 (1-290)	GTTTCC	0		JK5 (291-328)	GATCAC	IGKC (329-419)	58-108	154-174	271-297
1.37	A23 (43-344)	TCCTCA	0		JK1 (345-379)	GACGTT	IGKC (380-454)	112-159	205-225	322-348
2.17	A23 (1-302)	TCCTCA	1	A	JK5 (304-340)	ATCACC	IGKC (341-490)	70-117	163-183	280-309
2.54	A27 (1-286)	GCTCAC	4	TCCC	JK4 (291-328)	GCTCAC	IGKC (329-480)	70-105	151-171	268-297
2.16	A3 (2-290)	AACTCC	2	GC	JK4 (293-328)	TCACTT	IGKC (329-447)	61-108	154-174	271-297
2.45	A3 (1-287)	AACTCC	2	GC	JK4 (290-325)	TCACTT	IGKC (326-465)	58-105	151-171	268-294

【０１７５】

重鎖ヌクレオチド配列（Ａ）、重鎖アミノ酸配列（Ｂ）および軽鎖ヌクレオチド配列（Ｃ）を含む、モノクローナル抗体１．２９、１．３７、２．１６、２．１７、２．２４、２．４５、２．５４、２．５６、２．５９、２．６１、２．７０および２．７６の各々をコード化する配列を、コード化されたアミノ酸配列（Ｄ）と一緒に、上記した表１に要約される配列表にて提供する。特定のモノクローナル抗体２．７０をさらにサブクローンに付して、それを２．７０．２と称する。表１を参照のこと。

【０１７６】

実施例２

ＦＡＣＳによる膜結合ＴＩＭ－１タンパク質との抗体反応性

蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）分析を行って、細胞膜結合のＴＩＭ－１抗原に対する抗－ＴＩＭ－１抗体の特異性を実証し、治療薬または診断薬として用いるための好ましい抗体を同定した。分析を２種の腎臓癌の細胞系、ＡＣＨＮ（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６１１）およびＣＡＫＩ－２（ＡＴＣＣ番号：ＨＴＢ－４７）について行った。ＴＩＭ－１抗原を発現しない乳癌の細胞系、ＢＴ５４９を対照として用いた。表８は抗体２．５９．２と２．７０．２が共にＡＣＨＮおよびＣＡＫＩ－２細胞上で発現されるＴＩＭ－２抗原と特異的に結合したが、負のＢＴ５４９細胞上の抗原には結合しなかったことを示す。無関係の抗体、アイソタイプ対照（ＰＫ１６）に対して標準化された幾何平均比率を基に、ＡＣＨＮ細胞はＣＡＫＩ－２細胞よりもＴＩＭ－１タンパク質のより高い細胞表面発現を有した。

【表１０】

表 8

		幾何平均比率（負の対照に対する）		
抗体	ビン	ACHN	CAKI-2	BT549
2.59.2	1	15.2	7.7	1.4
2.70.2	6	19.4	8.8	1.8
1.29	1	17.9		1.2
2.16.1	2	7.9		1.5
2.56.2	5	12.2		1.5
2.45.1	8	4.3		1.1

【０１７７】

実施例３

抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の特異性

ＥＬＩＳＡアッセイにおいて抗－ＴＩＭ－１抗体はＴＩＭ－１タンパク質に特異的に結合したが、無関係のタンパク質には結合しなかった。４種の抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体（１．２９、２．５６．２、２．５９．２および２．４５．１）ならびにアイソタイプ対応の対照であるｍＡｂ　ＰＫ１６．３についてのＴＩＭ－１抗原（Ｖ５－ＨＩＳタグを有する）特異的結合の結果を図１に示す。Ｘ軸は上記したオーダーで使用される抗体を表し、Ｙ軸は光学密度である。これら抗体の無関係なタンパク質（これもＶ５－ＨＩＳタグを有する）との個々の結合を図２に示す。

【０１７８】

ＥＬＩＳＡプロトコル

９６－ウェルの高タンパク質結合ＥＬＩＳＡプレート（コーニング・コスター（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｃｏｓｔａｒ）カタログ番号３５９０）に、コーティングバッファー（０．１Ｍ炭酸塩、ｐＨ９．５）に希釈した５μｇ／ｍＬの濃度のＴＩＭ－１抗原（５０μＬ）を被覆し、４℃で一夜インキュベートした。ついで、該ウェルを２００－３００μＬの０．５％ツィーン－２０／ＰＢＳで５回洗浄した。次に、プレートを２００μＬのアッセイ希釈剤（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、サンジエゴ、ＣＡ、カタログ番号２６４１１Ｅ）で少なくとも１時間室温にて遮断した。ついで、抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体をアッセイ希釈剤にて７、１５、３１．３、６２．５、１２５、２５０、５００および１０００ｎｇ／ｍＬの最終濃度に希釈した。抗－Ｖ５－ＨＨＲＰ抗体を１：１０００で用い、このＥＬＩＳＡの正の対照として、Ｖ５含有ペプチドを検出した。ついで、プレートを再び上記したように洗浄した。次に、５０μＬの各抗体希釈物を適当なウェルに加え、ついで、少なくとも２時間室温でインキュベートした。プレートを再び上記したように洗浄し、ついで５０μＬの第二抗体（ヤギ抗－ヒト－ＨＲＰ）を１：１０００で加え、室温で１時間インキ

ュベートした。プレートを再び上記したように洗浄し、ついで１００μＬのＴＭＢ基質溶液／ウェル（溶液Ａ＋Ｂが１：１の割合）（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、サンジエゴ、ＣＡ、カタログ番号２６４２ＫＫ）で発現させた。最後に、５０μＬの硫酸で反応を停止させ、５５０ｎｍで矯正を行いながら、プレートを４５０ｎｍにて読み取った。

【０１７９】

実施例４

抗体配列

本明細書記載の抗体の構造を解析するために、特定のハイブリドーマの範囲外にある重鎖および軽鎖フラグメントをコード化する遺伝子をクローンした。遺伝子のクローニングおよび配列決定は以下のように行った。ポリ（Ａ）＋ｍＲＮＡをＦａｓｔ－Ｔｒａｃｋキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて免疫化ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）マウスより由来の約２ｘ１０^{5}ハイブリドーマ細胞から単離した。ランダム・プライム化したｃＤＮＡの生成をＰＣＲにより追跡した。ヒトＶＨまたはヒトＶκファミリー特異的可変ドメインのプライマー（Ｍａｒｋｓら、１９９１）または万能ヒトＶκプライマー、ＭＧ－３０（ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＡＧＣＡＧＴＣＩＧＧ）（配列番号：８３）を、ヒトに特異的なプライマー：

Ｃγ２定常領域（ＭＧ－４０ｄ；５’－ＧＣＴ ＧＡＧ ＧＧＡ ＧＴＡ ＧＡＧ ＴＣＣ ＴＧＡ ＧＧＡ－３’（配列番号：８４））；

Ｃγ１定常領域（ＨＧ１；５’ ＣＡＣ ＡＣＣ ＧＣＧ ＧＴＣ ＡＣＡ ＴＧＧ Ｃ（配列番号：８５））；または

Ｃγ３定常領域（ＨＧ３；５’ ＣＴＡ ＣＴＣ ＴＡＧ ＧＧＣ ＡＣＣ ＴＧＴ ＣＣ（配列番号：８６））またはヒトＣκ定常領域（ｈκＰ２；前に、Ｇｒｅｅｎら、１９９４にて記載されている）

と組み合わせて用いた。ハイブリドーマからのヒトＭＡｂ誘導の重鎖およびカッパ鎖の転写物の配列を上記したプライマーを用いてポリ（Ａ$^{+}$）ＲＮＡから生成されるＰＣＲ産生物を直接配列決定することにより得た。また、ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＰＣＲ産物をｐＣＲＩＩにクローニングし、両方の鎖をプリズム色素－ターミネーターシーケシングキットおよびＡＢＩ３７７シーケシング装置を用いて配列決定した。すべての配列をＭａｃ Ｖｅｃｔｏｒ ａｎｄ Ｇｅｎｅｗｏｒｋｓソフトウェアプログラムを用いて「Ｖ ＢＡＳＥ配列ディレクトリー」（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら、ＭＲＣ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、ケンブリッジ、ＵＫ）にアライメントさせることで分析した。

【０１８０】

上記した表４－７の各々において、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従ってＣＤＲドメインを測定した。Ｋａｂａｔ、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｍｄ、ベテスダ、国立衛生研究所（１９８７および１９９１））を参照のこと。

【０１８１】

実施例５

エピトープビンニング（ｅｐｉｔｏｐｅ ｂｉｎｎｉｎｇ）およびＢｉａＣｏｒｅ（登録商標）アフィニティー測定

エピトープビンニング

本明細書記載のある抗体を、２００３年８月２１日付け公開の米国特許出願公開番号２００３０１５７７３０「発明の名称：結合特性に基づく抗体の分類」に記載のプロトコルに従って「ビンニング」に付した。

【０１８２】

一次抗体にカップリングさせるのに、ＭｘｈＩｇＧコンジュゲートのビーズを調製した。必要とされる上清の容量を次式：（ｎ＋１０）ｘ５０μＬ（ここで、ｎはプレート上のサンプルの総数である）を用いて算定した。濃度が分かっている場合、０．５μｇ／ｍＬを用いた。ビーズストックをゆっくりとかき混ぜ、ついで上清にてウェル当たり各ビーズ

が２５００の濃度となるまで、または０．５ｘ１０^{5}個／ｍＬの濃度となるまで希釈し、振盪器上、暗所にて、室温で一夜、濃度が０．５μｇ／ｍＬと分かっている場合には、２時間、インキュベートした。吸引後、５０μＬの各ビーズをフィルタープレートの各ウェルに添加し、ついで１００μＬ／ウェルの洗浄バッファーを添加することで一度洗浄して吸引した。抗原および対照を各フィルタープレートに５０μＬ／ウェルにて添加し、ついでカバーして振盪器上、暗所にて１時間インキュベートさせた。洗浄工程に付した後、未知の二次抗体を一次抗体に用いたのと同じ希釈度（または既知であるならば、同じ濃度）を用いて５０μＬ／ウェルにて添加した。ついで、該プレートを振盪器上、暗所、室温で２時間インキュベートし、つづいて洗浄工程に付した。次に、５０μＬ／ウェルの１：５００に希釈されたビオチニル化ｍｘｈＩｇＧを添加し、振盪器上、暗所、室温にて１時間インキュベートさせた。洗浄工程に付した後、５０μＬ／ウェルのストレプトアビジン－ＰＥを１：１０００で加え、振盪器上、暗所、室温で１５分間インキュベートさせた。洗浄工程に付した後、各ウェルを８０μＬのブロッキングバッファーに再び懸濁させ、ルミネックスシステムを用いて読み取った。

【０１８３】

表９は生産されたモノクローナル抗体が８種のビンに属することを示す。抗体はＴＩＭ－１抗原上の少なくとも３種の異なるエピトープに結合した。

【０１８４】

ＢｉａＣｏｒｅ（登録商標）分析を用いる抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂアフィニティーの測定

ＢｉａＣｏｒｅ（登録商標）分析方法を用いて抗－ＴＩＭ－１抗体とＴＩＭ－１抗原との結合アフィニティーを測定した。この分析を、リサーチグレードＣＭ５センサーチップが備えられている、ＢｉａＣｏｒｅ（登録商標）２０００バイオセンサーを用いて２５℃で行った。通常のアミン結合法を用いてＣＭ５ＢｉａＣｏｒｅ（登録商標）チップ上に高密度のヤギαヒト抗体表面を調製した。抗体の上清を１００μｇ／ｍＬのＢＳＡおよび１０ｍｇ／ｍＬのカルボキシメチルデエキストラン含有のＨＢＳ－Ｐ泳動バッファー中にて約５μｇ／ｍＬに希釈した。ついで、２分間の接触時間、および抗体の基線を安定化させるための５分間の洗浄時間を用いて抗体を個々に別個の表面に捕獲させた。

【０１８５】

ＴＩＭ－１抗原を２９２ｎＭで各表面にわたって７５秒間注入し、つづいて３分間解離させた。対照となるフローセルからシグナルを引き、ＴＩＭ－１を注入する直前のバッファー注入の基線のドリフトを減じることにより、二重照合の結合データを得た。各ｍＡｂについてのＴＩＭ－１結合データを各表面に捕獲されたｍＡｂの量について正規化した。正規化されたドリフト修正の応答も測定した。２５℃での抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ結合の動態分析結果を以下の表９に列挙する。

【表１１】

表 9

競合的ビンおよび TIM-1特異的mAb についての K_D

ビン	抗体	BIAcore による アフィニティー(nM)
1	2.59	0.38
	1.29	3.64
2	2.16	0.79
3	2.17	2.42
4	1.37	2.78
	2.76	0.57
	2.61	1.0
5	2.24	2.42
	2.56	1.1
6	2.70	2.71
7	2.54	3.35
8	2.45	1.15

【０１８６】

実施例６

エピトープマップ作製

抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．７０．２を、ＴＩＭ－１抗原配列より設計された重複ペプチドに対する反応性について検定した。アッセイプレートにＴＩＭ－１フラグメントペプチドをコートし、対照として無関係のペプチドをコートし、またはペプチドなしで用いた。抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．７０．２をプレートに加え、インキュベートし、洗浄し、ついで結合した抗体を抗－ヒトＩｇ　ＨＲＰコンジュゲートを用いて検出した。ＴＩＭ－１に特異的でないヒト抗体、アイソタイプの対照抗体または非抗体を対照に供した。結果は、ｍＡｂ２．７０．２が、ＴＩＭ－１イムノゲン（配列番号：５０）のアミノ酸１８９－２０２に対応する、アミノ酸配列：ＰＭＰＬＰＲＱＮＨＥＰＶＡＴ（配列番号：８７）を有するペプチドと特異的に反応することを示した。

【０１８７】

ｍＡｂ２．７０．２の特異性を以下のペプチドに対して検定することでさらに限定した：

Ａ）ＰＭＰＬＰＲＱＮＨＥＰＶＡＴ（配列番号：８７）

Ｂ）ＰＭＰＬＰＲＱＮＨＥＰＶ（配列番号：８８）

Ｃ）ＰＭＰＬＰＲＱＮＨＥ（配列番号：８９）

Ｄ）ＰＭＰＬＰＲＱＮ（配列番号：９０）

Ｅ）ＰＭＰＬＰＲ（配列番号：９１）

Ｆ）ＰＬＰＲＱＮＨＥＰＶＡＴ（配列番号：９２）

Ｇ）ＰＲＱＮＨＥＰＶＡＴ（配列番号：９３）

Ｈ）ＱＮＨＥＰＶＡＴ（配列番号：９４）

Ｉ）ＨＥＰＶＡＴ（配列番号：９５）

【０１８８】

結果は、ｍＡｂ２．７０．２がペプチドＡ、Ｂ、ＣおよびＦに特異的に結合することを示し、それは抗体エピトープをＰＬＰＲＮＨＥ（配列番号：９６）に制限するものである。

【０１８９】

表１０に示されるように、エピトープの各アミノ酸残基がアラニンで置換されている合成ペプチドを造り、ｍＡｂ２．７０．２との反応性について検定した。この実験において、第３のプロリンおよびアスパラギン残基がｍＡｂ２．７０．２との結合に臨界的であると決定された。さらには、付加的なＮまたはＣ末端残基を除去したペプチドを検定することで、ｍＡｂ２．７０．２との結合が最小エピトープ：ＬＰＲＱＮＨ（配列番号：９７）

により保持されていることが示された。

【表１２】

表 10

										配列番号:	mAb 2.70.2 反応性
P	M	P	L	P	R	Q	N	H	E	89	+
P	M	P	A	P	R	Q	N	H	E	98	+
P	M	P	L	A	R	Q	N	H	E	99	-
P	M	P	L	P	A	Q	N	H	E	100	+
P	M	P	L	P	R	A	N	H	E	101	+
P	M	P	L	P	R	Q	A	H	E	102	-
P	M	P	L	P	R	Q	N	A	E	103	+
		P	L	P	R	Q	N	H	E	104	+
			L	P	R	Q	N	H	E	105	+
		P	L	P	R	Q	N	H	E	106	+
			L	P	R	Q	N	H	E	107	+

【０１９０】

実施例７

正常および腫瘍組織におけるＴＩＭ－１発現の免疫組織化学（ＩＨＣ）分析　正常および腫瘍組織種におけるＴＩＭ－１発現の免疫組織化学（ＩＨＣ）分析を当該分野にて既知の手法を用いて行った。十分にビオチニル化したヒト抗－ＴＩＭ－１抗体２．５９．２、２．１６．１および２．４５．１を分析した。ストレプトアビジン－ＨＲＰを検出するのに使用した。

【０１９１】

簡単に言えば、組織を一般的技法を用いてパラフィンを除去する操作に付し、ついで熱誘発のエピトープ回復プロセスを用いて処理して組織サンプル中の抗原エピトープを露呈させた。セクションを１０％正常ヤギ血清と一緒に１０分間インキュベートした。正常なヤギ血清溶液を排出し、拭き取って、過剰な溶液を除去した。セクションを５μｇ／ｍＬのビオチニル化した抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂと一緒に２５℃で３０分間インキュベートし、ＰＢＳで徹底的に洗浄した。ストレプトアビジン－ＨＲＰコンジュゲートと一緒に１０分間インキュベートした後、ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）の溶液をそのセクションに塗布し、免疫活性を可視化させた。アイソタイプ対照の場合、ビオチニル化した抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂの代わりに、セクションを５μｇ／ｍＬのビオチニル化したアイソタイプ適合の負の対照のｍＡｂと一緒に２５℃で３０分間インキュベートした。ＩＨＣ実験の結果を表１１および１２に要約する。

【０１９２】

組織種を０－３のスケールで等級分けし、１＋の評点は染色がアイソタイプの対照である無関係の抗体で染色される対照の組織にて観察される染色よりも上であることを示す。腎臓腫瘍および膵臓腫瘍からの対応する組織学的種を図３（ＡおよびＢ）に示す。これらの腎臓および膵臓腫瘍に加えて、頭部および頚部癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、直腸癌、食道癌、および脳腫瘍、ならびに対応する正常な組織を抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．５９．２で染色させた。抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．５９．２で染色させた場合、全体として腎臓癌組織サンプルおよび膵臓癌組織サンプルが高度に陽性であった。正常な組織では染色は認められなかった。これらの結果は、ＴＩＭ－１がこれら組織の癌のマーカーであり、癌を正常な組織と区別し、かつインビボ

でのＴＩＭ－１発現細胞を標的とするために抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂを用い得ることを示す。

表１１

抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．５９．２で検出されるＴＩＭ－１タンパク質の腎臓腫瘍の発現における免疫組織学

【表１３－１】

組織腫	細胞型	組織	スコア
１	悪性細胞	未知	０
１	他	細胞に関連せず	２
２	悪性細胞	明細胞	２
３	悪性細胞	明細胞	０
４	悪性細胞	明細胞	３
５	悪性細胞	明細胞	２（時折）
６	悪性細胞	未知	２
７	悪性細胞	明細胞	２
８	悪性細胞	明細胞	０
９	悪性細胞	明細胞	２（時折）
１０	悪性細胞	明細胞	１－２
１１	悪性細胞	未知	３（多くの場合）
１２	悪性細胞	明細胞	１－２
１２	他	細胞に関連せず	２
１３	悪性細胞	明細胞	２（時折）
１４	悪性細胞	明細胞	１－２

【表１３－２】

１５	悪性細胞	明細胞	３－４
１６	悪性細胞	未知	１－２
１７	悪性細胞	未知	４（時折）
１８	悪性細胞	未知	１－２
１９	悪性細胞	明細胞	０
２０	悪性細胞	明細胞	３－４
２１	悪性細胞	明細胞	２（時折）
２２	悪性細胞	明細胞	３
２３	悪性細胞	明細胞	２
２４	悪性細胞	未知	３－４時折
２５	悪性細胞	未知	２－３
２６	悪性細胞	未知	３
２７	悪性細胞	明細胞	２
２７	他	細胞に関連せず	２
２８	悪性細胞	未知	２
２９	悪性細胞	明細胞	２－３
３０	悪性細胞	明細胞	２
３１	悪性細胞	明細胞	２－３
３２	悪性細胞	明細胞	０
３３	悪性細胞	明細胞	０
３４	悪性細胞	明細胞	２
３４	他	細胞に関連せず	２
３５	悪性細胞	明細胞	２－３
３６	悪性細胞	明細胞	３
３７	悪性細胞	未知	３
３８	悪性細胞	明細胞	３
３９	悪性細胞	未知	２
４０	悪性細胞	明細胞	２－３

表１２
抗－ＴＩＭ－１ｍＡｂ２．５９．２での正常なヒト組織免疫学

【表１４－１】

組織	スコア	
	組織腫　１	組織腫　２
副腎皮質	０	０
副腎髄質	０	１
膀胱：平滑筋	０	０
膀胱：移行上皮	３	０
脳皮質：ブリア	０	０
脳皮質：ニューロン	０	０
乳房：上皮	０	０
乳房：ストロマ	０	０
直腸：上皮	０	０
直腸：結節腫	０	ＮＡ
直腸：炎症性コンパートメント	３－４（時折）	３（時折）
直腸：平滑筋	１（時折）	０
心臓：心臓筋細胞	０	０
腎皮質：糸球体	２－３	２
腎皮質：管状上皮	２	２－３
腎髄質：管状上皮	２	０
腎髄質：他	ＮＡ	２－３
肝臓：胆管上皮	０	０
肝臓：肝細胞	１－２	１
肝臓：クップファー細胞	０	０
肺：気道上皮	０	０
肺：肺胞マクロファージ	２（時折）－３	２－３（時折）
肺：他	３	ＮＡ
肺：肺細胞	２－３（時折）	２－３（時折）

【表１４－２】

卵巣：卵胞	２（時折）	１－２
卵巣：ストロア	１	１（時折）
膵臓：腺房上皮	０	１（時折）
膵臓：導管上皮	０	０
膵臓：ランゲルハンス島	０	０
胎盤：ストロマ	０	０
胎盤：トロブラスト	０	０
前立腺：繊維筋上皮	０	０
前立腺：腺上皮	０	０
骨格筋：筋細胞	０	０
皮膚：真皮	０	０
皮膚：表皮	０	０
小腸：上皮	０	０
小腸：結節腫	０	０
小腸：炎症性コンパートメント	０	０
小腸：平滑筋細胞	０	０
脾臓：赤脾髄	０	２（まれに）
脾臓：白脾髄	０	０
胃：上皮	０	０
胃：平滑筋細胞	０	０
精巣：ライジヒ細胞	２	１－２
精巣：精上皮	１	２
胸腺：上皮	０	０
胸腺：リンパ球	２（まれに）	２（時折）
甲状腺：濾胞上皮	０	０
扁桃：上皮	０	０
扁桃：リンパ球	３（時折）	２（時折）
子宮：子宮内膜	０	０
子宮：子宮筋層	０	０

【０１９３】

実施例８

抗体介在性毒素殺傷

当該技術分野に記載のクローン形成（ｃｌｏｎｅｇｅｎｉｃ）アッセイを用いて、一次抗体が、サポニン毒素と結合した二次抗体試薬と組み合わせて用いたときに、癌細胞死を誘導できるか否かを決定した。Ｋｏｈｌｓ ａｎｄ Ｌａｐｐｉ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，２８ （１）：１６２－５（２０００）参照。

【０１９４】

アッセイ プロトコル

ＡＣＨＮおよびＢＴ５４９細胞を、平底組織培養プレートに１ウェル当たり３０００個の細胞密度で播種した。２日目または細胞が集密度～２５％に達したときに、１００ｎｇ／ウェル 二次ｍＡｂ－毒素（ヤギ抗ヒトＩｇＧ－サポリン；Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＨＵＭ－ＺＡＰ；カタログ番号ＩＴ－２２）を添加した。次に、正の対照抗ＥＧＦＲ抗体、ｍＡｂ２．７．２、ｍＡｂ２．５９．２、またはアイソタイプ対照ｍＡｂを、各ウェルに所望の濃度（典型的には、１から５００ｎｇ／ｍＬ）で添加した。５日目に、細胞をトリプシン処理し、１５０ｍｍディッシュに移して、３７

℃でインキュベーションした。プレートを毎日調べた。１０～１２日目に、全プレートをギムザ染色し、プレート上のコロニーをカウントした。プレーティング効率を、１５０ｍｍプレートに移す前の細胞数を、最終的に形成されたコロニー数と比較して、決定した。

【０１９５】

抗原陽性ＡＣＨＮおよび抗原陰性ＢＴ５４９細胞株における生存率を、図４および図５にそれぞれ示す。本研究において、細胞毒性化学療法試薬５フルオロウラシル（５－ＦＵ）を正の対照として用い、これはほぼ完全な殺傷を誘導したが、サポリン結合ヤギ抗ヒト二次抗体単独では効果がなかった。両細胞株により発現されるＥＧＦ受容体に対して生成されたモノクローナル抗体（ＮｅｏＭａｒｋｅｒｓ　ＭＳ－２６９－ＰＡＢＸ）を用いて、一次抗体および二次抗体－サポニン結合体特異的殺傷を決定した。結果は、両細胞株が１００ｎｇ／ｍＬにおいてＥＧＦＲ　ｍＡｂ介在性毒素殺傷の影響を受けやすいことを示している。同じ用量において、抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．５９．２および抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．７０．２は共に９０％より多くのＡＣＨＮ細胞死を誘導し、一方ＢＴ５４９細胞死は０％であった。

【０１９６】

抗体毒素結合体介在性殺傷：クローン形成アッセイ

ＣＡＫＩ－１およびＢＴ５４９細胞を、平底組織培養プレートに１ウェル当たり３０００個の細胞密度で播種した。２日目または細胞が集密度～２５％に達したときに、種々の濃度（典型的には、１から１０００ｎｇ／ｍｌ）の、抗ＥＧＦＲ、抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．７．２、抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．５９．２、またはアイソタイプ対照ｍＡｂを含む非結合およびアウリスタチン（Ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）Ｅ（ＡＥ）結合ｍＡｂを、細胞に添加した。これらの抗体それぞれをＡＥと結合させた。両細胞株により発現されるＥＧＦ受容体に対して生成されたモノクローナル抗体（ＮｅｏＭａｒｋｅｒｓ　ＭＳ－２６９－ＰＡＢＸ）を正の対照として用い、これはＡＥ結合抗体により介在させる特異的殺傷を示した。５日目に、細胞をトリプシン処理し、１５０ｍｍ組織培養ディッシュに移して、３７℃でインキュベーションした。プレートを毎日調べた。１０～１２日目に、全プレートをギムザ染色し、プレート上のコロニーをカウントした。プレーティング効率を、細胞を１５０ｍｍプレートに移す前にカウントし、次に、最終的に形成されたコロニー数と比較して、決定した。

【０１９７】

抗原陽性ＣＡＫＩ－１および抗原陰性ＢＴ５４９細胞株における生存率を、図６および図７にそれぞれ示す。

【０１９８】

結果は、非結合およびＡＥ結合アイソタイプ対照ｍＡｂは、ＣＡＫＩ－１およびＢＴ５４９細胞両方の成長に影響しないことを示している。しかしながら、両細胞株は、用量に依存してＡＥ－ＥＧＦＲ　ｍＡｂ介在性毒素殺傷の影響を受けやすかった。最大用量において、両方の抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ（２．５９．２および２．７０．２）が、それらの非結合相当物と比較して、ＣＡＫＩ－１細胞死を９０％より多く誘導した。応答は用量依存性であった。同じ用量範囲において、抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．５９．２および２．７０．２共に、ＢＴ５４９細胞の生存に影響しなかった。

【０１９９】

実施例９

ヒト腫瘍異種移植成長遅延アッセイ

腫瘍成長阻害モデルを標準的試験方法に従い用いた。Ｇｅｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｒｅｐ．３：１－１０４（１９７２）参照。胸腺欠損ヌードマウス（ｎｕ／ｎｕ）に、生存ホスト由来の腫瘍細胞または腫瘍フラグメントのいずれかを移植する。具体的には、腎臓癌腫（ＣａＫｉ－１）または卵巣癌腫（ＯＶＣＡＲ）の腫瘍フラグメントを用いる。次に、これらの動物を抗ＴＩＭ－１抗体免疫毒素結合体、例えば、ｍＡｂ２．７０．２ＡＥ結合体を用いて、体重当たり１から２０ｍｇ／ｋｇの範囲の用量で、１週間に２回、２週間処置した。被検動物の腫瘍体積を評価し、無処置対照

腫瘍と比較し、これにより腫瘍成長遅延を決定する。

【０２００】

体積が１００ｍｍ^{3}に達したら、動物を無作為化し、１ケージ当たり５個体の群に個々に識別する。対象のタンパク質または抗体を、通常の経路（腹腔内、皮下、静脈内、または筋肉内）を介して２週間投与する。１週間に２回、動物を、側径器を用いて腫瘍の大きさについて評価する。個々の動物の体重を、投薬期間を通じて毎日、そしてその後は１週間に２回記録する。腫瘍体積を、式：腫瘍体積（ｍｍ^3）＝（全長×幅×高さ）×０．５３６を用いて決定する。処置群の体積決定値を、無処置腫瘍担持対照群と比較する。処置腫瘍が特定の体積に達するまでの時間差を、５００、１０００、１５００、および２０００ｍｍ^{3}について計算する。体重を、無処置腫瘍担持対照群と比較したときの変化について評価する。データは、時間に対してプロットした体積における腫瘍成長として報告する。各実験群の体重もグラフの形でプロットする。

【０２０１】

結果は、処置がマウスに十分に耐容されることを示している。抗ＴＩＭ－１　ｍＡＢＡＥ結合体を用いた処置は、確立されたＣａＫｉ－１およびＯＶＣＡＲ腫瘍の腫瘍成長を阻害する。

【０２０２】

実施例１０

抗ＴＩＭ－１抗体を用いた腎臓癌腫の処置

腎臓癌腫の処置の必要な患者に、細胞毒性化学療法剤または放射線療法剤と結合した抗ＴＩＭ－１抗体を静脈注射する。患者の経過をモニターし、抗ＴＩＭ－１抗体を、腎臓癌腫の成長を阻害するために、必要に応じてさらに投与する。かかる処置後、患者の癌腫レベルは低減される。

【０２０３】

実施例１１

ＣＤ４＋細胞上でのＴＩＭ－１タンパク質発現のＦＡＣＳ分析

単核細胞を、ＰＢＳ中に１：１希釈したヒト血液から、フィコール上での２０分間のスピンにより単離した。単核細胞を、１０００ｒｐｍにてＰＢＳ－ＭｇおよびＣａを用いて２回洗浄し、Ｍｉｌｔｅｎｙｉバッファー（ＭｉｌｔｅｎｙｉＢｉｏｔｅｃ　Ｉｎｃ．，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）；ＰＢＳ、０．５％　ＢＳＡ、５ｍＭ　ＥＤＴＡに約１０^{8}細胞／ｍＬで再懸濁した。ＣＤ４　Ｍｉｌｔｅｎｙｉビーズを１０^{7}細胞当たり２０μＬ添加し、１５分間氷上でインキュベーションした。細胞を、１０倍の過剰量のＭｉｌｔｅｎｙｉバッファーを用いて洗浄した。陽性選択カラム（タイプ　ＶＳ＋）（ＭｉｌｔｅｎｙｉＢｉｏｔｅｃＩｎｃ．，　Ａｕｂｕｒｎ，　ＣＡ）を、Ｍｉｌｔｅｎｙｉバッファー３ｍＬを用いて洗浄した。ペレット化した細胞を、Ｍｉｌｔｅｎｙｉバッファー１ｍＬ当たり１０^{8}細胞数で再懸濁し、洗浄したＶＳカラムにアプライした。次に、カラムをＭｉｌｔｅｎｙｉバッファー３ｍＬを用いて３回洗浄した。この後、ＶＳカラムを磁場から取り出し、ＣＤ４＋細胞を、カラムからＭｉｌｔｅｎｙｉバッファー５ｍＬを用いて溶出した。単離したＣＤ４＋リンパ球をペレット化し、添加剤（非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、メルカプトエタノール、グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシン）をプラスした５％　ＦＣＳ　ＤＭＥＭに１０^{6}細胞／ｍＬにて再懸濁した。１×１０^{6}個の新たに単離した休止期ＣＤ４＋Ｔ細胞を、フローサイトメトリーチューブに移し、２ｍＬ／チューブ　ＰＢＳ、１％　ＢＳＡ、および０．０５％　ＮａＮ$_3$含有ＦＡＣＳ染色バッファー（ＦＳＢ）を用いて洗浄した。細胞をスピンダウンし、上清を除去した。細胞を、ＦＳＢ中２０％　ヤギ血清を用いて、３０分間氷上でブロッキングした。細胞を上述の通り洗浄し、ＰＢＳ（２００μＬ）中の１０μｇ／ｍＬ　一次ヒト抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂまたは対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂと共に、４５分間氷上でインキュベーションし、次に洗浄した。二次ヤギ抗ヒトＰＥ結合抗体を１：５０希釈で添加し、４５分間氷上暗所に放置し、洗浄し、１％　ホルムアルデヒド含有ＰＢＳ　５００μＬに再懸濁し、フローサイトメトリー分析を行うまで４℃に保った。

【０２０４】
ＦＡＣＳ分析を行い、ヒトおよびマウス休止期ＣＤ４＋Ｔ細胞、ならびにヒト活性化およびヒト分極化（ｐｏｌａｒｉｚｅｄ）ＣＤ４＋Ｔ細胞上のＴＩＭ－１タンパク質発現を、５種類の抗ＴＩＭ－１モノクローナル抗体（２．５９．２、１．２９、２．７０．２、２．５６．２、２．４５．１）を用いて検出し、決定した。これらの分析は、新たに単離した休止期ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞はＴＩＭ－１を発現していないが、主要分画である分極化ヒトＴｈ２およびＴｈ１細胞はＴＩＭ－１を発現していることを示している。
【０２０５】
５種類の抗ＴＩＭ－１モノクローナル抗体を用いたヒトＣＤ４＋Ｔｈ２細胞上のＴＩＭ－１タンパク質発現のＦＡＣＳ分析を、表１３に示す。実験を左側の列に記載し、標識抗体を１番上の行に沿って特定する。データは蛍光強度の幾何平均値として報告する。
【０２０６】
表１３
ヒトＣＤ４＋Ｔｈ２細胞上のＴＩＭ－１タンパク質発現のＦＡＣＳ分析
【表１５】

実験	蛍光強度の幾何平均値					
	対照	抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ				
	PK16.3	1.29	2.45.1	2.56.2	2.59.2	2.70.2
休止期ヒトCD4+T細胞	4.6	4.7	5.1	6	4.9	N/A
分極化ヒトCD4+Th2細胞	8.4	22.3	42.4	564.1	22	27.8

【０２０７】
表１４は、５日間の過程にわたり、Ｔ細胞の連続刺激がＴＩＭ－１発現の増大（抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ２．７０．２により測定し、対照ＰＫ１６．３抗体と比較したもの）を生じることを示している。さらに、基質メタロプロテアーゼ阻害剤（ＭＭＰＩ）の添加は、ＴＩＭ－１発現を計れる程度には増大しなかった。このことは、受容体がこれらの実験条件下でＴ細胞上に存在しないことを示している。従って、ＴＩＭ－１タンパク質の発現および特異的抗体結合は、活性化Ｔｈ１およびＴｈ２細胞に特異的であり、言い換えると、炎症応答、特に喘息の特徴である。
【０２０８】
表１４
ＴＩＭ－１を発現している活性化Ｔ細胞の割合
【表１６】

		０日目	１日目	２日目	４日目	５日目
対照	−MMPI	1	3	3	1	1
PK16.3	+MMPI	1	2	6	2	2
TIM-1	−MMPI	1	8	１０	5	１３
2.70.2	+MMPI	1	１０	１４	１０	１９

【０２０９】
実施例１２
サイトカインアッセイ
活性化Ｔｈ１およびＴｈ２細胞によるＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、およびＩＦＮγ産生レベルを、抗ＴＩＭ－１抗体で処理した培養上清において、標準的ＥＬＩＳＡプロトコルを用いて測定した。抗ＴＩＭ－１抗体で処理したＴｈ１またはＴｈ２細胞によるサイトカイン産生を、対照ＰＫ１６．３抗体で処理したＴｈ１またはＴｈ２細

胞と比較した。さらに、次の試料を内部対照として並行して実施した：ｉ）抗ＣＤ３処理Ｔｈ１またはＴｈ２細胞（同時刺激がないので、サイトカイン産生はないと予測される）、ｉｉ）抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８刺激Ｔｈ１またはＴｈ２細胞（検出可能なサイトカイン産生を示すと予測される）、およびｉｉｉ）無処理Ｔｈ１またはＴｈ２細胞。ＣＤ４＋Ｔ細胞を上記の実施例に記載の通り単離した。次に、単離ＣＤ４＋リンパ球をスピンダウンし、添加剤（非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、メルカプトエタノール、グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシン）をプラスした５％　ＦＣＳ　ＤＭＥＭに10^6細胞／ｍＬにて再懸濁した。ファルコン（Falcon）の６ウェル非組織培養処理プレートを、抗ＣＤ３（２μｇ／ｍＬ）および抗ＣＤ２８（１０μｇ／ｍＬ）（ダルベッコＰＢＳ中計６００μＬ）を用いて一晩４℃で事前コートした。プレートをＰＢＳを用いて洗浄し、ＣＤ４＋リンパ球を、Ｔｈ２培地：添加剤、および５ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－２、５ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－４、および５μｇ／ｍＬ　抗ＩＦＮγをプラスした１０％　ＦＣＳ　ＤＭＥＭに５００，０００細胞／ｍＬにて懸濁し、次に、細胞を４～６日間、３７℃かつ５％　CO_2中、５μｇ／ｍＬ　ＴＩＭ－１タンパク質認識ｍＡｂまたはアイソタイプ一致負の対照ｍＡｂ　ＰＫ１６．３の存在下で刺激した。

【０２１０】

別の一連の実験において、ＣＤ４＋リンパ球を、５００，０００細胞／ｍＬにて、Ｔｈ１培地：添加剤、および５ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－２、５ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－１２、５μｇ／ｍＬ　抗ＩＬ－４をプラスした１０％　ＦＣＳ　ＤＭＥＭに懸濁し、４～６日間、３７℃かつ５％　CO_2にて、５μｇ／ｍＬ　ＴＩＭ－１またはアイソタイプ一致対照ｍＡｂ　ＰＫ１６．３の存在下で刺激した。細胞をＤＭＥＭ中で２回洗浄し、５μｇ／ｍＬ　ＴＩＭ－１　ｍＡｂまたは対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂの存在下、添加剤、および２ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－２をプラスした１０％　ＦＣＳ　ＤＭＥＭに懸濁（５００，０００個／ｍＬ）し、４～６日間、３７℃かつ５％　CO_2にて培養した（休止させた）。活性化と休止期の過程を、細胞のＦＡＳ介在性アポトーシスを防ぐために抗ＣＤ９５Ｌ（抗ＦＡＳリガンド）を添加して、上述の通りに少なくともさらに１回繰り返させた。一晩、５００ｎｇ／ｍＬ　抗ＣＤ３　ｍＡｂおよび５μｇ／ｍＬ　共刺激分子Ｂ７Ｈ２（Ｂ７相同体２）で事前にコートしたファルコン９６ウェル非組織培養処理プレートを洗浄し、ＴＩＭ－１　ｍＡｂ　１００μＬで処理したＴｈ１またはＴｈ２（２００，０００個）を１ウェル毎に添加した。３日間培養した後、上清を取り出し、ＩＬ－４、Ｉｌ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、およびＩＦＮγレベルをＥＬＩＳＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ　ｏｒ　Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）により決定した。

【０２１１】

以下に示す通り、抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂは、Ｔｈ１またはＴｈ２細胞による試験したサイトカインの放出を有意に阻害した（図８～１７参照）。サイトカイン産生の阻害が有意（ｐ＝.０２～.００８）である結果を、棒グラフ上アスタリスクを用いてマークする。表１５および１６は図８～１７の棒グラフを要約したものである。

【０２１２】

表１５

２人の独立したヒトドナーにおける抗ＴＩＭ－１抗体を用いたＣＤ４＋Ｔｈ１細胞でのサイトカイン阻害

サイトカイン産生の有意な阻害を示す実験を、アスタリスクを用いてマークする：ｐ＝０．０１から０．０５＊；ｐ＝０．００５から０．００９＊＊；ｐ＝０．００１から０．００４＊＊＊

【表１７】

ドナー１２＋１７		対照抗体の割合				
TH1	サイトカイン 抗TIM-1 mAb	IL-5	IL-4	IL-10	IL-13	INF γ
	2.56.2	100.17	28.49*	63.76*	86.45	93.69
	2.45.1	90.23	39.78*	83.98	96.25	100.6
	1.29	94.63	81.05	60.77**	73.95***	93.51
	2.59.2	66.62*	31.40*	68.99*	54.5***	128.12

【０２１３】

表１６

２人の独立したヒトドナーにおける抗ＴＩＭ－１抗体を用いたＣＤ４＋Ｔｈ２細胞でのサイトカイン阻害

サイトカイン産生の有意な阻害を示す実験を、アスタリスクを用いてマークする：ｐ＝０．０１から０．０５＊；ｐ＝０．００５から０．００９＊＊；ｐ＝０．００１から０．００４＊＊＊

【表１８】

ドナー１２＋１７		対照抗体の割合				
TH2	サイトカイン 抗TIM-1 mAb	IL-5	IL-4	IL-10	IL-13	INF γ
	2.56.2	112.07	103.46	93.97	86.45	88.30
	2.45.1	148.7	25.66***	55.97*	86.81	25.66*
	1.29	80.26	112.54	44.45*	48.91**	112.54
	2.59.2	23.62*	19.17**	43.86*	43.71***	19.18*

【０２１４】

異なるドナーを用いた複数の実験から得られたＴｈ２サイトカイン阻害の要約を、表１７において提供する。各実験では、２人の独立したドナー由来の全血試料から単離した精製ＣＤ４＋細胞を用いた。サイトカイン産生は、対照ＰＫ１６．３　ｍＡｂを用いて検出したサイトカイン産生の割合として報告する。各実験において用いた抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂを、一番下の列に沿って特定する。有意なサイトカイン阻害を報告する結果に、以下の表１７において下線を付す。「ＮＤ」の使用は実験が行われなかったことを示している。これらの結果は、ドナー依存性の変動を表すが、ｍＡｂ２．５９．２および１．２９が、１種またはそれ以上のＴｈ２サイトカインを再現可能にブロックすることを示している。

【０２１５】

表１７

５人の独立したヒトドナー群における抗ＴＩＭ－１　ｍＡｂ　２．５９．２および１．２９を用いたサイトカイン阻害の要約

対照ＰＫ１６．３抗体を用いて観察されるものの５０％より高い阻害を報告する実験の結果に下線を付している。

【表１９】

ドナー番号 サイトカイン	12+17	12+14	13+14	14	12
IL-4	19	626	130	ND	ND
IL-5	24	5	122	67	2
IL-10	44	83	19	45	109
IL-13	44	ND	17	100	91
	抗TIM-1 mAb2.59.2	抗TIM-1 mAb 1.29			

【０２１６】

実施例１３

抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖの構築、発現、および精製

ｍＡｂ２．７０のＶＬおよびＶＨドメインを用いて、ｓｃＦｖ構造物を生成した。抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖの配列を当該技術分野に既知の方法により合成した。

【０２１７】

抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖのヌクレオチド配列は次の通りである：

【表２０】

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGC
CGGCCATGGCCGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCC
TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGAT
GATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
CTCCTGATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTG
GCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGG
ATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCA
AGGGACACGACTGGAGATTAAACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGC
GAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTCCAGGTGCAGC
TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAA
ACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA
GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGGGGTTTGACTAC
TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGATTATAAGGACGAT
GATGACAAATAG（配列番号:108）

【０２１８】

成熟抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖのアミノ酸配列は次の通りである：

【表２１】

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSRSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLSY
RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITFGQGTRLEIKLSAD
DAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGM
HWVRQAPGKGLKWVAVIWYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDYYDNSRHHWGFDYWGQGTLVTVSSASDYKDDDDK（配列番号:109）

【０２１９】

合成したＤＮＡを、Ｅ．ｃｏｌｉでの細胞質周辺発現のためのｐＥＴ－２０ｂ（＋）発現ベクターに挿入する。細胞を成長させ、細胞質周辺タンパク質を標準的プロトコルを用いて調製した。抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖの精製を、抗ＦＬＡＧ　Ｍ２アフィニティーカラムを用いて、製造元の指示に従い行った。成熟タンパク質の予測分子量は、３０２２２．

４ダルトンである。この精製ｓｃＦｖを、後述のアッセイにおいて用い、生物学的活性について試験する。ｓｃＦｖ構造物は、シグナルペプチド（ＳＰ）、ｍＡｂ２．７０由来ＶＬ（ＶＬ１）、２５アミノ酸リンカー２０５Ｃベースのリンカー（Ｌ４）、ｍＡｂ２．７０由来ＶＨ（ＶＨ１）、およびＴａｇ（この場合、ＦＬＡＧ　ｔａｇ）を含む。他のＳＰ、リンカー、およびｔａｇ配列を利用して、本明細書記載の抗ＴＩＭ－１　ｓｃＦｖ抗体と同じ活性が得られることは、当業者にとって明らかであろう。

【０２２０】

実施例１４

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１の構築、発現および精製

【０２２１】

この治療用タンパク質の構築の基本式は下記の通りである：

ＳＰ１－ＶＬ１－Ｌ１－ＶＨ１－Ｌ２－ＶＨ２－Ｌ３－ＶＬ２－Ｔａｇ

【０２２２】

シグナルペプチドＳＰ１は、医学研究審議会（ＭＲＣ）センター、英国ケンブリッジ大学タンパク質工学からのＩｇＧカッパシグナルペプチドＶＫＩＩＩ　Ａ２７と同じである。

【０２２３】

また、他のシグナルペプチドを用いることもでき、これは当業者には明らかだろう。このタンパク質は、哺乳類の細胞から発現されるように設計される。成熟開裂タンパク質の推定分子量は、５４８３３．３ダルトンである。Ｌ１は、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３リンカーに対応し、リンカー２（Ｌ２）は、短リンカー配列：ＧＧＧＧＳに対応する。Ｌ３は１８個のアミノ酸のリンカーである。ＶＨ２は、Ｇｅｎｂａｎｋからの抗－ＣＤ３可変重鎖ドメイン（寄託番号ＣＡＥ８５１４８）に対応し、ＶＬ１は、Ｇｅｎｂａｎｋからの抗－ＣＤ３可変軽鎖ドメイン（寄託番号ＣＡＥ８５１４８）に対応する。この構築に用いられるタグは、Ｈｉｓタグであり、この新規タンパク質の精製および検出を容易にする。標準的なプロトコルを用いて、このＨｉｓタグ化タンパク質を発現し、精製し、下記するプロトコルで活性および腫瘍細胞殺滅に関して試験する。

【０２２４】

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１を含む成分のアミノ酸および核酸ナンバリングは下記の通りである：

ＳＰ：－２０～－１ａａ；－６０～－１ｎｔ
ＶＬ１：１～１１３ａａ；１～３３９ｎｔ
Ｌ１：１１４～１２８ａａ；３４０～３８４ｎｔ
ＶＨ１：１２９～２５１ａａ；３８５～７５３ｎｔ
Ｌ２：２５２～２５６ａａ；７５４～７６８ｎｔ
ＶＨ２：２５７～３７５ａａ；７６９～１１２５ｎｔ
Ｌ３：３７６～３９３ａａ；１１２６～１１７９ｎｔ
ＶＬ２：３９４～４９９ａａ；１１８０～１４９７ｎｔ
Ｔａｇ：５００～５０５ａａ；１４９８～１５１５ｎｔ

【０２２５】

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１のヌクレオチド配列は下記の通りである：

【表２２】

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
CCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGA
AACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG
ATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG
GAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGAC
ACGACTGGAGATTAAAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGG
TGGTTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGG
TATGATGGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT
CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATC
ACTGGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAG
GTGGTGGATCCGATATCAAACTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTG
GGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACAC
GATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACAT
TAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCAC
ATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGC
CTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGTCGAAGGTGGA
AGTGGAGGTTCTGGTGGAAGTGGAGGTTCAGGTGGAGTCGACGACATTCAGCTG
ACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCT
GCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCA
CCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTA
TCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCAGCAGCATG
GAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTC
ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAATAG（配列番号:110）

【０２２６】

成熟抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１のタンパク質配列は下記の通りである。

【表２３】

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSRSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLSY
RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITFGQGTRLEIKGGGG
SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGMHWVRQAPGKGL
KWVAVIWYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY
YDNSRHHWGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGY
TFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL
SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDI
QLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP
YRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK（配列番号:111）

【０２２７】

実施例１５

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ２の構築、発現および精製

【０２２８】

この治療用タンパク質の構築の基本式は下記の通りである：

ＳＰ１－ＶＬ１－Ｌ４－ＶＨ１－Ｌ２－ＶＨ２－Ｌ４－ＶＬ２－Ｔａｇ

【０２２９】

シグナルペプチドＳＰ１は、医学研究審議会（ＭＲＣ）センター、英国ケンブリッジ大

学タンパク質工学からのＩｇＧカッパシグナルペプチドＶＫＩＩＩ Ａ２７である。より多くの情報は、ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ＡＬＩＧＮＭＥＮＴＳ．ｐｈｐ？ｍｅｎｕ＝９０１を参照のこと。また、他のシグナルペプチドおよびリンカーを用いて、さらなる生物学的に活性な二重特異性単鎖抗体を得ることができる。また、実施例に記載のタンパク質は、哺乳類の細胞から発現されるように設計され、抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１と、上記基本式に示されているような異なるリンカー（最初に記載されているＬ４）を用いること、および最初の例のように、Ｈｉｓタグの代わりにＦｌａｇタグを用いること以外は同じである。

【０２３０】

成熟開裂タンパク質の推定分子量は、５８０７０．０ダルトンである。この構築に用いられるタグは、ＦＬＡＧタグであり、この新規タンパク質の精製および検出を容易にする。標準的なプロトコルを用いて、この分泌タグ化タンパク質を発現し、精製し、下記するプロトコルで活性および腫瘍細胞殺滅に関して試験する。

【０２３１】

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ２を含む成分のアミノ酸および核酸ナンバリングは下記の通りである：

ＳＰ：－２０～－１ａａ；－６０～－１ｎｔ
ＶＬ１：１～１１３ａａ；１～３３９ｎｔ
Ｌ１：１１４～１３８ａａ；３４０～４１４ｎｔ
ＶＨ１：１３９～２６１ａａ；４１５～７８３ｎｔ
Ｌ２：２６２～２６６ａａ；７８４～７９８ｎｔ
ＶＨ２：２６７～３８５ａａ；７９９～１１５５ｎｔ
Ｌ３：３８６～４１０ａａ；１１５６～１２３０ｎｔ
ＶＬ２：４１１～５１６ａａ；１２３１～１５４８ｎｔ
Ｔａｇ：５１７～５２４ａａ；１５４９～１５７２ｎｔ

【０２３２】

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ２のヌクレオチド配列は下記の通りである：

【表２４】

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
CCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGA
AACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG
ATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG
GAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGAC
ACGACTGGAGATTAAACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAA
AGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGCAGGTGCAGCTGGTGG
AGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
CGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
CAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACTCTA
TGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
TGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGGGGTTTGACTACTGGGG
CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGATATCAAACT
GCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG
CAAGACTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAG
GCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACT
AATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCC
AGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT
ACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAA
GAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGAC
CCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
AGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACC
TCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATC
GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGA
GGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAC
GTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGATTATAAGGACGATGATGACAA
ATAG（配列番号 :112）

【０２３３】

成熟抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ２のタンパク質配列は下記の通りである：

【表２５】

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSRSLLDSDDGNTYLDWYLQKP
GQSPQLLIYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITF
GQGTRLEIKLSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFIFSRYGMHWVRQAPGKGLKWVAVIWYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYDNSRHHWGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSDI
KLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYT
NYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT
TLTVSSLSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRA
SSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDA
ATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKDYKDDDDK（配列番号 :113）

【０２３４】

実施例１６

抗－ＴＩＭ－１ ｓｃＦｖ種生物学的活性

ＥＬＩＳＡ分析：

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１およびｓｃＦｖ２抗体が特異的に抗原に結合しているかどうかを確認するために、ＥＬＩＳＡ分析を行う。１μｇ／ｍｌの特異抗原（ＴＩＭ－１抗原（ＣＧ５７００８－０２）を、炭酸／重炭酸緩衝液（約ｐＨ

９．２～９．４）において一晩ＥＬＩＳＡプレートに結合させる。プレートを、Pharmingen San Diego, CA）から購入した希アッセイ緩衝液でブロックし、種々の濃度の抗－ＴＩＭ－１ ｓｃＦｖ１二重特異性抗体を室温で１時間添加する。プレートを、ＰＢＳ中０．０１％のＴｗｅｅｎ２０で洗浄し、ついで、ＨＲＰ－コンジュゲートｍＡｂを、アッセイ希釈液中の６－Ｈｉｓタグ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）またはＦＬＡＧペプチドタグ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）のいずれかに室温で６０分間添加する。ＴＭＢ基質（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で着色し、H_2SO_4で反応を停止させる。プレートを、Ａ４５０ｎｍで読み取り、Ｏ．Ｄ．値を、タンパク結合の指標として得る。

【０２３５】

ＦＡＣＳ分析

抗－ＴＩＭ－１および抗－ＣＤ３二重特異性ｓｃＦｖ１およびｓｃＦｖ２抗体の結合を、抗－ＴＩＭ－１ヒトｍＡｂｓにより認識される抗原を発現する細胞に対する抗－ＴＩＭ－１ ｓｃＦｖ抗体と同様に、ＦＡＣＳ分析により試験する。細胞（例えばＡＣＨＮ）をＰＢＳで洗浄し、１％のＢＳＡまたは１％のＦＢＳを添加した氷冷ＰＢＳからなるＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁する。ついで、再懸濁した細胞を氷上で、種々の濃度の二重特異性抗体と３０分間インキュベートする。細胞を洗浄して非結合抗体を除去する。結合した抗体を、二重特異性抗体配列に関して人工的に作られた６－ｈｉｓタグまたはＦＬＡＧ－タグを特異的に認識する第２の標識化ｍＡｂ（フィコエリトリンまたはＦＩＴＣ標識化）の結合により測定する。細胞を洗浄し、抗－タグｍＡｂの結合をＦＡＣＳ分析により分析する。抗－タグｍＡｂを加えた二重特異性ｍＡｂの結合を、抗－タグｍＡｂ単独の結合と比較する。

【０２３６】

細胞毒性分析

二重特異性抗体が、正常または腫瘍細胞を発現するＴＩＭ－１に対する標的Ｔ細胞に二重特異的でありうることにより定義されるような機能的活性を有するかどうかを確認するために、二重特異性抗体を、細胞促成アッセイで試験する。Ｔ細胞を、密度分離培地での血液の遠心分離由来の低密度細胞（特定密度１．０７７）から得る。Ｔ細胞は、末梢血単核細胞フラクション（また、Ｂ細胞、ＮＫ細胞および単球も含有する）からの異種混合物に用いることができ、または、ＭＡＣＳ分離およびネガティブまたはポジティブセレクションを用いて低密度細胞から精製することができる。アッセイにおける血液由来のＴ細胞の殺滅されたものは、インビトロで、ＰＨＡ、サイトカイン、活性化モノクローナル抗体または他のポリクローナルＴ細胞活性化の刺激剤により刺激された細胞よりも劣った細胞溶性活性を有するだろう。したがって、これらのアクチベーターは、機能的アッセイにおけるＴ細胞の活性化をさらに引き上げるのに用いられるだろう。多種の細胞毒性アッセイを行うことができる。細胞毒性アッセイにより、溶解での細胞代謝物の天然産生物、例えばＬＤＨの放出を測定する。他のアッセイは、細胞を、種々の薬剤、例えば、放射性クロム（５１Ｃｒ）、ＤＥＬＦＩＡ ＢＡＴＤＡ、ＣＳＦＥまたは同様の標識化剤で標識化することおよびこの薬剤により結合された生存細胞の放出または変化に基づく。

【０２３７】

ＤＥＬＦＩＡ細胞毒性アッセイ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ Ｌｉｆｅ および Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）は、細胞媒介細胞毒性研究に用いられるべき非放射性法を提供する。この方法は、蛍光増感リガンドのアセトキシメチルエステルを細胞にローディングすることに基づく。リガンドが細胞膜を突き抜けた後、エステル結合は、細胞内で加水分解され、親水性リガンドを形成し、これはもはや膜を通り抜けない。細胞融解の後、放出されたリガンドは、ユーロピウム溶液に導かれ、蛍光性キレートを形成する。測定したシグナルを、融解した細胞の量と直接的に関連する。標的細胞を再懸濁して、濃度を2×10^6／ｍｌとする。１０μｌのＤＥＬＦＩＡ ＢＡＴＤＡを、２ｍｌの標的細胞と一緒に、業者の指示に従ってチューブに混合した。種々の濃度のＴ細胞を、９６ウェルＵ底プレート中の固定濃度の標識化標的細胞（５０００

細胞／ウェル）に加え、３７℃で少なくとも２時間インキュベートする。プレートを約２００ｇで回転させ、ついで、２０μｌの上清を吸引し、ついで、別個のプレート中のユーロピウム溶液（２００μｌ）に加えた。プレートを室温で１５分間インキュベートし、ついで、ＳＡＦＩＲＥ（Ｔｅｃａｎ，Ｍａｅｎｎｅｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で、業者の指示に従って分析する。試験ウェルにおけるシグナルを、１００％溶解ウェル（Ｔ細胞の代わりに１０％の溶解緩衝液）および培地単独での細胞（自然放出）におけるシグナルと比較する。％特異的溶解を、下記式

％特異的溶解＝（試験－自然放出）／１００％溶解×１００

で計算する。

【０２３８】

ｓｃＦｖ構築物のＢＩＡｃｏｒｅ動力学的分析

ｓｃＦｖ構築物（モノマー、ならびに二重特異性、ＴＩＭ－１に結合する少なくとも１つのｓｃＦｖを含有する）に対するアフィニティーを決定するための動力学的測定を、本発明の全ての抗体に関して前に記載した方法を用いて測定する。ＴＩＭ－１に対するｓｃＦｖ－含有抗体タンパク質アフィニティーは、ｍＡｂのアフィニティー１．７０の１０倍の範囲内、すなわち、０．２７１～２７．１ｎＭであると予想される。

【０２３９】

実施例１７

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂのヒト卵巣癌細胞の増殖を阻害する能力

いくつかの完全なヒトモノクローナル抗体クローンを、上記した免疫法から単離し、これらのＯＶＣＡＲ－５（ヒト卵巣癌）細胞を阻害するそれらの能力を、５－ブロモ－２－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ）取り込みアッセイ（国際特許の出願番号 ＷＯ０１／２５４３３号に記載されている）を用いて分析した。

【０２４０】

ＢｒｄＵアッセイにおいて、ＯＶＣＡＲ－５癌細胞（Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、１０％のウシ胎児血清または１０％のウシ血清をそれぞれ補足した、ダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）で培養した。卵巣癌細胞株を、１０％のCO_2／空気中３７℃で集密的に増殖した。ついで、細胞を、ＤＭＥＭ中で２４時間飢餓させた。富栄養条件培地を１８時間加えた（１０μＬ／１００μＬの培養物）。ついで、ＢｒｄＵ（１０μＬ）を加え、５時間細胞とインキュベートした。ＢｒｄＵ取り込みを、業者の指示（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）に従って比色免疫学的アッセイによりアッセイした。

【０２４１】

種々のヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体の中和能力を評価した。図１８Ａ～１７Ｔに与えられた結果を、本明細書に記載の種々のヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体への曝露でのＯＶＣＡＲ５細胞中のＢｒｄＵ取り込みのレベルを比較するのを補助するため棒グラフ形態で提供する。ポジティブおよびネガティブ制御のように、ＯＶＣＡＲ５細胞を、完全培地（完全）または制限血清含有培地（飢餓）のいずれかの存在下で培養する。加えて、モノクローナル抗体ＰＫ１６．３を、ヒトＩｇＧ抗体の無関連特異性を示すネガティブ処理対照として含ませた。本明細書に記載のヒト抗－ＴＩＭ－１モノクローナル抗体を、種々の濃度を利用する対照操作と比較しながら、種々の投与量（１０～１０００ｎｇ／ｍＬ）で用いた。

【０２４２】

実施例１８

抗体コンジュゲート研究

付加的な抗体コンジュゲート研究を、抗－ＴＩＭ－１－特異性ｍＡＢｓ（１．２９および２．５６．２）およびＰＫ１６．３を含む無関連抗体とコンジュゲートした特物毒性サポリンを用いて行った（図１９Ａ～１９Ｃ）。付加的な負の対照は、抗－ＴＩＭ－１－特異性ｍＡＢ２．５６．２および無関連抗体ＰＫ１６．３を毒素無しで含む（図１９Ｄ）。４つのガン細胞株、３つの腎臓癌細胞株（ＡＣＨＮ、ＣＡＫＩおよび７８６－Ｏ）および

１つの乳癌細胞株（ＢＴ５４９）を、サポリン－抗体コンジュゲートまたは抗体単独で７２時間処理し、この後、ＢｒｄＵを２４時間にわたって増殖を観察するために加えた。結果を、腎臓癌細胞株に関して図１９Ａ～２０Ｃに、乳癌細胞株に関して図１９Ｄに記載する。３つすべての腎臓癌細胞株は、ＢｒｄＵ取り込みを適度に減少させることにより明らかなように、サポリン－ＴＩＭ－１－特異抗体コンジュゲートでの処理に感受性であった。同様の細胞株のコンジュゲートした無関係抗体での処理は、抗体依存性抗増殖効果を示す効果がわずかしかないか、あるいは全くなかった。ＢＴ５４９細胞株を用いて行った同様の研究により、ＴＩＭ－１－特異性抗体２．５６．２が、単独またはサポリンとコンジュゲートした場合に抗増殖効果を示さないことが示された。これらの研究の負の対照は、毒性効果が無くよく作用すると考えられる。

【０２４３】

実施例１９

配列

下記は、ＴＩＭ－１に対するモノクローナル抗体に関連する配列である。アミノ酸配列に関して、太字はフレームワーク領域を示し、下線はＣＤＲ領域を示し、斜体は定常領域を示す。

【０２４４】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡＢｓ１．２９

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表２６】

5’TGGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCC
TTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGT
GGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATT
GGGTTTATCTATTACACTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAG
TCTCCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGT
GACCGCTGCGGACGCGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTATGACTGGAGCTT
CCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCTCT3’（配列番号 :1）

【０２４５】

配列番号１によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表２７】

***WVLS*QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGSVSSGGYYWS**WIRQPPGKGLEWI**
GFIYYTGSTNYNPSLKS**RVSISVDTSKNQFSLKLSSVTAADAAVYYCAR**DYDWSFH
FDYWGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA*
（配列番号: 114）

【０２４６】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表２８】

5’CAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGTGACATCCAG
ATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCA
CTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG
TCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCA
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTA
CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC
ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCC3’（配列番号 :3）

【０２４７】

配列番号３によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：
【表２９】

*QLLGLLLLWFPGARC***DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITC**RASQGIRNDLG**WYQQKPG**
KAPKRLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**LQHNSYPLT**F**
GGGTKVEIKR*TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA* （配列番号 :115)

【０２４８】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ１．３７
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：
【表３０】

5'CAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTACTAACTATTGGATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATACAG
CAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACTCGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGC
CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGAGCGGTGTCGTGGAAC3' (配列番号 :5)

【０２４９】
配列番号５によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：
【表３１】

*QC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTNYWMS**WVRQAPGKGLEWVA**NI
QQDGSEKYYVDSVRG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDSAVYYCAR**WDY**WGQ**
GTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVSGVVE* （配列番号 :116)

【０２５０】
軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：
【表３２】

5'CTTCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATG
ACCCAGACTCCACTCTCCTCAACTGTCATCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCT
GCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTTGAATTGGC
TTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATATGATTTCTAACCG
GTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCAC
ACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCA
AGCTACAGAATCTCCTCAGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG
AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGGGCCTCTGTTG3' (配列番号 :7)

【０２５１】
配列番号７によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：
【表３３】

*LLGLLMLWVPGSSG***DIVMTQTPLSSTVILGQPASISC**RSSQSLVHSDGNTYLN**WLQQ**
RPGQPPRLLIYMISNRFS**GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQATE
SPQT**FGQGTKVEIKR***TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGRASV* (配列番号 :117)

【０２５２】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．１６
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表３４】

5'GAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTAAAGCCTGGGGGGTCTCTTAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGCCTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAAAGGAGAACTGATGGTGGG
ACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGAT
TCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAAACGAGGACACAGCC
GTGTATTACTGTACCTCAGTCGATAATGACGTGGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC
CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT3'（配列番号 :9)

【０２５３】
配列番号９によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：
【表３５】

XXXXEQSGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVGRIKR
RTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNNLKNEDTAVYYCTSVDNDVDY
WGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG*
VHTFPAVLQSSGL（配列番号 :118)

【０２５４】
軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：
【表３６】

5'CTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATC
TCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATT
GGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAA
TCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATATTGGTCTTTATTACTGCATGC
AAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGACATCAAAC
GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
AAAGTACAG3'（配列番号 :11)

【０２５５】
配列番号１１によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列
:
【表３７】

XXXLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGLYYCMQALQTPLTFGGGTKVDI
KR*TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ*（配列番号 :119)

【０２５６】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．１７
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表３８】

5'CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACCTATAGCATGAACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGAAGTAGT
ACTAGTACCATATACTATGCAGAGTCCCTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGCG
ACAATGCCAAGAATTCACTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGCGGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA3' （配列番号 :13)

【０２５７】

配列番号１３によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表３９】

QVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMN**WVRQAPGKGLEWVS**YIRSS
TSTIYYAESLKG**RFTISSDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR**DFDY**WGQGTL**
VTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV*
LQSSGLYSLS (配列番号 :120)

【０２５８】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表４０】

5'GAAATCCAGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCG
GCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAGACACCT
ACTTGAATTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAA
GATTTCTACCCGGTTCTCTGGGGTCCCTGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGG
ACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGACTGACGATGTCGGGATTTAT
TACTGCATGCAAACTACACAAATTCCTCAAATCACCTTCGGCCAAGGGACACGA
CTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3'
(配列番号 :15)

【０２５９】

配列番号１５によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表４１】

EIQLTQSPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGDTYLN**WLQQRPGQPPRLLIY**KIS
TRFS**GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVETDDVGIYYC**MQTTQIPQIT**FGQGTRLEIK**
R*TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG* (配列番号 :121)

【０２６０】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．２４

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表４２】

5'CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGG
GGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAA
GGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA（配列番号 :17)

【０２６１】
配列番号１７によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表４３】

QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLKWVAVIW
YDGSNKLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYDNSRH
HWGFDYWGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW*
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS（配列番号 :122)

【０２６２】
軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表４４】

5'GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGTATTTATAGTTATTTAAATTGGTATC
AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC
AAAGTGGGGTCCCATCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGT
TACAGTACCCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3'（配列番号 :19)

【０２６３】
配列番号１９によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表４５】

DIQL/MT/LQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKR*TV*
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG（配列番号 :123)

【０２６４】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．４５
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表４６】

5'CAGTCGGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGCCTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAAAGGAAAACTGATGGTGGGAC
AACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTC
AGAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGGAAACCGAGGACACAGCCGT
GTATTACTGTACCACAGTCGATAACAGTGGTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC
TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTCT3' (配列番号 :21)

【０２６５】

配列番号２１によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表４７】

XXXXXQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVGRIKR
KTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSENTLYLQMNSLETEDTAVYYCTTVDNSGDY
WGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG*
VHTFPAVLQSSGLS (配列番号 :124)

【０２６６】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表４８】

5'ACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCC
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGT
ACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCG
GGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTAC
ACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCA
AGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACG
AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCA3' (配列番号 :23)

【０２６７】

配列番号２３によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表４９】

XXXXTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEI
KR*TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL* (配列番号 :125)

【０２６８】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．５４

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表５０】

5'CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCACTAACTATGGCTTGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGATTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTCATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTCTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTACGCGAGATCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCT
GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG
TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC3' (配列番号 :25)

【０２６９】

配列番号２５によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表５１】

QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGLH**WVRQAPGKGLDWVA**VIWY
DGSHKFYADSVK**GRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCTR**DLDY**WGQG**
TLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP*
AVLQSSGLYSLS (配列番号 :126)

【０２７０】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表５２】

5'GAAACGCAGCTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGTCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACAACTACTTAGCCTGG
TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCA
GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTGTGCAGAGTGTTACTGTCAGCA
ATATGGTAGCTCACTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3' (配列番号 :27)

【０２７１】

配列番号２７によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表５３】

ETQLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQSVSNNYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSR
AT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDCAECYC**QQYGSSLPLT**FGGGTKVEIKR***T***
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWEGGITPSNRV (配列番号 :127)

【０２７２】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．５６

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表５４】

5'GTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG
GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGC
ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
TGGTATGATGGAAGTCATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTCTGCGAGAGATTACTATGATACGAGTCGG
CATCACTGGGGGTTTGACTGCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCTG
CTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTC
CGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC3
'（配列番号 :29)

【０２７３】

配列番号２９によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表５５】

*VQC***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**V
IWYDGSHKY/LYA/TDSVK**GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYSAR**DYY
DTSRHHWGFDC**WGQGTLVTVSSA***STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP*
VTVSWNSGALTSGVHTFP（配列番号 :128)

【０２７４】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表５６】

5'CAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCCAGTGAGGAAATTGT
GATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATC
TCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGAAGATGGAAACACCTATTTGG
ACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTTC
CCATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGA
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTGCTGC
ATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT
AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
TGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC3'（配列番号 :31)

【０２７５】

配列番号３１によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表５７】

*QLLGLLMLWVPGSSE***EIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLDSEDGNTYLD**WY**
LQKPGQSPQLLIYTLSHRAS**GVPDRFSGSGSGT**DFTLKISRVEAEDVGVYCC**MQR**
VEFPIT**FGQGTRLEIKR***TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD*
N（配列番号 :129)

【０２７６】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．５９

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表５８】

5’CAGTCGGGCCCAAGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCAC
TGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGATGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAG
CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACC
TTCTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTGCCATATCAGTGGACACGTCTAAGA
ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGAGAGAATCCCCTCATAGCAGCAACTGGTACTCGGGCTTTGACTGCTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCT
TCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
CT3’（配列番号 :33）

【０２７７】
配列番号３３によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表５９】

XXXXXQSGPRLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYY
SGSTFYNPSLKSRVAISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARESPHSSNWYSGF
DCWGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPRTGDGVVELRRP*
DQRRAHLPGCPTVLRTL（配列番号 :130）

【０２７８】
軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表６０】

5’ACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCAC
CTGCCGGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGGTTACACTGGTACCAGCAGAAACC
AGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCTTCTCAGGGGTC
CCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCATCAATA
GCCTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCATCAGAGTAGTAATTTACC
ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACC
ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTC3’（配列番号 :35）

【０２７９】
配列番号３５によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表６１】

XXXXTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSRLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSNLPFTFGPGTKVDIKR*TVAAP*
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL（配列番号 :131）

【０２８０】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．６１
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表６２】

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGGCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTAATAAATACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGG
GGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAA
GGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC3' (配列番号:37)

【０２８１】

配列番号３７によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表６３】

QVQLVE/QAGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMH**WVRQAPGKGLKWVA**VI
WYDGSNKY/LYTDSVK**GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR**DYYDN
SRHHWGFDY**WGQGTLVTVSSA***STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT*
VSWNSGALTRRRAHLPG (配列番号:132)

【０２８２】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表６４】

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCGGTGTGCATCCGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATGATTTAGCTTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG
CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTAGATCTGGGACAGAATTCACT
CTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGCTTATTACTGTCTCCAGC
ATAATAGTTACCCTCCCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAA
CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG3' (配列番号:39)

【０２８３】

配列番号３９によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表６５】

DIQMTQSPSSRCASVGDRVTITCRASQGIRNDLA**WYQQKPGKAPKRLIY**AASSLQ
SGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFAAYYCLQHNSYPPS**FGQGTKLEIKR***TVAA*
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS (配列番号:133)

【０２８４】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．７０

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表６６】

5'CATGTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGG
TATGATGGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT
CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATC
ACTGGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTC
CACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA3'（配列番号 :41）

【０２８５】
配列番号４１によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表６７】

*H*VQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGMHWVRQAPGKGLKWVAVI
WYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYDNS
RHHWGFDYWGQGTLVTVSSA*STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV*
SWNSGAL（配列番号 :134）

【０２８６】
軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表６８】

5'TCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCAGTGAGGATATTGTG
ATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCT
CCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGA
CTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACACGCTTTCC
TATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGAT
TTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC
ATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT
AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
TGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCT3'（配列番号 :43）

【０２８７】
配列番号４３によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表６９】

*SAPGAANALGPWISE*DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSRSLLDSDDGNTYLDWYL
QKPGQSPQLLIYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRV
EFPITFGQGTRLEIKR*TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN*
A（配列番号 :135）

【０２８８】
抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．７０．２
重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表７０】

5'CGGCCGCCTATTTACCCAGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGTGTGTAGTGGTTGT
GCAGAGCCTCATGCATCACGGAGCATGAGAAGACATTCCCCTCCTGCCACCTGCT
CTTGTCCACGGTTAGCCTGCTGTAGAGGAAGAAGGAGCCGTCGGAGTCCAGCAC
GGGAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCCGGCTGCCCATTGCTCTCCCACTCCACG
GCGATGTCGCTGGGGTAGAAGCCTTTGACCAGGCAGGTCAGGCTGACCTGGTTC
TTGGTCATCTCCTCCTGGGATGGGGGCAGGGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCT
GCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCGATGGAGGACGGGAGGCCTTTGTTGGA
GACCTTGCACTTGTACTCCTTGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTGCAGGACGGTGAGG
ACGCTGACCACACGGTACGTGCTGTTGAACTGCTCCTCCCGCGGCTTTGTCTTGG
CATTATGCACCTCCACGCCATCCACGTACCAGTTGAACTGGACCTCGGGGTCTTC
CTGGCTCACGTCCACCACCACGCACGTGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAG
AGTGTCCTTGGGTTTTGGGGGGAACAGGAAGACTGATGGTCCCCCCAGGAACTC
AGGTGCTGGGCATGATGGGCATGGGGGACCATATTTGGACTCAACTCTCTTGTCC
ACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAGGTGTAGGTCTTCGTGCCCA
AGCTGCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTGCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGACT
GTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
ACACCGTCACCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAGCCCAGGGCGGCTG
TGCTCTCGGAGGTGCTCCTGGAGCAGGGCGCCAGGGGGAAGACGGATGGGCCCT
TGGTGGAAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTAGTCAAACC
CCCAGTGATGTCTACTATTATCATAGTAATCTCTCGCACAGTAATACACAGCCGT
GTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGGAATTGTCTC
TGGAGATGGTGAATCGGCCCTTCACGGAGTCTGCATAGAGTTTATTACTTCCATC
ATACCATATAACTGCCACCCATTTCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTGGCGGACCCAG
TGCATGCCATAGCGACTGAAGATGAATCCAGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGG
GACCTCCCAGGCTGGACCACGCCTCCCCCAGACTCCACCAGCTGCACCTGACACT
GGACACCTTTTAAAATAGCCACAAGAAAAAGCCAGCTCAGCCCAAACTCCATGG
TGGTCGACT3' (配列番号 :136)

【０２８９】

配列番号１３６によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表７１】

*MEFGLSWLFLVAILKGVQC***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFIFSRYGMH**WV**
RQAPGKGLKWVAVIWYDGSNKLYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED**
TAVYYCARDYYDNSRHHWGFDY**WGQGTLVTVSSA***STKGPSVFPLAPCSRSTSESTA*
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GK (配列番号 :137)

【０２９０】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表７２】

5’AGTCGACCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC
TCCCAGATACCACCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGT
CACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGAT
AGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCT
CCACAGCTCCTGATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGG
CTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTT
CGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGCGGCCG3’（配列番号 :138）

【０２９１】

配列番号１３８によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表７３】

*METPAQLLFLLLLWLPDTTG***DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC**RSSRSLLDSDDGNTY
LD**WYLQKPGQSPQLLIY**TLSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY**
CMQRVEFPIT**FGQGTRLEIKR***TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ***
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC（配列番号 :139）

【０２９２】

抗－ＴＩＭ－１ ｍＡｂ２．７６

重鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表７４】

5’GAGCAGTCGGGGGGCGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGGGATTTCTATGATAGTAGTCGTTACCACTACGGTATGGACGTCT
GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCG
TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TCT3’（配列番号 :45）

【０２９３】

配列番号４５によりコードされる、重鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表７５】

XXXXEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMY**WVRQAPGKGLEWVA**VIWY
DGSNKYYADSVK**GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**DFYDSSRYH
YGMDV**WGQGTTVTVSSA***STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN*
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLS（配列番号 :140）

【０２９４】

軽鎖可変領域および定常領域の一部のヌクレオチド配列：

【表７６】

5'ACTCAGTGTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCC
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACT
GGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGGTTTCCTA
TCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTC
ACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATG
CAACGTATAGAGTTTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACCCGACTGGAGATTAAA
CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA3' (配列番号 :47)

【０２９５】
配列番号４７によりコードされる、軽鎖可変領域および定常領域の一部のアミノ酸配列：

【表７７】

XXXXTQCPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYT
VSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFPITFGQGTRLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN (配列番号 :141)

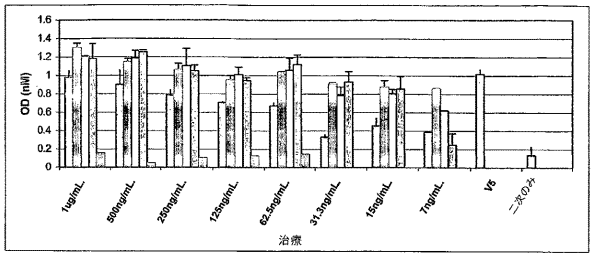
【０２９６】
本発明の具体的態様
（１）　Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその結合フラグメント、
（２）　ＴＩＭ－１が配列番号：５４に示されるアミノ酸配列を含む、（１）の抗体、
（３）　モノクローナル抗体である、（１）の抗体、
（４）　結合フラグメントがＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$またはＦｖフラグメントを含む、（１）の抗体、
（５）　単鎖抗体である、（１）の抗体、
（６）　医薬上許容される担体または希釈剤と組み合わされている、（１）の抗体または結合フラグメント、
（７）　治療剤にコンジュゲートしている、（１）の抗体または結合フラグメント、
（８）　治療剤が毒素である、（７）の抗体または結合フラグメント、
（９）　治療剤が放射性同位元素である、（７）の抗体または結合フラグメント、
（１０）　治療剤が化学療法剤である、（７）の抗体または結合フラグメント、
（１１）　ＴＩＭ－１に結合する抗体と結合競合する、ヒト抗体またはその結合フラグメント、
（１２）　（１）の抗体またはその結合フラグメントを産生する、ハイブリドーマ細胞株、
（１３）　（１）の抗体または結合フラグメントをコードする遺伝子を含む、形質転換細胞、
（１４）　チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である、（１３）の形質転換細胞、
（１５）　ＴＩＭ－１の発現に関連する細胞増殖の阻害方法であって、ＴＩＭ－１を発現する細胞を、Ｔ細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）に特異的に結合する有効量のヒト抗体またはその結合フラグメントで処理することを含む方法、
（１６）　インビボで行われる、（１５）の方法、
（１７）　哺乳類において行われる、（１６）の方法、
（１８）　哺乳類がヒトである、（１７）の方法、
（１９）　哺乳類が上皮細胞増殖を含む癌にかかっている、（１７）の方法、
（２０）　肺、直腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌である、（１９）の方法、
（２１）　腎臓癌の有効な治療法であって、腎臓癌治療の必要がある動物を同定し、該動

物へ治療上有効量の（１）の抗体を投与することを含む方法、
（２２）　卵巣癌の有効な治療法であって、卵巣癌治療の必要がある動物を同定し、該動物へ治療上有効量の（１）の抗体を投与することを含む方法、
（２３）　容器、容器に入っている組成物、および組成物をＴＩＭ－１の過剰発現に特徴づけられる癌の治療に用いることができるということを示す添付文書またはラベルを含む製品であって、該組成物が（１）の抗体または結合フラグメントを含む、製品、
（２４）　肺、直腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌である、（２３）の製品、
（２５）　肺、直腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌をスクリーニングするために、哺乳類の組織または細胞中のＴＩＭ－１を検出するためのアッセイキットであって、ＴＩＭ－１が肺、直腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌によって発現される抗原であり、抗原タンパク質に結合する抗体および抗原抗体反応を示すための手段を含むキット、
（２６）　モノクローナル抗体である、（２５）のアッセイキット、
（２７）　抗原に結合する抗体が標識されている、（２５）のアッセイキット、
（２８）　非標識一次抗体である（２５）のアッセイキット、および反応が抗免疫グロブリンである標識二次抗体を含むことを示すための方法、
（２９）　抗原に結合する抗体が、蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透過性物質から成る群から選択されるマーカーで標識されている、（２７）のアッセイキット、
（３０）　二次抗体が、蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透過性物質から成る群から選択されるマーカーで標識されている、（２８）のアッセイキット、
（３１）　配列番号：８７のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、単離されたヒト抗体またはその結合フラグメント、
（３２）　ＴＩＭ－１に結合し、またＶＨ３－３３生殖系列の遺伝子でコードされる、単離されたヒト抗体、および
（３３）　抗体が10^{-7}ないし10^{-14}Ｍの間のＫｄでＴＩＭ－１に結合する、（３２）の単離されたヒト抗体。
【０２９７】
引用文献の組み入れ
本明細書に記載の、特許、特許出願、文書、テキストブック等を含むすべての引用文献およびそれに記載された引用文献は、ここに出典明示することにより全体を本明細書に組み入れる。
【０２９８】
均等物
本発明の好ましい具体例を説明し、記載するが、本発明は当業者により適切であるように改変および修飾されることが可能であり、したがって、示した正確な用語にだけでなく、種々の使用法および条件に本発明を適合させるために生じうる変化および変法にもまた限定されるものではないことは理解されるべきである。したがって、かかる変化および変法も均等物の全範囲内であり、したがって、特許請求の範囲内に含まれる。
【０２９９】
本発明およびその製造および使用方法およびプロセスは、これらに関連するすべての当業者が同じように製造および利用できるように、完全、明確、簡潔および正確な用語で記載されている。

【図１】

Figure 1

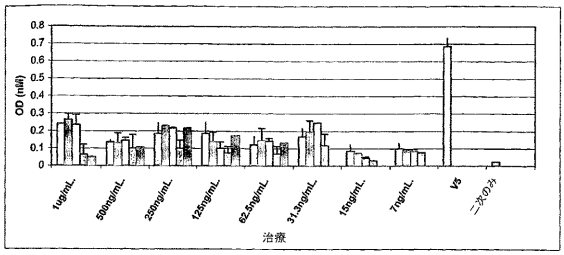
TIM 抗原 に対する抗－TIM-1mAbs 1.29, 2.56.2, 2.59.2 および 2.45.1 の ELISA アッセイ



【図２】

Figure 2

無関係なタンパク質 に対する抗－TIM-1mAbs 1.29, 2.56.2, 2.59.2 および 2.45.1 の ELISA アッセイ



【図３Ａ】

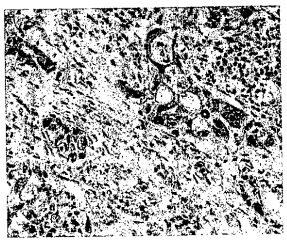
Figure 3A

腎細胞癌

【図３Ｂ】

Figure 3B

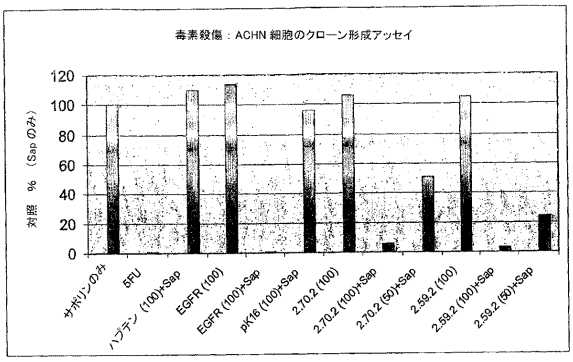
膵臓癌



【図４】

Figure 4

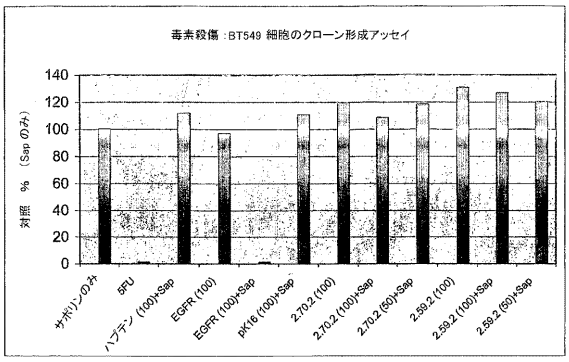
ACHN 腎臓癌細胞株において毒素殺傷に仲介される抗－TIM－１モノクローナル抗体の
クローン形成アッセイ結果



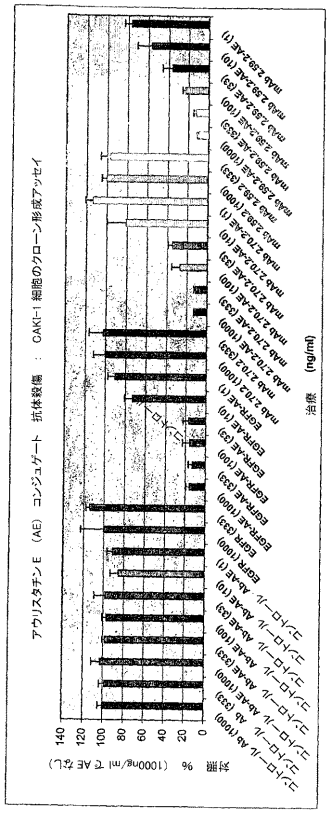
【図５】

Figure 5

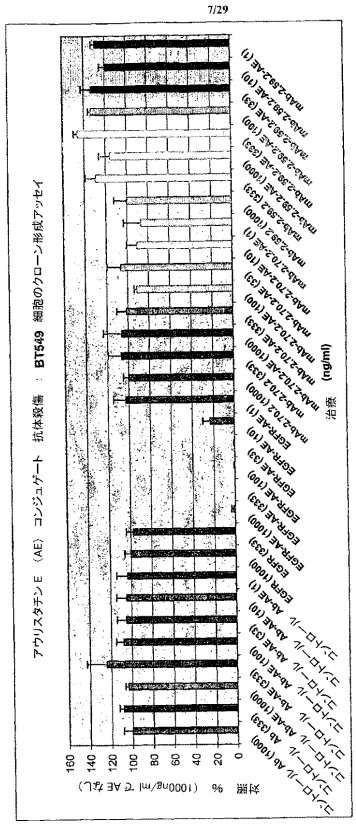
BT549 乳腺 癌細胞株において毒素殺傷に仲介される抗－TIM－１モノクローナル抗体の
クローン形成アッセイ結果



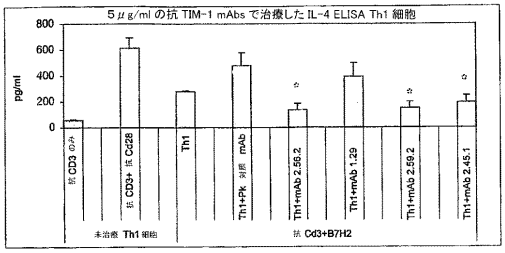
【図６】



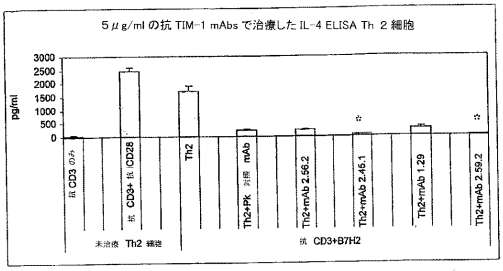
【図７】



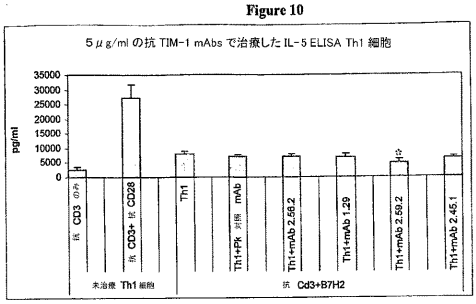
【図８】



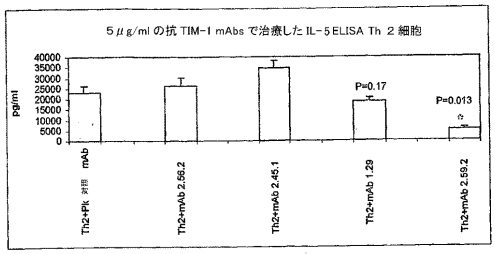
【図９】



【図１０】

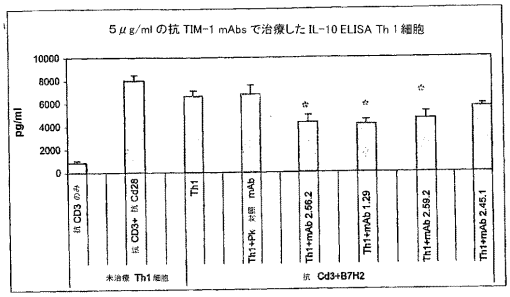


【図１１】



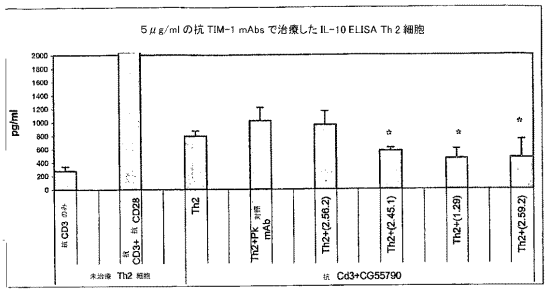
【図１２】

Figure 12



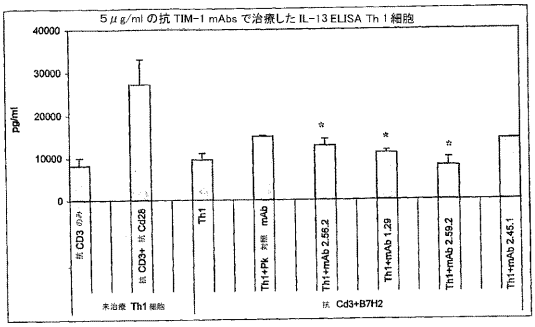
【図１３】

Figure 13



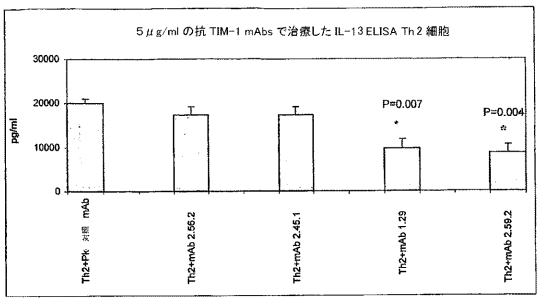
【図１４】

Figure 14



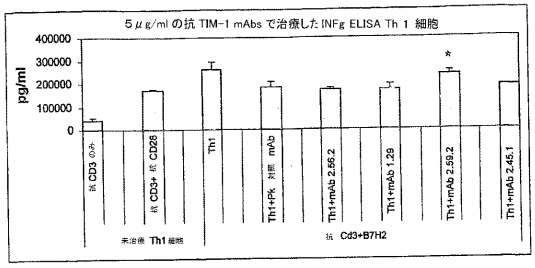
【図１５】

Figure 15



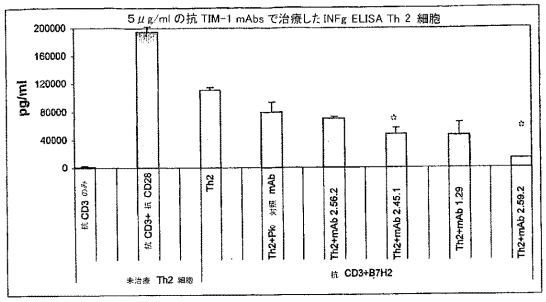
【図１６】

Figure 16



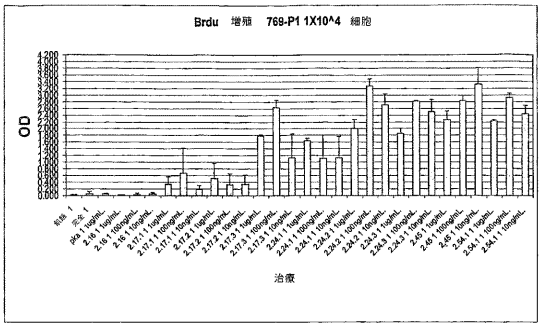
【図１７】

Figure 17



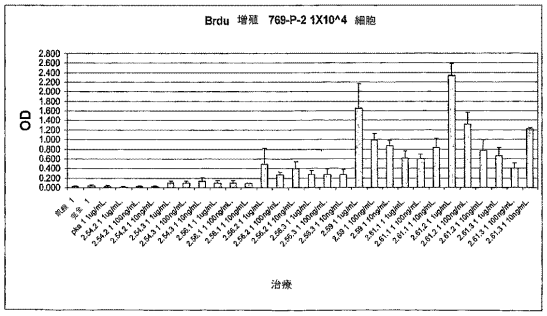
【図１８Ａ】

Figure 18A



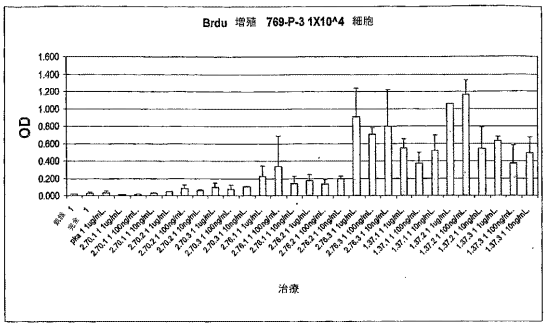
【図１８Ｂ】

Figure 18B



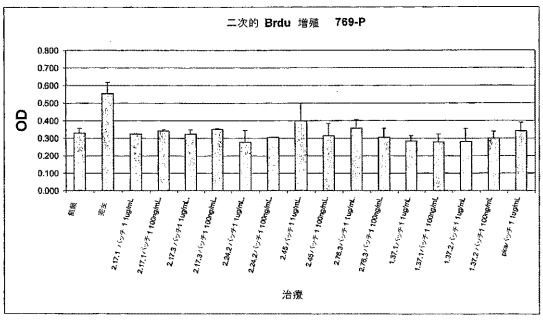
【図１８Ｃ】

Figure 18C



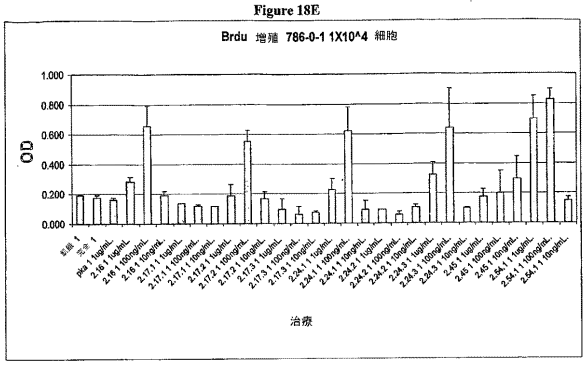
【図１８Ｄ】

Figure 18D



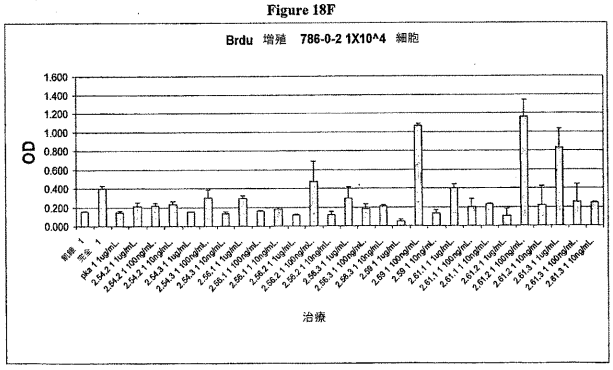
【図１８Ｅ】

Figure 18E



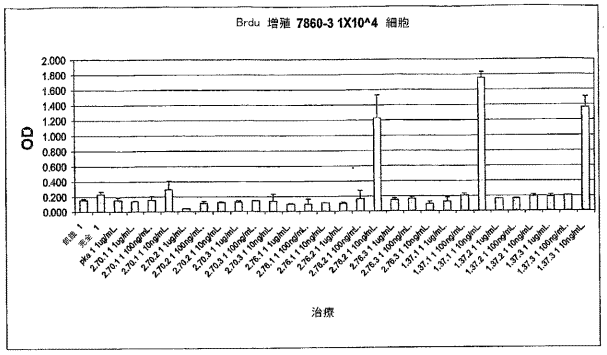
【図１８Ｆ】

Figure 18F



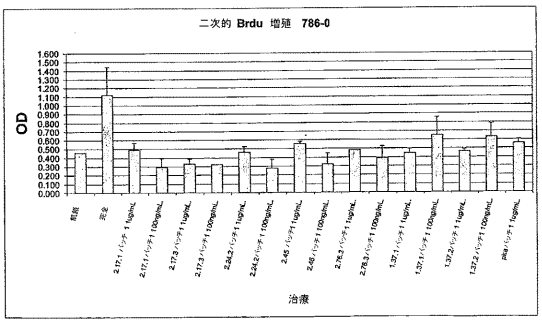
【図１８Ｇ】

Figure 18G



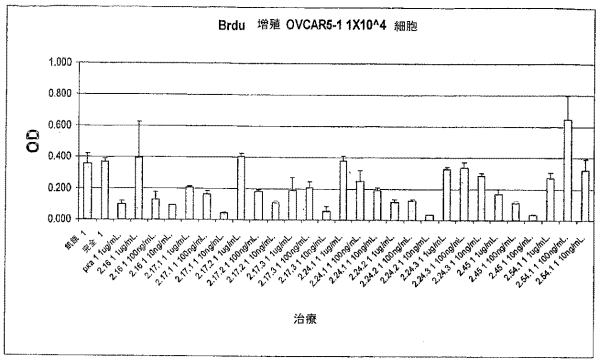
【図１８Ｈ】

Figure 18H



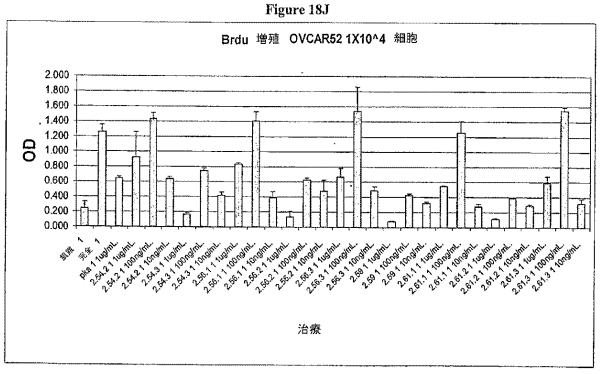
【図１８Ｉ】

Figure 18I



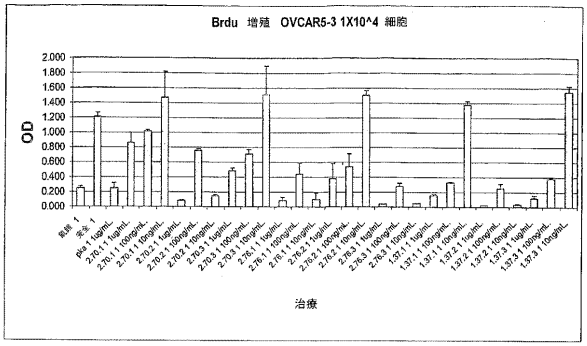
【図１８Ｊ】

Figure 18J



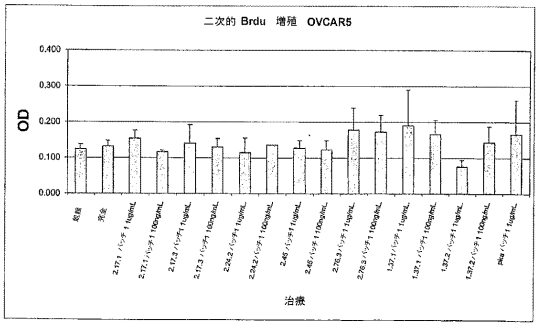
【図１８Ｋ】

Figure 18K



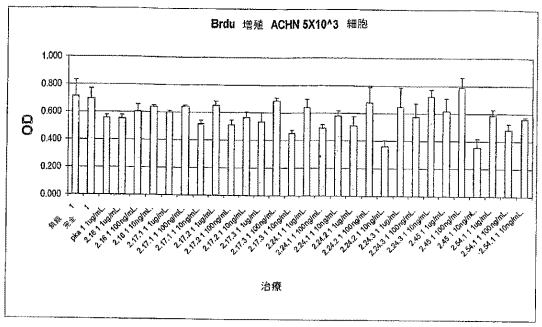
【図１８Ｌ】

Figure 18L



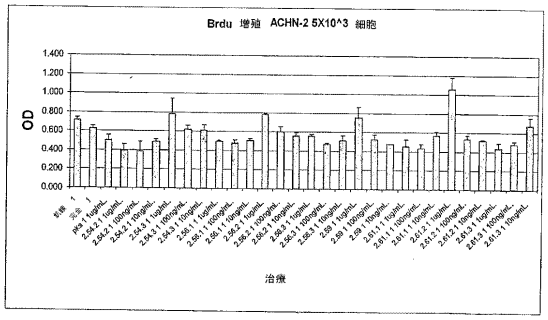
【図１８Ｍ】

18M



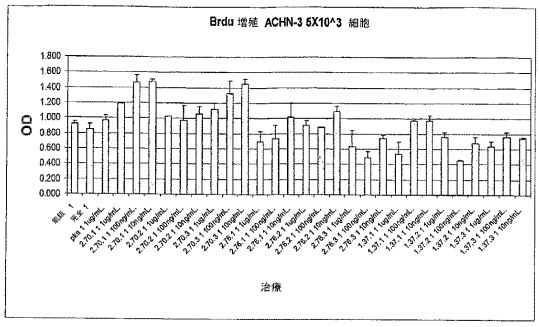
【図１８Ｎ】

18N



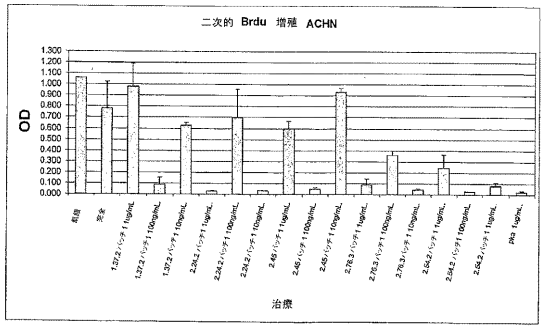
【図１８Ｏ】

18O



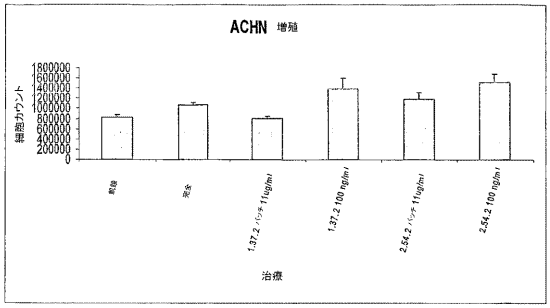
【図１８Ｐ】

18P



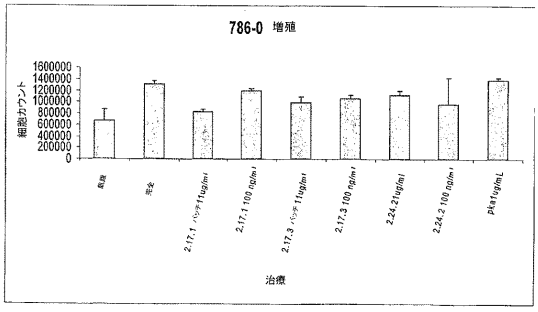
【図１８Ｑ】

18Q



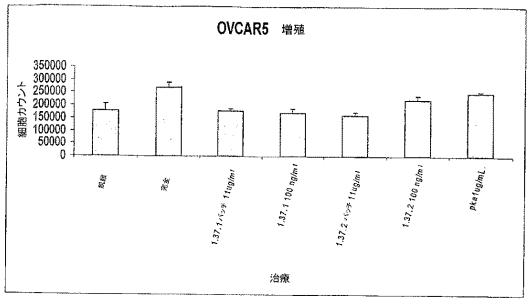
【図１８Ｒ】

18R



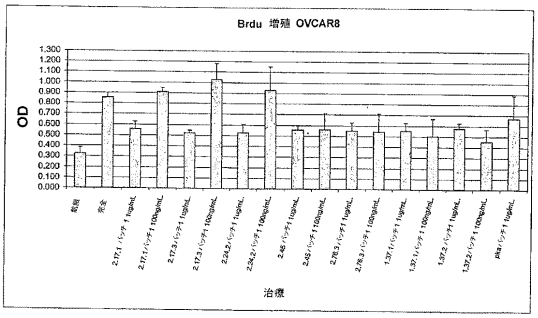
【図１８Ｓ】

18S



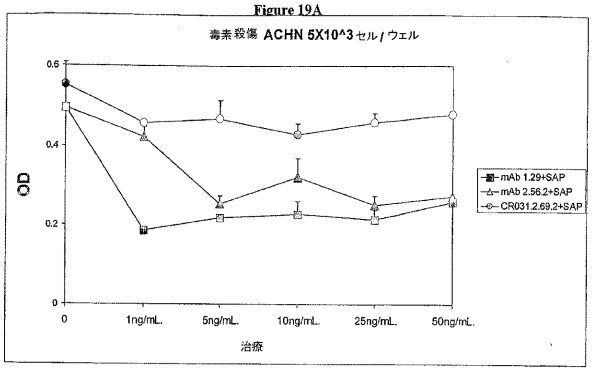
【図１８Ｔ】

18T



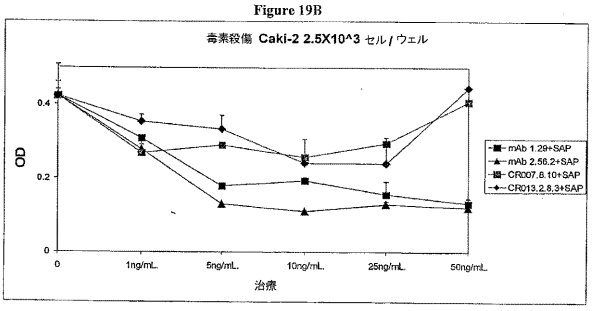
【図１９Ａ】

Figure 19A



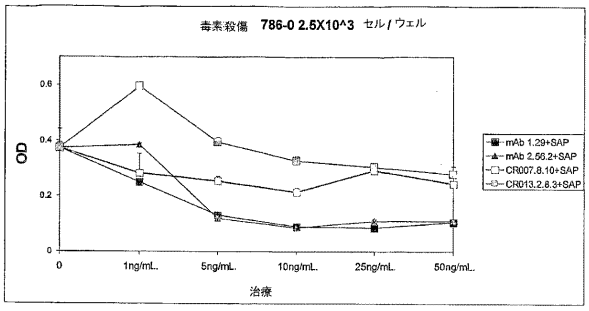
【図１９Ｂ】

Figure 19B



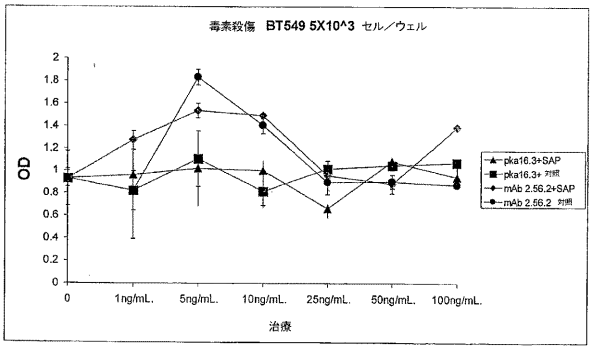
【図１９Ｃ】

Figure 19C



【図１９Ｄ】

Figure 19D



【配列表】
2018150305000001.app

フロントページの続き

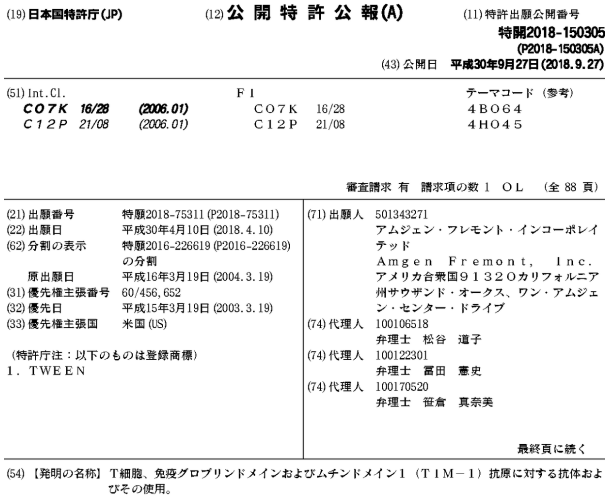
(72)発明者　グレゴリー・エム・ランデス
アメリカ合衆国９４５５０カリフォルニア州リバーモア、ベッタ・ドライブ１６０３番
(72)発明者　フランシーン・チェン
アメリカ合衆国９４１１６カリフォルニア州サンフランシスコ、３１アベニュー２６６０番
(72)発明者　ビンヤム・ベザベー
アメリカ合衆国９４６１０カリフォルニア州オークランド、ナンバー１０５、パーキンス・ストリート３１４番
(72)発明者　イアン・フォルツ
カナダ、ブイ６ジェイ・４エス３、ブリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・１アベニュー２０３－１５１０番

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01 DA05
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74
GA26

专利名称(译)	抗T细胞，免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域1（TIM-1）抗原的抗体及其用途。		
公开(公告)号	JP2018150305A	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2018075311	申请日	2018-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	安进框架蒙特公司 艾默根佛蒙特有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进·フレモント·苹果公司		
[标]发明人	グレゴリーエムランデス フランシーンチェン ビンヤムベザベー イアンフォルツ		
发明人	グレゴリー·エム·ランデス フランシーン·チェン ビンヤム·ベザベー イアン·フォルツ		
IPC分类号	C07K16/28 C12P21/08 A61K39/395 A61K51/00 C07K16/46 C12N5/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P13/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P29/00 C07K16/28 C07K16/2803 C07K16/2809 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/50 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K51/1039 C07K2317/33 G01N33/574 G01N2333/70503		
FI分类号	C07K16/28 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	富田健二		
优先权	60/456652 2003-03-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与抗原TIM-1结合的抗体和使用这种抗体。结合所述抗原TIM-1 A完全人单克隆抗体提供，其包括那些分子的多核苷酸和氨基酸序列中分离编码重链和轻链免疫球蛋白分子，特别是框架区（FR）和/或补充性别决定区（CDR'S），尤其是在向CDR3至FR4或CDR1无无FR1中，提供对应于邻近所述重和轻链的序列的序列。



(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2018-150305 (P2018-150305A)

(43)公開日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08		4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 88 頁）

(21)出願番号 特願2018-75311(P2018-75311)
(22)出願日 平成30年4月10日(2018.4.10)
(62)分割の表示 特願2016-226619(P2016-226619)の分割
原出願日 平成16年3月19日(2004.3.19)
(31)優先権主張番号 60/456,652
(32)優先日 平成15年3月19日(2003.3.19)
(33)優先権主張国 米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
1．TWEEN

(71)出願人 501343271
アムジェン・フレモント・インコーポレイテッド
Amgen Fremont, Inc.
アメリカ合衆国９１３２０カリフォルニア州サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ
(74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(74)代理人 100170520
弁理士 笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】T細胞、免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン１（ＴＩＭ－１）抗原に対する抗体およびその使用。