

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-528721

(P2007-528721A)

(43) 公表日 平成19年10月18日(2007.10.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
CO7K 16/40 (2006.01)	CO7K 16/40	4B063
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-523367 (P2006-523367)	(71) 出願人	504326804 ダイアックス コーポレイション アメリカ合衆国, 02139, マサチュー セッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 300番地
(86) (22) 出願日	平成16年8月12日 (2004.8.12)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月28日 (2006.3.28)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/026148	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02005/019270	(72) 発明者	マディソン, エドウィン エル. アメリカ合衆国 カリフォルニア 941 16, サン フランシスコ, クインタ ラ ストリート 745
(87) 国際公開日	平成17年3月3日 (2005.3.3)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/495,005		
(32) 優先日	平成15年8月14日 (2003.8.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/520,164		
(32) 優先日	平成15年11月14日 (2003.11.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 エンドセリアーゼ-2リガンド

(57) 【要約】

本開示は、とりわけ、エンドセリアーゼ-2 (ET2) に結合するタンパク質、例えば、高い親和性および選択性でET2を阻害する免疫グロブリンを提供する。ET2結合タンパク質は、血管新生関連障害を含む種々の障害を治療するために使用され得る。1つの態様において、本発明は、ET2 (本明細書ではET2リガンドまたはET2-結合リガンドともいう) に結合するタンパク質リガンドを特徴とする。典型的には、このリガンドは、天然には存在していない。1つの実施形態において、このタンパク質リガンドは、重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。例えば、このリガンドは、抗体または全長抗体の抗原結合フラグメント (本明細書では抗ET2抗体ともいう) である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列および軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む単離されたタンパク質であって、ここで、

（1）該第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列および第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が、ヒトエンドセリナーゼ-2（ET2）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し；かつ

（2）該タンパク質が以下の特徴：

（a）該タンパク質が300nM未満の阻害定数（ K_i ）でET2を阻害する；

（b）該HC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のLC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である1つ以上のCDRを含む；

（c）該LC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のHC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である1つ以上のCDRを含む；

（d）該LC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のLC可変ドメインと少なくとも85%同一である；

（e）該HC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のHC可変ドメインと少なくとも85%同一である；および

（f）該タンパク質が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9によって結合されるエピトープと重複するエピトープに結合する、のうちの1つ以上を有する、タンパク質。

【請求項 2】

前記タンパク質が、ET2活性部位に結合する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 3】

前記タンパク質が、ET2酵素活性を阻害する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記タンパク質が、インビボで血管新生の部位に蓄積する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記タンパク質が、血管基底膜のタンパク質分解を阻害する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記タンパク質が、インビトロまたはインビボで血管新生を阻害する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記HC可変ドメイン配列およびLC可変ドメイン配列が、同じポリペプチド鎖の成分である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記HC可変ドメイン配列およびLC可変ドメイン配列が、異なるポリペプチド鎖の成分である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記タンパク質が、全長抗体である、請求項1に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記抗体がヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記タンパク質が、ヒト抗体フレームワーク領域を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記タンパク質が、Fcドメインを含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記HC可変ドメイン配列が配列番号89を含み、前記LC可変ドメイン配列が配列番号90を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記タンパク質が、SCIDマウスモデルにおいて腫瘍増殖を減少する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

ET2 に特異的に結合するタンパク質を同定する方法であって、該方法は：

ET2 抗原を提供する工程；

ディスプレイライブラリーを提供する工程；

ET2 抗原に特異的に結合する、該ライブラリー中に存在するメンバーを同定する工程であって、ここで該ライブラリーの各メンバーは、その表面上に異種タンパク質成分を提示し、各メンバーは該異種タンパク質成分をコードする核酸を含み、該異種タンパク質成分は多様なタンパク質成分のセットのメンバーである、工程；および

該同定されたメンバーから核酸分子を単離する工程であって、ここで、該核酸分子がET2 抗原に特異的に結合するポリペプチドをコードする、工程を包含する、方法。

【請求項 17】

前記ライブラリーがファージライブラリーである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記同定されたファージが、ET2 に結合する競合リガンドを使用して溶出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

サンプル中のエンドセリアーゼまたはエンドセリアーゼ活性を検出する方法であって、該方法は、請求項 1 に記載のタンパク質とサンプルを接触させる工程、および標識を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 20】

ET2 発現細胞の活性を調節する方法であって、該方法は、請求項 1 に記載のタンパク質とET2 発現細胞を接触させ、それによってET2 発現細胞の活性を調節する工程を包含する、方法。

【請求項 21】

前記ET2 発現細胞は、ヒト被験体におけるものである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記タンパク質が、ET2 発現細胞の基質への結合を妨害する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記細胞が癌細胞である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

タンパク質分解を調節する方法であって、該方法は、基質のタンパク質分解を阻害するために十分な量で請求項 1 に記載のタンパク質を与える工程を包含する、方法。

【請求項 25】

前記基質が、増殖促進因子 (pro-growth factor) または血管新生促進

10

20

30

40

50

因子 (p r o - a n g i o g e n i c f a c t o r) である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記タンパク質分解の調節が、血管新生および/または細胞増殖を減少する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

細胞を死滅させるかまたは細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を死滅させるかまたは該細胞の増殖を阻害するために十分な量で、該細胞を請求項 1 に記載のタンパク質と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 2 8】

前記細胞が癌細胞である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

被験体においてエンドセリナーゼを検出する方法であって、該方法は、検出可能な標識をさらに含む請求項 1 に記載のタンパク質を被験体に投与する工程；および該被験体において該標識を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 3 0】

被験体においてエンドセリナーゼの活性を調節する方法であって、該方法は、エンドセリナーゼ活性の減少の必要がある被験体を同定する工程；および該被験体において E T 2 活性を調節するために有効な量で、請求項 1 に記載のタンパク質を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 1】

前記被験体がヒトである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記タンパク質が、別の処置、または抗癌剤および/もしくは抗血管新生剤から選択される薬剤と組み合わせて投与される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

被験体における望ましくない血管新生によって特徴付けられる障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有するかまたは該障害に対する素因を有する被験体に、請求項 1 に記載されるタンパク質を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 4】

前記障害が、関節リウマチ、乾癬、糖尿病網膜症、翼状片の再発のような眼の障害、瘢痕エキシマレーザー手術および緑内障濾過手術、心臓血管障害、慢性炎症性障害、創傷修復、循環障害、クレスト症候群、皮膚科学的障害、および癌からなる群より選択される障害である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、または配列番号 2 4 に対して少なくとも 8 0 % 同一である配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 3 6】

請求項 1 に記載の第 1 の免疫グロブリンドメイン含有タンパク質および/または第 2 の免疫グロブリンドメイン含有タンパク質を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の核酸配列を含む、ベクター。

【請求項 3 8】

請求項 3 6 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

(関連出願の相互参照)

本出願は、2003年8月14日に提出された米国出願シリアル番号60/495,005、および2003年11月14日に提出された同60/520,164に対する優先権を主張し、これら双方の内容は、その全てが参照として本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

(背景)

血管新生は、既存の血管から新規な分枝を出芽することによって新規な血管を産生する生物学的なプロセスである。血管新生は正常な発生および増殖のために必須であるが、これは厳密に調節された状況下以外では成人期においては起こることはまれである(例えば、創傷治癒;例えば、Mosesら、Science, 248:1408-1410, 1990)。血管新生はまた、癌などの多数の疾患において起こり、ここでは、新規な血管が、原発性腫瘍と転移性腫瘍の両方の成長および増殖を支持するために形成される。

10

【0003】

血管は、基底膜によって取り囲まれた内皮細胞を含む。血管新生の最初の段階の1つは、そこを通過して内皮細胞が新規な血管の出芽を形成する膜における切れ目を形成するために、内皮細胞によって産生されるタンパク質分解酵素による基底膜の分解である。この段階は以下のようにして開示され得る。第1に、プラスミノゲン活性化因子(PA)-プラスミン系の成分が、血管新生の部位において高濃度のプラスミンおよび活性マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)を生じるプロテアーゼカスケードを活性化する。この増加したタンパク質分解活性は、細胞外マトリックス(ECM)および血管基底層の侵襲をもたらす。ECM分解生成物の放出は、内皮細胞の走化性をもたらす。

20

【0004】

多数の病理学的条件が望ましくない血管新生と関連している。例えば、腫瘍は、最小サイズを超えて増殖し転移するために血管新生を誘導し得る(HanahanおよびFolkman Cell 1996, 86:353-64)。腫瘍発生は、血管新生因子、最も顕著には血管内皮増殖因子(VEGF)の放出の増加と関連する(Brown L Fら、Exs 1997, 79:233-69)。望ましくない血管新生によって特徴付けられる他の障害には、例えば、組織炎症、関節炎、糖尿病性網膜症、および網膜の新血管新生による黄斑変性が含まれる(例えば、Folkmanら、Science, 235:442-447, 1987を参照のこと)。

30

【0005】

エンドセリナーゼは、細胞、特に内皮細胞上で発現される膜プロテアーゼのクラスである。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(要旨)

1つの態様において、本発明は、エンドセリナーゼ-2(ET2)(本明細書ではET2リガンドまたはET2-結合リガンドともいう)に結合するタンパク質リガンドを特徴とする。典型的には、このリガンドは、天然には存在していない。1つの実施形態において、このタンパク質リガンドは、重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。例えば、このリガンドは、抗体または全長抗体の抗原結合フラグメント(本明細書では抗ET2抗体ともいう)である。

40

【0007】

1つの実施形態において、ET2リガンドは、高い親和性および特異性でヒトET2に結合し、従って、インビボおよびインビトロにおいて診断剤、予防剤、または治療剤として使用され得る。例えば、リガンドは、ET2に特異的に結合する。本明細書において使用される場合、「特異的結合」とは、(1) 1×10^{-7} Mよりも良好な(すなわち、数次的にはこれよりも小さな)親和性(K_d)でET2、例えば、ヒトET2に結合するこ

50

と、および(2) ET2以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)に結合するその親和性よちも少なくとも2倍、10倍、50倍、100倍またはより良好(より小さな K_d)である親和性でET2、例えば、ヒトET2に優先的に結合することをいう。

【0008】

1つの実施形態において、このリガンドは、ET2の活性、例えば、ET2のタンパク質分解活性を調節する。1つの実施形態において、このリガンドはET2を阻害する。例えば、このリガンドは、5 nM、500 pM、200 pM、150 pM、100 pM、92 pM、または75 pMよりも良好な K_i (すなわち、数字的にはそれらよりも小さい)、例えば、50 nMと1 pMとの間、または200 pMと5 pMとの間の K_i を有し得る。1つの実施形態において、このリガンドは、例えば、別のプロテアーゼ(例えば、プロテアーゼドメインがET2プロテアーゼドメインに30~90%の同一であるか、または30~60%の同一であるプロテアーゼ)と比較して、ET2を特異的に阻害する。例えば、このリガンドは、他のプロテアーゼ、例えば、トリプシノーゲン-IV、膜型セリンプロテアーゼ-1、-6、-7、またはエンドセリナーゼ-1(ET1)などの非ET2プロテアーゼを阻害しない。例えば、このリガンドは、別のプロテアーゼ(例えば、このような他のプロテアーゼ)を、ET2についてのその阻害定数よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、または100倍劣る(例えば、数字的にはより大きな)阻害定数で阻害する(すなわち、それらがET2を阻害するのと同様に他のプロテアーゼを阻害しない)。

10

【0009】

1つの実施形態において、リガンドは血管新生を阻害し、例えば、インビトロおよびインビボにおいて1つ以上のECM成分または血管基底膜成分のタンパク質分解を阻害する。1つの実施形態において、このリガンドは、以下のアッセイ:角膜新血管新生アッセイ;ニワトリ胚絨毛尿膜モデルアッセイ;腫瘍を注入したSCIDマウスを使用するアッセイ(例えば、Jankunら、Canc. Res., 57:559-563(1997))において記載されたような、DU145またはLnCaPの注入から生じる腫瘍);または血管新生を刺激するためにbFGFを注入されるマウスにおけるアッセイ(例えば、Minら、Canc. Res., 56:2428-2433(1996))によって記載されるようなもの)の1つ以上において統計学的に有意な効果を有する(例えば、血管新生プロセス)。これらのアッセイにおける例示的な効果には、ネガティブコントロール(例えば、抗体なし)と比較して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、または20倍の改善が含まれる。

20

30

【0010】

1つの実施形態において、このリガンドはET2に作動し(例えば、ET2の活性、例えば、タンパク質分解活性を活性化または増加する)、例えば、少なくとも0.5倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍、または20倍増加する。

【0011】

1つの実施形態において、このリガンドは、ET2の活性部位、例えば、ET2の活性部位間隙と接触するか、あるいはET2の触媒3成分中の残基の30オングストローム、20オングストローム、もしくは10オングストローム以内であるアミノ酸残基、例えば、配列番号94のヒスチジン361もしくは配列番号94のセリン506、または配列LTAAC(配列番号94のアミノ酸357-362)もしくは配列DSCQGDSGGPLV(配列番号94のアミノ酸500-511)と接触する。

40

【0012】

このタンパク質リガンドは、典型的には、ET2、好ましくはヒトET2と、高い親和性および特異性で相互作用する(例えば、結合する)。例えば、このタンパク質リガンドは、 10^{-7} Mよりも良好な(すなわち、数字的にはこれよりも小さな)、好ましくは、 10^{-8} M、 10^{-9} M、または 10^{-10} Mよりも良好な親和性定数(K_d)でヒトET2に結合する。好ましくは、このタンパク質リガンドは、ET2の細胞外ドメイン、最も好ましくは、ヒトET2の細胞外ドメイン(例えば、ET2-Sのアミノ酸161~562またはET2-Lのアミノ酸161~688)と相互作用し、例えば、これに結合す

50

る。1つの実施形態において、ET2リガンドは、本明細書に記載される抗体のエピトープのすべてまたは一部、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9に結合する。ET2リガンドは、ヒトET2への、例えば、本明細書に記載される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の結合を競合的に阻害し得る。ET2リガンドは、エピトープ、例えば、コンホメーションのエピトープまたは線状エピトープに結合してもよく、このエピトープは、結合したときに、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の結合を妨害する。このエピトープは、空間的に密接した近接にあり得（例えば、3、5、または10オングストローム以内）、または機能的に関連し得（例えば、線状配列中の重複もしくは隣接するエピトープ）、または抗体A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、もしくはC9によって認識されるものとコンホメーション的に類似し得る。1つの実施形態において、ET2リガンドは、ET2のセリンプロテアーゼドメインの領域内に全体的または部分的に位置するエピトープ、例えば、ET2-Sについてはアミノ酸321~562およびET2-Lについてはアミノ酸321-688に結合する。

10

【0013】

20

従って、本発明は、抗ET2フラグメント、抗体フラグメント、およびその薬学的組成物、ならびにこのような抗体およびフラグメントを作製するための核酸、組換え発現ベクター、および宿主細胞を提供する。例示的な薬学的組成物は、このリガンドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む。インビトロまたはインビボのいずれかで、ET2発現細胞、例えば、ET2発現細胞を死滅するため、またはこの増殖を阻害するために、ET2を検出するための本発明の抗体を使用する方法もまた、本発明によって含まれる。

【0014】

ヒトET2は少なくとも内皮細胞上で発現される。1つの実施形態において、ET2リガンドはこれらの細胞の細胞表面上に、および特に生きている細胞、例えば、生きている内皮細胞の細胞表面に結合する。ある場合において、タンパク質リガンドは、例えば、抗体に結合体化された薬剤、例えば、細胞毒性剤または標識化剤の細胞内送達を可能にするために、細胞内に内部移行され得る。ある態様において、本発明のタンパク質リガンドは、ET2を発現する、生きている正常な良性の過形成性の細胞、および癌性細胞を標的とするために使用され得る。

30

【0015】

1つの実施形態において、ETリガンドはETに結合しそのコンホメーションおよび/または触媒活性を変化させ、例えば、これは触媒活性または基質との相互作用を増強する。

【0016】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質をいう。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書ではVHと略される)および軽(L)鎖可変領域(本明細書ではVLと略される)を含み得る。別の例において、抗体は、2つの重(H)鎖可変領域および2つの軽(L)鎖可変領域を含む。用語「抗体」は、抗体の抗原結合フラグメント(例えば、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂、Fdフラグメント、Fvフラグメント、およびdAbフラグメント)、ならびに完全な抗体を含む。

40

【0017】

VH領域およびVL領域は、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれるより保存されている領域が散在している、相補性決定領域(「CDR」)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分され得る。フレームワーク領域およびCDRの程度は以前に規定されてい

50

る (Kabata, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、および Chothia, C. ら、(1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照のこと)。Kabataの定義が本明細書で使用されている。各VHおよびVLは、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、以下の順番でアミノ末端からカルボキシ末端に配列される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0018】

「免疫グロブリンドメイン」とは、免疫グロブリン分子の可変ドメインまたは定常ドメインからのドメインをいう。免疫グロブリンドメインは、典型的には、約7個の鎖から形成されるシート、および保存性ジスルフィド結合を含む(例えば、A. F. WilliamsおよびA. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405を参照のこと)。免疫グロブリン可変ドメインの超可変ループの標準構造は、Chothiaら(1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; Tomlinsonら(1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798)およびTomlinsonら(1995) EMBO J. 14(18): 4628-38において記載されるように、その配列から推測され得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン可変ドメイン配列」とは、免疫グロブリン可変領域の構造を形成し得るアミノ酸配列をいう。例えば、この配列は、天然に存在する可変ドメインのアミノ酸配列のすべてまたは一部を含んでもよい。例えば、この配列は、1つ、2つ、もしくはそれ以上のN末端またはC末端のアミノ酸、内部のアミノ酸を除外してもよく、1つ以上の挿入または付加的な末端アミノ酸を含んでもよく、または他の変化を含んでもよい。1つの実施形態において、免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドは、別の免疫グロブリンケラチン生成細胞編ドメイン配列と結合して、標的結合構造(すなわち「抗原結合部位」)、例えば、ET2と相互作用する、例えば、ET2に結合し、またはこれを阻害する構造を形成し得る。

【0020】

抗体のVH鎖またはVL鎖は、重鎖または軽鎖の定常領域のすべてまたは一部をさらに含み、それによって、それぞれ重鎖または軽鎖の免疫グロブリン鎖を形成し得る。1つの実施形態において、抗体は、2つの重鎖免疫グロブリン鎖および2つの軽鎖免疫グロブリン鎖のテトラマーであり、ここで、重鎖および軽鎖の免疫グロブリン鎖は、例えば、ジスルフィド結合によって内部連結される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。軽鎖定常領域はCLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、宿主の組織または因子(免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的な補体系の第1成分(C1q)を含む)への抗体の結合を媒介する。用語「抗体」には、IgA、IgG、IgE、IgD、IgMの型のインタクトな免疫グロブリン(ならびにそれらのサブタイプ)が含まれる。免疫グロブリンの軽鎖は型または型であってもよい。1つの実施形態において、この抗体はグリコシル化される。抗体は、抗体依存性細胞毒性および/または補体媒介細胞毒性について機能的であり得る。

【0021】

1つの実施形態において、抗体のHCまたはLCは、ヒト生殖系列配列(例えば、フレームワーク領域)によってコードされ、および/またはCDRにあるアミノ酸配列に対応する(例えば、同一であるか、または閾値の程度の類似性を有する)。例えば、抗体は、ヒトDP47抗体からの配列を含み得る。1つの実施形態において、抗体についての1つ以上のコドンが、生殖系列核酸配列と比較して変化されるが、同じアミノ酸配列をコードするように選択される。コドンは、例えば、特定の系における発現を最適化するように、制限酵素部位を作製するように、サイレントフィンガープリントを作製するように、など

のように選択され得る。CDR配列もまた、実質的にヒトであり得、完全にヒトのCDR（例えば、ヒト生殖系列配列中または成熟ヒト抗体中のCDR）に対して、少なくとも70%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、または95%同一である。従って、合成核酸配列が、完全なヒトCDRまたは実質的なヒトCDRをコードするために使用され得る。

【0022】

1つの実施形態において、抗体HCのCDR2は、DP47のCDR2において見出されるアミノ酸と同一である少なくとも11、12、13、14、または15のアミノ酸の位置を含む。

【0023】

本明細書において使用される場合、用語「免疫グロブリン」とは、免疫グロブリン遺伝子（例えば、天然または合成）によって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドまたはその領域からなるタンパク質をいう。例示的な天然のヒト免疫グロブリン遺伝子には、定常領域遺伝子、（IgA1およびIgA2）、（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、およびμ、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25Kdまたは214アミノ酸）は、NH₂末端における可変領域遺伝子（約110アミノ酸）およびCOOH末端における定常領域遺伝子によってコードされ得る。全長免疫グロブリン「重鎖」（約50Kdまたは446アミノ酸）は、可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および他の上述の定常領域遺伝子、例えば、（約330アミノ酸をコードする）の1つによって同様にコードされ得る。

10

20

【0024】

用語抗体の「抗原結合フラグメント」（または単に「抗体部分」もしくは「フラグメント」）は、本明細書において使用される場合、ET2（例えば、ヒトET2）に特異的に結合する能力を保持する全長抗体の1つ以上のフラグメントをいう。用語抗体の「抗原結合フラグメント」の範囲に含まれる結合フラグメントの例には、(i) Fabフラグメント（VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価フラグメント）；(ii) F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域においてジスルフィド結合によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント）；(iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一アームのVLドメインおよびVHドメインからなるFvフラグメント、(v) VHドメインからなるdAbフラグメント（Wardら（1989）Nature 341:544-546）ならびに(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、VLおよびVHは、別々の遺伝子によってコードされているが、これらは組換え方法を使用して、合成リンカーによって結合され得、これらのリンカーは、これらのドメインが単一のタンパク質として作製されることを可能にし、このタンパク質では、VL領域およびVH領域が対合して一価分子を形成する（Fv(scFv)として知られる；例えば、Birdら（1988）Science 242:423-426；およびHoustonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと）。このような単鎖抗体のモノマーおよびダイマーもまた、用語抗体の「抗原結合フラグメント」の範囲内に含まれることが意図される。これらの抗体フラグメントは当業者に公知である従来的な技術を使用して得られ、これらのフラグメントは、インタクトな抗体と同じ様式で活性についてスクリーニングされる。

30

40

【0025】

抗体は、好ましくは単一特異的、例えば、モノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントである。用語「単一特異的抗体」とは、特定の標的（例えば、エピトープ）についての単一の結合特異性および親和性を示す抗体をいう。この用語は、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含み、これらは、本明細書において使用される場合、抗体の調製物または単一の分子組成物のそのフラグメントをいう。

50

【0026】

抗E T 2抗体は、全長（例えば、I g G（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、I g M、I g A（例えば、I g G A 1、I g A 2）、I g D、およびI g E、しかし好ましくはI g G）であり得るか、または抗原結合フラグメントのみ（例えば、F a b、F（a b'）₂、またはs c F vフラグメント）を含み得る。抗体またはその抗原結合フラグメントは、2つの重鎖免疫グロブリンおよび2つの軽鎖免疫グロブリンを含み得るか、または単鎖抗体であり得る。抗体は、任意に、定常領域遺伝子、
、
、
、またはμから選択される定常領域を含み得る。好ましい抗E T 2抗体は、実質的にヒトからである重鎖または軽鎖の定常領域、例えば、ヒトI g G 1定常領域またはその一部を含む。本明細書において使用される場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体のクラス（例えば、I g MまたはI g G 1）をいう。

10

【0027】

1つの実施形態において、抗体（またはそのフラグメント）は、組換えまたは修飾された抗E T 2抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、またはインビトロ生成抗体である。用語「組換え」または「修飾された」ヒト抗体は、本明細書において使用される場合、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離されるすべての抗体、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体、コンビナトリアル抗体ライブラリー、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、または他のD N A配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、
作製、もしくは単離された抗体などを含むことが意図される。このような組換え抗体は、ヒト化抗体、C D R移植抗体、キメラ抗体、脱免疫化抗体、インビトロ生成抗体を含み、そして任意に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する退場領域を含んでもよい。1つの実施形態において、抗体は、ヒトにおいて抗グロブリン応答を誘発しない。

20

【0028】

1つの実施形態において、抗E T 2抗体はヒト抗体である。

【0029】

E T 2への本明細書において開示される抗E T 2抗体の結合の重複するエピトープを結合する、またはE T 2への本明細書において開示される抗E T 2抗体の結合を競合的に阻害する抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、単一特異的抗体A 1 0、G 3、A 6、A 7、C 8、H 9、G 1 0 - R 2、F 3 - R 2、C 6 - R 2、A 4 - R 3、C 1 - R 3、A 2、B 5、D 2、D 5、F 8、H 1 0、もしくはC 9のE T 2への結合の重複するエピトープを結合する、または単一特異的抗体A 1 0、G 3、A 6、A 7、C 8、H 9、G 1 0 - R 2、F 3 - R 2、C 6 - R 2、A 4 - R 3、C 1 - R 3、A 2、B 5、D 2、D 5、F 8、H 1 0、もしくはC 9のE T 2への結合を競合的に阻害する抗体もまた、本発明の範囲内に含まれる。抗E T 2抗体の任意の組み合わせが本発明の範囲内にあり、これは例えば、E T 2の異なる領域に結合する2つ以上の抗体、例えば、E T 2のセリンプロテアーゼドメイン上の2つの異なるエピトープに結合する抗体、例えば、二特異性抗体である。

30

【0030】

1つの実施形態において、抗E T 2抗体またはその抗原結合フラグメントには、少なくとも1つの軽鎖または重鎖の可変ドメイン配列（例えば、少なくとも1つの軽鎖免疫グロブリンおよび少なくとも1つの重鎖免疫グロブリン）が含まれる。好ましくは、各免疫グロブリンは、E T 2と相互作用する抗体、例えば、本明細書に記載される抗体、例えば、A 1 0、G 3、A 6、A 7、C 8、H 9、G 1 0 - R 2、F 3 - R 2、C 6 - R 2、A 4 - R 3、C 1 - R 3、A 2、B 5、D 2、D 5、F 8、H 1 0、またはC 9の軽鎖または重鎖可変ドメイン配列からのC D Rと実質的に同一である少なくとも1つ、2つ、および好ましくは3つの相補性決定領域（C D R）を有する軽鎖または重鎖可変ドメイン配列を含む。例示的な軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列および核酸配列を表1に示す。ある実施形態において、表1および表2の配列番号10および配列番号89において「q

40

50

」として列挙される残基はリジンである。

【0031】

(表1: 例示的配列)

【0032】

【表1-1】

抗体	配列	識別名
C9 VLC 核酸配列	CAGAGCGTCTTGAAGTCAAGCCTGCCTCCGTGCTGGGTCTCCTGGACAGTC GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAAGTAGTGACGTTGGTCATTATAATT ATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAAGTCATGATT TATGATGTCAGTAGTCGGCCCTCCGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGGTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGGCCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG ACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTTCGTATACAAGCGGTGACACTCTTTAT GTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCAACCGTCTTAGGTGAGCCCAAGGCCAA CCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACA AGGCCACACTAGTGTGCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC CAAACCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGA GCCTGACGCCCGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTC TTAATAA	配列番号3
C9 VLC アミノ酸 配列	QSVLTQPASVSGSPGQSTITISCTGTSSDVGHYNYVSWYQQHPGKAPKVM YDVSSRPSGVSDRFSGSKSGNTASLAISGLQAEDEADYCYSSYTSGLTLY VFGTGTKVTVLGGPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPAEC	配列番号4
C9 VHC 核酸配列	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTC TTTACGTCTTTCTTGGCCTGCTTCCGGATTCACTTCTCTCGTTACCCCTA TGTTTTGGGTTGCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTAT ATCTCTTCTTCTGGTGGCTTTACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCG CTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGA ACAGCTTAAGGGCTGAGGACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGA CCGCGGGTAAACAAGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGT CACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGC	配列番号5
C9 VHC アミノ酸 配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYPMFWRQAPGKLEWVSY ISSGGFTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG PRGNKYFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL	配列番号6
B5 VLC	AGCTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGCCGTGCCCTAGGACAGGC	配列番号7

10

20

30

【0033】

【表 1 - 2】

核酸配列	AGCCAACATCTCCTGCTCTGGAGATAGATTGGGGGATAAAATATACTTCCT GGTATCAACAACAGTCAGGACAGTCCCCTGTCTGGTTCATCTATCAAGAT AAGAAGCGACCCTCAGGGATCCCCGAGCGATTCTCTGGCTCCTCCTCTGG GAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGGCCAGGCCATAGATGAGGCTG CCTATTACTGTGAGCGGTGGGCCACCAATGTGGTTTTTCGGCGCTGGGACC AAGCTGACCGTCTAGGTTCAGCCCAAGGCTGCCCTTCGGTCACTCTGTT CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTC TCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGAT AGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAG CAACAACAAGTACCGCGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGT GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC CTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGGATGTTTCATAATAA	
B5 VLC アミノ酸 配列	SYELTQPPSVSVSLGQAANISCSGDRLLGDKYTSWYQQSQSQSPVLVIYQD KKRPSGI PERFSGSSSNTATLITSGAQAIIDEAAYCQAWATNVVFGAGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSMNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSQCQVTHEGST VEKTVAPTGCS	配列番号 8
B5-H10-A2- D2 VHC 核酸配列	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTC TTTACGTCTTTCTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTCTCTCGTTACCGTA TGTATTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCT ATCTCTCCTTCTGGTGGCGATACTCGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCG CTTCACTAATCTTAGAGACAACCTCTAGAATACTCTACTTGCAGATGA ACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGA CCGCGGGGTAACAAGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGC	配列番号 9
B5-H10-A2- D2 VHC アミノ酸 配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYRMYWVRQAPGKLEWVSS ISPSGGDTRYADSVKGRFTISRDNStNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG PRGNKYFDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPL	配列番号10
F8 VLC 核酸配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGA AAGAGTCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACCAGCAGCGACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGTCAGGCTCCAGGCTCCTCATTTC GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTACCCTCACCATCAGCAGACTGGAACCTGAAGATT TTGCAGTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAACTCACCTGGGACGTTCCGC CAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATA A	配列番号11
F8 VLC アミノ酸 配列	DIQMTQSPGTLVSLSPGERVTLSCRASQSVTSSDLAWYQQKPGQAPRLLIS GASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTIISRLEPEDFAVYYCQQYGNPSGTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	配列番号12
F8 VHC 核酸配列	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTC TTTACGTCTTTCTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTCTCTCGTTACCATA TGTGGTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGT ATCTCTTCTTCTCGTGGCATTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCG CTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGA ACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGA CCGCGGGGTAACAAGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGC	配列番号13
F8 VHC アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYHMWWVRQAPGKLEWVSG ISSSRGITTKYADSVKGRFTISRDNStNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG PRGNKYFDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPL	配列番号14

10

20

30

40

【表 1 - 3】

<p>配列</p> <p>H10 VLC 核酸配列</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTAGCTCAACGTGGACGTTCCGGC CAAGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAG GGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATA A</p>	<p>配列番号15</p>
<p>H10 VLC アミノ酸 配列</p>	<p>DIQMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTWTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>配列番号16</p>
<p>A2 VLC 核酸配列</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCCTGTCTGCATTTGTAGGAGA CAGGGTCAACATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGACATTAGAAGTGATTTAG CCTGGTATCAGCAAACACCAGGAAAAGCCCCAAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCACTTTGAAAGATGGGGCCCCATCAAGATTACGGCAGTGGATC TGGGACAGAATTTACTCTCACAATCAGCAGCCTGCACCCTGAAGATCTTG CGACTTATTACTGTCAACACCTTAATGGTCACCCTGCTTTCCGGCCCTGGG ACCAAAGTGAATATCCAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAAGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAAGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCCTG AGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATAA</p>	<p>配列番号17</p>
<p>A2 VLC アミノ酸 配列</p>	<p>DIQMTQSPSFLSAFVGDVITITCRASQDIRSDLAWYQQTPGKAPKLLIYA ASTLKDGPAPSRFSGSGSGTEFTLTISSLHPEDLATYYCQHLNHPAFGPG TKVNIQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	<p>配列番号18</p>
<p>D2 VLC 核酸配列</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTTGGAGA CAGAGTCAACATCACTTGCCGGGCCAAGCCAGACCATTGACAATTATTTGA ATTGGTATCAGCAGAAACACCAGGAAAAGCCCCAAACTCGTGGTCTATGCT GCATCCACTTTGCAAACCTAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGTCTGAAACCTGAAGATTTTG CAACTTACTTCTGTCAACAGGGTTTCAAGTAACTCTTGACGTTCCGGCCAA GGGACCACGGTGGCAATGATACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT GCCTGTCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATAA</p>	<p>配列番号19</p>
<p>D2 VLC アミノ酸 配列</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDVITITCRASQIDNYLNWYQQKPGKAPKLVVYA ASTLQTRVPSRFSGSGSGTDFTLTIIDSLKPEDFATYFCQQGFSNPWTFGQ GTTVAMIRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ LSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>配列番号20</p>
<p>D5 VLC 核酸配列</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTCTCCAGGGGA AAGAGGCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTTTGTAGTTACAGCTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAGCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT</p>	<p>配列番号21</p>

10

20

30

40

【表 1 - 4】

	GGCGCATCCAGCAGGGCCAAAGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGACTGGAGCCTGAAGACT TTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGTTCCCTCAGTTCGGTGGACGTTT GGCCAAAGGGACCAAGGTGGAAGTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG TTGTGTGCCTGTGTAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGG AAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG GCAGGACGGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGGAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA ATAA	
D5 VLC アミノ酸 配列	DIQMTQSPGTLSSLSPGERGTLSCRASQFVSYSLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRAKGIIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYVPSVPTWF GQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDGDSTYSLSSTLTLSKADYEEHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	配列番号22
D5 VHC 核酸配列	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGCTCTGTTTCAGCCTGGTGGTTC TTTACGTCTTTCTTGCCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACGATA TGCAATTGGGTTCCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTTCTTCT ATCTCTTCTTCTGTTGGCTATACTGCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCG CTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGAGATGA ACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGCC CGAGGTACCAGCCAAGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGTCACCGTCTC AAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTAGC	配列番号23
D5 VHC アミノ酸 配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKLEWVSS ISSGGYTAAYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA RGTSQGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL	配列番号24

10

20

【0036】

1つの実施形態において、抗体（またはそのフラグメント）は、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の軽鎖または重鎖可変ドメイン配列からの少なくとも1つ、2つ、および好ましくは3つのCDR、あるいはそれに対して実質的に同一、例えば、80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上同一である配列を含む。他の実施形態において、抗体（またはそのフラグメント）は、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の軽鎖または重鎖可変ドメイン配列からの少なくとも1つ、2つ、および好ましくは3つのCDRを有し得る。1つの好ましい実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト抗ET2抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9からの6つすべてのCDRを含む。

30

【0037】

いくつかの例示的な抗体のCDR配列およびフレームワーク配列を表2および表3に示す。

40

【0038】

(表2: HC CDR)

【0039】

【表 2】

名称	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
A10	RYRMW	YISSSGGFTNYADSVKG	NARRALPSMDV
G3	RYGMS	VIYSSGGITRYADSVKG	RAPRGEVAFDI
A6	RYKMW	YISPSGGYTGADSVKG	NARRAFPSMDV
A7	RYRMS	SISSSGGITTYADSVKG	NARRAFPSMDV
C8	RYTMS	YIVPSGGMTKYADSVKG	RAPRGEVAFDI
H9	RYSMH	SIGPSGGTKYADSVKG	PFRGSYYYFDY
G10-R2	RYKMW	YISPSGGYTGADSVKG	NARRAFPSMDV
F3-R2	RYRMH	GISSSGGDTNYADSVKG	NARRAFPSMDV
C6-R2	RYSMH	RIVPSGGTTFYADSVKG	NARRAFPSMDV
A4-R3	RYNMY	GIRPSGGSTQYADSVKG	NARRAFPSMDV
C1-R3	RYSMH	GIRPSGGSTKYADSVKG	NARRAFPSMDV
A2	RYRMY	SISPSGGDTRYADSVKG	GGPRGNKYFDY
B5	RYRMY	SISPSGGDTRYADSVKG	GGPRGNKYFDY
D2	RYRMY	SISPSGGDTRYADSVKG	GGPRGNKYFDY
D5	RYDMH	SISSSGGYTAYADSVKG	GARGTSQGY
F8	RYHMW	GISSSRGITKYADSVKG	GGPRGNKYFDY
H10	RYRMY	SISPSGGDTRYADSVKG	GGPRGNKYFDY
C9	RYPMF	YISSSGGFTGYADSVKG	GGPRGNKYFDY

10

20

【 0 0 4 0 】

(表 3 : L C C D R)

【 0 0 4 1 】

【表 3】

名称	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
A10	SGSSSNIGSNYVY	SNNQRPS	AAWDDSLSGPV
G3	WASQGLSNYLA	SASTLQS	QQANSFPWT
A6	RGDRLRSYYSS	GRNNRPS	SSRDGSGNFL
A7	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQLTGYPST
C8	TGTSSDVGGYNYVS	DVSKRPS	TSYTSSSTWV
H9	QASQDTYNRLH	DAVNLKR	QHSDDLSLA
G10-R2	RSSQSLLYSNGYNYLD	LGSNRAS	MQALQIPRT
F3-R2	RASLPVNTWLA	AASRLQS	QQANTFPYT
C6-R2	QGDSLRSYYAS	SKSNRPS	NSRDSSGNHLV
A4-R3	RGDRLRSYYSS	GRKNRPS	SSRDGSGNFL
C1-R3	RASQISISTYLN	GASSLVS	HQSYITSWT
A2	RASQDIRSDLA	AASTLKD	QHLNGHPA
B5	SGDRLGDKYTS	QDKKRPS	QAWATNVV
D2	RASQTIDNYLN	AASTLQT	QQGFSNPWT
D5	RASQFVSYSYLA	GASSRAK	QQYVPSVPWT
F8	RASQSVTSSDLA	GASSRAT	QQYGNSPGT
H10	RASQSVSSSYLA	GASSRAT	QQYGSSTWT
C9	TGTSSDVGHYNYVS	DVSSRPS	SSYTSGDTLYV

30

40

【 0 0 4 2 】

別の好ましい実施形態において、この抗体（またはそのフラグメント）は、開示された抗体の対応するCDRと比較して、10アミノ酸毎に3個、2.5個、2個、1.5個、

50

または1個、0.5個を超えない置換、挿入、または欠失が異なる(例えば、違いの数はCDRの長さに比例する)アミノ酸配列を有する、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の軽鎖および/または重鎖の可変領域からの少なくとも1つ、2つ、および好ましくは3つのCDRを含む。さらに、抗体またはその抗原結合フラグメントは6つのCDRを含み得、これらの各々は、ヒト抗ET2抗体の対応するCDR、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9と比較して、10アミノ酸毎に3個、2.5個、2個、1.5個、または1個、0.5個を超えない置換、挿入、または欠失が異なる。

10

【0043】

1つの実施形態において、重鎖可変領域は以下のアミノ酸配列：Y-X-M-X-W(配列番号95)またはR-Y-X-M-X(配列番号96)またはR-Y-(SRK)-M-(SYWH)(配列番号97)を含むCDRを含み、ここで、Xは任意のアミノ酸である。

【0044】

1つの実施形態において、重鎖可変領域は以下の配列：I/S-I/S-S-X-X-G-X-X-X-X* -Y-A-D-S(配列番号98)(ここでXは任意のアミノ酸であり、そしてX*は存在しなくてもよい)、または(GSVYR)-I-(GSVYR)-(SP)-S-(GR)-G-(STIMYFKD)-T-(AGTFRKNQ)-Y-A-D-S-V-K-G(配列番号112)または(GSY)-I-(SVR)-(SP)-S-G-G-(SIYD)-T-(GRKN)-Y-A-D-S-V-K-G(配列番号113)を含むCDR2を含む。

20

【0045】

1つの実施形態において、重鎖可変領域は、(GN)-(AG)-(RP)-R-(AG)-(FN)-(KP)-(SY)-(MY)-(FD)-(VD)-Y(配列番号99)または(GRN)-(AG)-(RP)-(GR)-(AG)-(FNE)-(VKP)-(ASY)-(MYF)-(FD)-(IVD)-Y(配列番号100)または以下の配列の1つ：GPRGNKY(配列番号101)もしくはARGTSQ(配列番号102)を含むCDR3を含む。

30

【0046】

1つの実施形態において、軽鎖可変領域は、以下の配列：R-A-S-Q-S-(IV)-S-(ST)-(SY)-(LY)-(ALN)-A(配列番号103)またはR-A-S-(LQ)-(STFDP)-(IV)-(STRDN)-(STYN)-(SYWD)-(LYD)-(ALN)-A(配列番号104)を含むCDR1を含む。

【0047】

1つの実施形態において、軽鎖可変領域は、以下の配列：X-A-S-S-L-X-X(配列番号105)または(AG)-A-S-(STR)-(LR)-(AVKQ)-(STKD)(配列番号106)を含むCDR2を含み、ここでXは任意のアミノ酸である。

40

【0048】

1つの実施形態において、軽鎖可変領域は、以下の配列：Q-Q-X-X-X-X-P-X-T-X(配列番号107)またはQ-Q-(AGSLY)-(GTVYFN)-(GSTINP)-(STYFN)-(STVP)-(AGSYWP)-(TIW)-T(配列番号108)を含むCDR3を含む。

【0049】

1つの実施形態において、軽鎖可変領域は、以下の配列：S-X-D-X-X-X-X-X-Y-X-S-W(配列番号109)またはR-A-S-Q-X-V/I-X-X-X-(X)-L-A/N-W(配列番号110)を含むCDR1を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、そして(X)は存在しなくてもよい。

50

【0050】

1つの実施形態において、軽鎖可変領域は、以下の配列：A - S - S / T - R / L - X - X - G - R（配列番号111）を含むCDR2を含み、ここでXは任意のアミノ酸である。

【0051】

1つの実施形態において、HC可変ドメイン配列のCDRの2つまたは3つが本明細書に記載のモチーフに一致し、その結果、これらのモチーフはまた、本明細書に記載の抗体のHC可変ドメインに一致する。同様に、1つの実施形態において、LC可変ドメイン配列のCDRの2つまたは3つが本明細書に記載のモチーフに一致し、その結果、これらのモチーフはまた、本明細書に記載の抗体のLC可変ドメインに一致する。なお別の実施形態において、CDRについて一致したモチーフは、本明細書に記載される抗体において対合されるHCおよびLCに基づいている。

10

【0052】

1つの実施形態において、H1およびH2超可変ループは、本明細書に記載される抗体と同じ標準的構造を有する。1つの実施形態において、L1およびL2超可変ループは、本明細書に記載される抗体と同じ標準的構造を有する。

【0053】

別の実施形態において、抗ET2抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖または重鎖の免疫グロブリンは、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の対応するフレームワークと比較して、FR1、FR2、FR3、またはFR4において、10アミノ酸毎に3個、2.5個、2個、1.5個、または1個、0.5個を超えない置換、挿入、または欠失を有する軽鎖または重鎖の可変フレームワークをさらに含み得る。1つの実施形態において、抗ET2抗体の軽鎖または重鎖の免疫グロブリン、またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のフレームワークと同一である軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4をさらに含む。

20

【0054】

1つの実施形態において、軽鎖または重鎖の可変フレームワークは以下から選択され得る：(a) ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、例えば、ヒト成熟抗体、ヒト生殖系列配列、コンセンサス配列、または本明細書に記載の抗体からの軽鎖または重鎖の可変フレームワークからのアミノ酸残基の少なくとも80%、90%、95%、または好ましくは100%を含む軽鎖または重鎖の可変フレームワーク；(b) ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、例えば、ヒト成熟抗体、ヒト生殖系列配列、またはコンセンサス配列からの軽鎖または重鎖の可変フレームワークからのアミノ酸残基の20%~80%、40%~80%、または60%~90%を含む軽鎖または重鎖の可変フレームワーク；(c) 非ヒトフレームワーク（例えば、齧歯類フレームワーク）；あるいは(d) 例えば、脱免疫されているか、または部分的にヒト化されている抗原性または細胞毒性決定基を、例えば除去するために修飾されている非ヒトフレームワーク。1つの実施形態において、ET2リガンドはヒトにおいて非抗原性である。

30

40

【0055】

1つの実施形態において、重鎖または軽鎖のフレームワークは、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の重鎖フレームワークに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるか；または本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の可変ド

50

メインのアミノ酸配列とは、少なくとも1残基または5残基であるが、40残基、30残基、20残基、または10残基未満異なる、アミノ酸配列を含む。

【0056】

1つの実施形態において、ET2抗体の重鎖または軽鎖の可変ドメイン配列は、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の可変ドメイン配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるか；または本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の可変ドメイン配列とは、少なくとも1残基または5残基であるが、40残基、30残基、20残基、または10残基未満異なる、アミノ酸配列を含む。

10

【0057】

1つの実施形態において、抗ET2抗体は、本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の軽鎖可変ドメイン配列を含む少なくとも1つ、好ましくは2つの軽鎖可変領域、および本明細書に開示される抗体、例えば、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9の重鎖可変ドメイン配列を含む少なくとも1つ、好ましくは2つの重鎖可変領域を含む。

20

【0058】

1つの実施形態において、抗ET2抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖または重鎖フレームワークは、ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク、例えば、ヒト成熟抗体、ヒト生殖系列配列、コンセンサス配列、または本明細書に記載される抗体からの軽鎖または重鎖の可変フレームワーク残基からの少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、16個、または17個のアミノ酸残基を含む。1つの実施形態において、ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワーク残基からのアミノ酸残基は、ヒト生殖系列において同じ位置で見出される残基と同じである。好ましくは、ヒト軽鎖または重鎖の可変フレームワークからのアミノ酸残基は、同じ位置でのヒト生殖系列における最も一般的な残基である。

30

【0059】

本明細書に記載されるET2リガンドは単独で使用され得、例えば、非誘導体型または非結合体型で、被験体に投与され得るか、またはインビトロで使用され得る。他の実施形態において、ET2リガンドは、別の機能的分子、例えば、別の化合物、ペプチド、タンパク質、アイソトープ、細胞、または不溶性支持体に、誘導体化、修飾、または連結され得る。例えば、ET2リガンドは、1つ以上の他の分子実体、例えば、とりわけ、抗体（例えば、リガンドが二特異性または多特異性抗体を形成するための抗体である場合）、毒素、放射性同位元素、治療剤（例えば、細胞傷害性薬剤もしくは細胞増殖抑制剤）または治療部分などに、機能的に連結され得る（例えば、化学的結合、遺伝子融合、非共有結合的結合、またはその他によって）。例えば、ET2リガンドは、放射性イオン（例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、または ^{90}Y 放射体）、例えば、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテニウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、レニウム（ ^{186}Re ）、またはビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）にカップリングされ得る。

40

【0060】

別の態様において、本発明は、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤、および少なくとも1つの本明細書に記載されるET2リガンド（例えば、抗体またはそのフラグメント）を含む組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。1つの実施形態において、これらの組成物（例えば、薬学的組成物）は、上述のET2リガンドの2つ以上の組

50

み合わせを含む。

【0061】

別の態様において、本発明は、単独、または他の処置様式、例えば、細胞傷害性薬剤または標識化薬剤（例えば、本明細書に記載される細胞傷害性薬剤または標識化薬剤）と組み合わせる使用のための、本明細書に記載されるような抗E T 2抗体（またはそのフラグメント）、例えば、抗E T 2抗体（またはそのフラグメント）を、E T 2抗体またはこのような薬剤の組み合わせをいかにして使用するか（例えば、癌性損傷を処置、予防、または検出するために）についての指示書とともに含むキットを特徴とする。

【0062】

本発明はまた、本明細書に記載される重鎖および軽鎖の免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントをコードする核酸配列を特徴とする。例えば、本発明は、本明細書に記載される抗E T 2抗体分子の、それぞれ重鎖および軽鎖の可変領域をコードする第1および第2の核酸を特徴とする。別の態様において、本発明は、本発明の核酸を含む宿主細胞およびベクターを特徴とする。

10

【0063】

別の態様において、本発明は、抗E T 2抗体、またはその抗原結合フラグメントを産生する方法を特徴とする。この方法は、重鎖可変領域（例えば、本明細書に記載されるような重鎖可変領域）をコードする第1の核酸を提供する工程；軽鎖可変領域（例えば、本明細書に記載されるような軽鎖可変領域）をコードする第2の核酸を提供する工程；および抗原結合タンパク質を形成するために上記軽鎖および重鎖の可変領域のアセンブリーを可能にする条件下で宿主細胞中で上記第1の核酸および第2の核酸を発現させる工程を包含する。これらの第1の核酸および第2の核酸は、関連付けされ得るか、または関連付けされないことも可能であり、例えば、それぞれ同じかまたは異なるベクター上で発現され得る。第1の核酸および第2の核酸は、さらに、重鎖および軽鎖の定常領域をコードし得る。

20

【0064】

宿主細胞は、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核生物細胞（例えば、E . coli）であり得る。例えば、哺乳動物細胞は、培養された細胞または細胞株であり得る。例示的な哺乳動物細胞には、リンパ細胞株（例えば、NSO）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、COS細胞、卵母細胞、およびトランスジェニック動物からの細胞（例えば、哺乳動物上皮細胞）が含まれる。例えば、本発明に記載される抗体をコードする核酸は、トランスジェニック動物において発現され得る、1つの実施形態において、核酸は、組織特異的プロモーター（例えば、哺乳動物特異的プロモーター）の制御下に配置され、抗体はトランスジェニック動物において産生される。例えば、抗体分子は、トランスジェニック動物、例えば、トランスジェニックのウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、または齧歯類などの乳に分泌される。

30

【0065】

本発明はまた、細胞活性（例えば、細胞増殖、細胞分化、細胞移動、または細胞組織化）、生理学的活性（例えば、血管の増殖、組織化など）、および/もしくは細胞を処理する（例えば、阻害する）方法、または細胞、例えば、正常な、良性のもしくは過形成の細胞（例えば、肺、胸部、腎臓、尿路上皮、結腸、前立腺、または肝臓の癌および/または転移）を除去もしくは死滅する方法を特徴とする。処理は、例えば、腫瘍細胞を直接的に標的化することによって、または腫瘍の血管新生を阻害し、それによって腫瘍細胞の増殖を間接的に阻害することによって、癌の増殖に対して直接および/または間接的な効果を有してもよい。本発明の方法は、細胞を処理、例えば、細胞増殖を阻害、または細胞を除去もしくは死滅するために十分な量で、E T 2リガンドと細胞を接触させる工程を包含する。このリガンドは細胞傷害性の実体を含み得る。本発明の方法は、例えば、障害、例えば、癌性障害（例えば、悪性障害もしくは転移性障害）、または非癌性障害（例えば、良性または過形成性の障害）を処置または予防するために有効な量でE T 2リガンドを投与することによって、例えば、このような障害を処置または予防するために使用され得る

40

50

。

【0066】

ET2活性を増加するET2リガンドは、例えば、障害（タンパク質の増加および血管新生の増加が所望される障害）を処置または予防するために使用され得る。例えば、このリガンドは、創傷を処置するため（例えば、創傷治癒を補助するために）使用され得る。例えば、この創傷は、裂傷、熱傷、または外科的切開であり得る。

【0067】

対象の方法は、培養中の細胞上で、例えば、インビトロまたはエキソビボで使用され得る。例えば、癌性または転移性の細胞（例えば、肺癌、乳癌、腎臓癌、尿路上皮癌、結腸癌、前立腺癌、もしくは肝臓癌、または転移性細胞）が培養培地中でインビトロで培養され得、および接触工程が培養培地にET2リガンドを加えることによってもたらされ得る。この方法は、インビボ（例えば、治療的または予防的）プロトコールの一部として、被験体中に存在する細胞（例えば、癌細胞または転移性細胞）上で実行され得る。インビボの実施形態のために、接触工程が被験体中でもたらされこれは、細胞へのリガンドの結合、および処置、例えば、細胞増殖および/もしくは細胞分裂の阻害または細胞の死滅もしくは除去の両方を可能にするために有効な条件下で被験体にET2リガンドを投与する工程を包含する。

10

【0068】

本発明の方法は、望ましくない血管新生、例えば、癌性障害（例えば、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、および転移病巣を含むがこれらに限定されない）によって特徴付けられる障害を処置または予防するために使用され得る。固形腫瘍の例には、悪性腫瘍、例えば、種々の器官系の肉腫、腺癌、および癌腫、例えば、肺、胸部、リンパ、胃腸（例えば、結腸）、および尿生殖路（例えば、腎臓細胞、尿路上皮細胞）、咽頭に影響を与えるもの、ならびに悪性腫瘍を含む腺癌、例えば、大部分の結腸癌、直腸癌、腎臓細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸の癌、および食道の癌が含まれる。上述の癌の転移病巣はまた、本発明の方法および組成物を使用して処置および予防され得る。

20

【0069】

本発明の方法は、例えば、ET2活性を増加させるET2リガンドを使用して、血管新生の増加が所望される障害を処置および予防するために使用され得る。

【0070】

被験体は、哺乳動物、例えば、霊長類、好ましくは高等霊長類、例えば、ヒト（例えば、本明細書に記載される障害、例えば、癌を有する、またはそのリスクがある患者）であり得る。

30

【0071】

抗ET2抗体またはそのフラグメント、例えば、本明細書に記載されるような抗ET2抗体またはそのフラグメントは、全身的に（例えば、経口的、非経口的、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻内、経皮的、または吸入によって）、局所的に、または粘膜（例えば、鼻、喉、および気管支など）への適用によって投与され得る。1つの実施形態において、タンパク質は、インビボで血管新生および/または腫瘍増殖の部位に蓄積する。

【0072】

本発明の方法は、被験体を、例えば、以下の減少：腫瘍サイズの減少；癌マーカーの減少；例えば、骨のスカンにおける新規な障害の出現の減少；新規な疾患関連症候群の出現の減少；または軟部組織塊のサイズの減少もしくは安定化；または臨床的結果の改善に関する任意のパラメーターの1つ以上の減少についてモニターする工程をさらに包含し得る。被験体は、以下の期間の1つ以上においてモニターされ得る：処置の開始前；処置の間；または処置の1つ以上の要素が投与された後。モニタリングは、同じET2リガンドを用いるさらなる処置についての必要性、またはさらなる薬剤を用いるさらなる処置についての必要性を評価するために使用され得る。一般的に、上記のパラメーターの1つ以上の減少は、被験体の状態の改善の指標である。

40

【0073】

50

E T 2 リガンドは、非結合体化で単独で使用され、それによってE T 2 発現細胞の増殖を除去、死滅、または阻害し得る。例えば、リガンドが抗体である場合、除去、死滅、または増殖の阻害は、補体媒介細胞溶解および/またはエフェクター細胞媒介細胞死滅などの抗体依存性細胞死滅メカニズムによって媒介され得る。他の実施形態において、E T 2 リガンドは、E T 2 発現細胞を死滅または除去するために有効な物質、例えば、細胞傷害性薬剤または部分に結合され得る。例えば、E T 2 リガンドは、放射性イオン（例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、または ^{125}I - 放射体）、例えば、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテニウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、またはビスマス（ ^{213}Bi ）にカップリングされ得る。本発明の方法および組成物は、他の処置様式、例えば、他の抗癌治療および/または抗血管新生治療と組み合わせて使用され得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、上記障害を処置または予防するために有効な量で、細胞傷害性薬剤と組み合わせて、E T 2 リガンド、例えば、抗E T 2 抗体またはそのフラグメントを、被験体に投与する工程を包含する。リガンドおよび細胞傷害性薬剤は、同時にまたは連続的に投与され得る。他の実施形態において、本発明の方法および組成物は、外科的手順および/または放射線手順と組み合わせて使用される。

10

【0074】

別の態様において、本発明は、サンプル中で、インビトロで（例えば、生物学的サンプル、組織生検、例えば、癌性病巣）E T 2 の存在を検出するための方法の特徴とする。対象の方法は、本明細書に記載される障害、例えば、望ましくない血管新生によって特徴付けられる癌性障害または他の障害を、評価、例えば、診断または段階付けするために使用され得る。この方法は以下の工程を包含する：(i) E T 2 リガンドとE T 2 タンパク質との相互作用が起こることを可能にする条件下で、サンプル（および必要に応じて、参照、例えば、コントロール、サンプル）を、本明細書に記載されるようなE T 2 リガンドと接触させる工程；ならびに(ii) E T 2 リガンドとサンプル（および必要に応じて、参照、例えば、コントロール、サンプル）との間の複合体の形成を検出する工程。複合体の形成は、E T 2 タンパク質の存在の指標であり本明細書に記載される処置についての適合性または必要性を示し得る。例えば、参照サンプル、例えば、コントロールサンプルと比較して、サンプル中の複合体の形成の統計学的に有意な変化が、サンプル中のE T 2 の存在および/またはレベルの指標である。1つの実施形態において、E T 2 - リガンドは、活性E T 2 を含む複合体と、E T 2 の不活性型（例えば、チモーゲン）を含む複合体との間を認識および/または区別してもよい。

20

30

【0075】

なお別の態様において、本発明は、E T 2 の存在をインビボで検出するための方法を提供する（例えば、被験体中でのインビボ画像化）。対象の方法は、本明細書に記載される障害、例えば、癌性障害または望ましくない血管新生によって特徴付けられる他の障害を評価するため、例えば、診断、局在化、または段階付けするために使用され得る。この方法は以下の工程を包含する：(i) E T 2 リガンドとE T 2 タンパク質との相互作用が起こることを可能にする条件下で、被験体（および必要に応じて、コントロール被験体）を、E T 2 リガンド（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント）と接触させる段階；ならびに(ii) リガンドとE T 2 との間の複合体の形成を検出する工程であって、ここで、参照、例えば、コントロール被験体または被験体のベースラインと比較した被験体中の複合体の形成の統計学的に有意な変化が、E T 2 の存在および/またはレベルの指標である。他の実施形態において、本明細書に記載されるような障害（例えば、望ましくない血管新生によって特徴付けられる癌性障害または他の障害）を診断または段階付けする方法が提供される。この方法は以下の工程を含む：(i) 障害を有する、または障害を有するリスクがある被験体を同定する工程；(ii) 障害の影響を受けた組織または細胞のサンプルを得る工程；(iii) 結合剤およびE T 2 タンパク質の相互作用が起こることを可能にする条件下で、E T 2 リガンドと上記サンプルまたはコントロールサンプルを接触させる工程、ならびに(iv) 複合体の形成を検出する工程。参照サンプル（例えば、コントロールサンプル）に関してリガンドとの間の複合体の形成の統計学的に有意な変化は

40

50

、障害または障害の段階の指標である。

【0076】

好ましくは、インビボおよびインビトロの診断方法において使用されるET2リガンドは、結合したかまたは結合していない結合剤の検出を容易にするために検出可能な物質と直接的または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が含まれる。1つの実施形態において、ET2リガンドは、放射性イオン、例えば、インジウム (^{111}In)、ヨウ素 (^{131}I または ^{125}I)、イットリウム (^{90}Y)、アクチニウム (^{225}Ac)、ビスマス (^{213}Bi)、硫黄 (^{35}S)、炭素 (^{14}C)、トリチウム (^3H)、ロジウム (^{188}Rh)、またはリン (^{32}P) にカップリングされ得る。別の実施形態において、リガンドはNMR造影剤で標識される。

10

【0077】

本発明はまた、一連のアミノ酸配列および核酸配列を含むポリペプチドおよび核酸を提供する。

【0078】

ET2結合リガンドは、血管新生関連障害、特に血管新生依存性癌および腫瘍を処置および妨害するために使用され得る。

【0079】

血管新生関連障害には、固形腫瘍；白血病などの血液由来腫瘍；腫瘍転移；良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫；関節リウマチ）；乾癬；眼の血管新生疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児の網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス；オースラー ウェーバー症候群；心筋血管新生；プラーク新血管新生；毛細血管拡張；血友病性関節；血管線維腫；および創傷肉芽形成が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0080】

「血管新生依存性癌および腫瘍」は、それらの増殖（体積および/または質量の拡大）のために、それらに血液を供給する血管の数および密度の増加を必要とする癌および腫瘍である。1つの実施形態において、ET2結合リガンドは、このような癌および腫瘍の退行を引き起こす。「退行」とは、腫瘍の質量およびサイズの減少、例えば、少なくとも2%、5%、10%、または25%の減少をいう。

30

【0081】

別の態様において、本発明は、癌（例えば、腫瘍）の近傍において、細胞、例えば、内皮細胞、例えば、内皮細胞を接触させる（インビトロ、エキソビボ、またはインビボで）接触させる方法の特徴とする。この方法は、ET2と相互作用するリガンド、例えば、本明細書に記載されるリガンドを提供する工程、およびこのリガンドを、少なくとも1つの検出可能なリガンド-細胞複合体を形成するのに十分な量で接触させる工程を包含し得る。このリガンドには、標識または細胞傷害性の実体、例えば、免疫グロブリンFcドメインまたは細胞傷害性薬物が含まれ得る。

【0082】

本発明はまた、ET2のタンパク質リガンド（例えば、抗体リガンド）を同定するための方法を提供する。1つの実施形態において、方法は、ライブラリーを提供する工程およびET2に結合するタンパク質をコードするメンバーを同定するためにライブラリーをスクリーニングする工程を包含する。スクリーニングは、多数の方法において実行され得る。例えば、ライブラリーは、ディスプレイライブラリー、例えば、ファージディスプレイライブラリーまたはファージミドリブラリーであり得る。ファージ/ファージミドリブラリーは、抗体（例えば、Fab）またはKunitzドメインライブラリーであり得る。ファージディスプレイライブラリーを利用する方法はさらに以下の工程：ET2を結合するファージを回収する工程およびこのファージから核酸を単離する工程を含み得、ここでこの核酸はET2のタンパク質またはポリペプチドリガンドをコードする。このファージは、競合ペプチドを使用して、または緩衝液条件（例えば、pH）を変化させること

40

50

によって、E T 2 から溶出されてもよい。

【0083】

E T 2 は、組換え的に発現され得るか、またはタグ化され得る。E T 2 は、精製され支持体に、例えば、常磁性ビーズまたは他の磁氣的に応答性の粒子に結合される。E T 2 はまた、細胞の表面上で発現され得る。ディスプレイライブラリーは、細胞に特異的に結合するメンバーを同定するためにスクリーニングされ得る（例えば、E T 2 が発現される場合のみに）。E T 2 はヒト E T 2 であり得る。E T 2 は、グリコシル化を除去するために処理または変異され得る。また、E T 2 のフラグメント、例えば、セリンプロテアーゼドメインが使用されてもよい。

【0084】

本明細書において使用される場合、用語「実質的に同一」（または「実質的に相同」）は、第1および第2のアミノ酸またはヌクレオチドの配列が同様の活性を有するように、第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列に対して、十分な数の同一または等価な（例えば、類似の側鎖、例えば、保存性アミノ酸置換を有する）アミノ酸残基またはヌクレオチドを含む第1のアミノ酸またはヌクレオチド配列をいうために本明細書で使用される。抗体の場合においては、第2の抗体は同じ特異性を有し第1の抗体の少なくとも5%、10%、25%、または50%の親和性を有する。

【0085】

本明細書に開示される配列に対して、類似または相同である（例えば、少なくとも約60%、70%、80%、85%、90%、95%の配列同一性）配列もまた、本願の一部である。ある実施形態において、配列同一性は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上であり得る。代替的には、実質的な同一性は、E T 2 リガンドをコードする鎖の相補鎖に対して、選択的ハイブリダイゼーション条件下（例えば、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）でハイブリダイズする。核酸は、全細胞、細胞溶解物、または部分精製された型もしくは実質的に純粋な型で存在してもよい。

【0086】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（これらの用語は本明細書で交換可能に使用される）の計算は以下のようにして実行される。配列は最適比較の目的のためにアラインされる（例えば、ギャップが、最適アラインメントのために第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列が比較目的のために無視され得る）。1つの実施形態において、比較目的のためにアラインされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、およびさらにより好ましくは、少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸の位置およびヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列の位置が、第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、それらの分子は、その位置において同一である（本明細書において使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等価である）。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適アラインメントのために導入される必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0087】

配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。1つの実施形態において、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、NeedlemanおよびWunsch（（1970）J. Mol. Biol. 48 : 444 - 453）アルゴリズムを使用して決定される。これは、GC Gソフトウェアパッケージ（Accelrys, San Diego, CA）におけるGAPプログラムに組み込まれており、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み

10

20

30

40

50

および 1、2、3、4、5、または 6 の長さ重みを使用する。なお別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMPマトリックスならびに40、50、60、70、または80のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用して決定される。特に好ましいパラメーターのセット(および、分子が配列同一性または本明細書の相同性限度の範囲内にあるか否かを決定するためにパラメーターが影響されるべきであることを実施者に確信がない場合に使用されるべきもの)は、12のギャップペナルティー、4のギャップ拡張ペナルティー、および5のフレームシフトギャップペナルティーを有するBlossum 62スコアリングマトリックスである。

10

【0088】

本明細書において使用される場合、用語「相同性」は「類似性」の同義語であり目的の配列が、1つ以上のアミノ酸置換の存在によって参照配列とは異なっている(しかし、少しのアミノ酸の挿入または欠失もまた存在してもよい)ことを意味する。参照配列に対する相同性および類似性の程度を計算する現在好ましい手段は、BLASTアルゴリズム(the National Center of Biotechnology Information (NCBI), National Institutes of Health, Bethesda MDを通して利用可能)の使用を通してであり、各々の場合において、計算された配列の有意性を決定するためにアルゴリズムのデフォルトパラメーターまたは推奨されるパラメーターを使用する。2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の間の同一性パーセントはまた、E. MeyersおよびW. Miller((1989) CABIOS, 4: 11-17)のアルゴリズムを使用して決定され得、これはALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれており、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用する。

20

【0089】

本明細書において使用される場合、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件の下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を実行するためのガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6において見出され得る。水性および非水性の方法がこの参考文献に記載され、いずれかが使用され得る。本明細書で言及される特異的ハイブリダイゼーション条件は以下の通りである: 1) 約45 での6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中の低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて少なくとも50 での0.2xSSC、0.1%SDSにおける2回の洗浄(洗浄の温度は低ストリンジェンシー条件のためには55 まで増加され得る); 2) 約45 での6xSSC中での中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて60 での0.2xSSC、0.1%SDS中での1回以上の洗浄; 3) 約45 での6xSSCにおける高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて65 での0.2xSSC、0.1%SDSにおける1回以上の洗浄; および好ましくは4) 非常に高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、65 での0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDS、続いて65 における0.2xSSC、1%SDS、続いて65 での0.2xSSC、1%SDSにおける1回以上の洗浄である。非常に高いストリンジェンシー条件(4)が好ましい。

30

40

【0090】

本発明の結合剤ポリペプチドことがさらなる保存性または非必須のアミノ酸置換を有してもよく、これがポリペプチドの機能に実質的な効果を有さないことが理解される。特定の置換が許容されるか否か、すなわち、望ましい生物学的特性、例えば、結合活性などに有害内影響を与えないか否かは、Bowieら(1990) Science 247: 1306-1310において記載されるように決定され得る。「保存性アミノ酸置換」は、

50

アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族性側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。

【0091】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を消滅させることなく、またはより好ましくは、生物学的活性を実質的に変化させることなく、野生型配列の結合剤（例えば、抗体）から変化され得る残基であるのに対して、「必須」アミノ酸残基は、このような変化を生じる。

【0092】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、またはスペクトル分析（例えば、蛍光アッセイを使用する）を含む種々の方法によって決定され得る。これらの技術は、リガンド（または標的）濃度の関数として、結合および遊離のリガンドの濃度を測定するために使用され得る。結合リガンドの濃度（[結合]）は、遊離のリガンドの濃度（[遊離]）および標的上のリガンドについての結合部位の濃度と関連し、ここで（N）

は、以下の等式によって、標的分子あたりの結合部位の数である：

$$[\text{結合}] = N \cdot [\text{遊離}] / \left(\left(1 / K_a \right) + [\text{遊離}] \right)$$

【0093】

K_a の正確な決定を行うことは常に必要なことではない。しかし、時折、例えば、ELISAまたはFACS分析などの方法を使用して決定される親和性の定量的な測定を得ることが十分であり、 K_a に比例し、従って、比較のために使用され得、例えば、高い親和性、例えば、2倍高いか否かを決定する。より良好な結合は、参照よりもより高い数値の K_a 、またはより低い数値の K_d によって示され得る。他に注記されない限りは、結合親和性は、pH7のリン酸緩衝化生理食塩水中で決定される。

【0094】

本発明の1つ以上の非限定的な実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明白である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0095】

（詳細な説明）

エンドセリナーゼは、新規な血管新生の間の細胞外マトリックス成分のタンパク質分解性プロセッシングにおけるこれらの酵素の役割に起因する望ましくない血管新生によって特徴付けられる疾患の処置のための魅力的な標的である。エンドセリナーゼ-2（ET2）は、内皮細胞の表面上で発現される膜貫通セリンプロテアーゼである。2つの型のヒトET2、ET-2SおよびET-2L（それぞれ、短型および長型）の例示的な核酸配列およびアミノ酸配列が図1および2に提供される。WO 01/36604を参照されたい。

【0096】

この開示は、とりわけ、高い親和性および選択性でET2を阻害する、ET2に結合するリガンド（例えば、免疫グロブリン）を提供する。この開示はまた、ET2に結合するタンパク質（例えば、抗体）を同定するための方法を提供する。多くの場合において、同定されたタンパク質は、少なくとも部分的に特異的である。

【0097】

10

20

30

40

50

ET2は、II型膜型セリンプロテアーゼであり血管新生関連プロテアーゼのエンドセリナーゼクラスのメンバーである。ET2 RNAは、内皮細胞およびある腫瘍細胞株において発現される(WO 01/36604)。ET2 RNAはまた、他の組織においても検出されてきた。ET2タンパク質は、N末端に膜貫通領域、続いて単一の低密度リポタンパク質-A(LDR-A)レセプタードメインおよび単一のスカベンジャー-レセプターシステインリッチドメインを有する(WO 01/36604)。このC末端は、プロテアーゼドメインの3つの保存性領域において、触媒性3成分残基ヒスチジン、アスパラギン酸、およびセリンの存在によって特徴付けられるトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを含む。ASPA GTP PGRASP配列を有するこれらの反復性配列は、膜貫通性ドメインの近傍に存在し、Nミリスチル化のための配列モチーフを含む(WO 01/36604)。

【0098】

(ディスプレイライブラリー)

1つの実施形態において、ディスプレイライブラリーが、ET2に結合するタンパク質を同定するために使用され得る。ディスプレイライブラリーは、実体のコレクションであり；各実体は、アクセス可能なポリペプチド成分およびポリペプチド成分をコードまたは同定する回収可能成分を含む。ポリペプチド成分は、任意の長さ、例えば、3アミノ酸～300アミノ酸超までであり得る。選択において、ライブラリーの各メンバーのポリペプチド成分はET2でプローブされ、このポリペプチド成分がET2に結合する場合、ディスプレイライブラリーメンバーが、典型的には支持体上での保持によって同定される。

【0099】

保持されたディスプレイライブラリーメンバーは、支持体から回収され分析される。この分析は、類似のまたは類似でない条件下での、増幅および引き続く選択を含み得る。例えば、ポジティブ選択およびネガティブ選択が交互に行われ得る。この分析はまた、ポリペプチド成分のアミノ酸配列を決定すること、および詳細な特徴付けのためのポリペプチド成分の精製を含み得る。

【0100】

種々の形式がディスプレイライブラリーのために使用され得る。例は以下を含む。

【0101】

(ファージディスプレイ)。1つの形式はウイルス、特にバクテリオファージを利用する。この形式は、「ファージディスプレイ」と呼ばれる。ポリペプチド成分は、典型的には、バクテリオファージコートされたタンパク質に共有結合される。連鎖は、コートタンパク質に融合されたポリペプチド成分をコードする核酸の翻訳から生じる。この連鎖は、フレキシブルペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または終止コドンの抑制の結果として取り込まれたアミノ酸を含み得る。ファージディスプレイは、例えば、以下において記載されている：Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Smith(1985) Science 228:1315-1317；WO 92/18619；WO 91/17271；WO 92/20791；WO 92/15679；WO 93/01288；WO 92/01047；WO 92/09690；WO 90/02809；de Haardら(1999) J. Biol. Chem 274:18218-30；Hoogenboomら(1998) Immunotechnology 4:1-20；Hoogenboomら(2000) Immunol Today 2:371-8；Fuchsら(1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hayら(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85；Huseら(1989) Science 246:1275-1281；Griffithsら(1993) EMBO J 12:725-734；Hawkinsら(1992) J Mol Biol 226:889-896；Clacksonら(1991) Nature 352:624-628；Gramら(1992) PNAS 89:3576-3580；Garrardら(1991) Bio/Technology 9:1373-1377；Rebarら(1996) Methods Enzymol. 26

7 : 1 2 9 - 4 9 ; H o o g e n b o o m ら (1 9 9 1) N u c A c i d R e s 1
9 : 4 1 3 3 - 4 1 3 7 ; および B a r b a s ら (1 9 9 1) P N A S 8 8 : 7 9 7
8 - 7 9 8 2 。

【 0 1 0 2 】

ファージディスプレイ系は、糸状ファージ（ファージ f 1、f d、および M 1 3）なら
びに他のバクテリオファージ（例えば、T 7バクテリオファージおよび 型ファージ；例
例えば、S a n t i n i (1 9 9 8) J . M o l . B i o l . 2 8 2 : 1 2 5 - 1 3 5 ; R
o s e n b e r g ら (1 9 9 6) I n n o v a t i o n s 6 : 1 - 6 ; H o u s h m e
t ら (1 9 9 9) A n a l B i o c h e m 2 6 8 : 3 6 3 - 3 7 0 を参照のこと）の
ために開発されてきた。糸状ファージディスプレイ系は、典型的には、マイナーなコート 10
タンパク質（例えば、遺伝子 I I I タンパク質）、および主要なコートタンパク質である
遺伝子 V I I I タンパク質への融合を使用するが、遺伝子 V I タンパク質、遺伝子 V I I
タンパク質、遺伝子 I X タンパク質などの他のコートタンパク質、またはそれらのドメイ
ンへの融合もまた使用され得る（例えば、W O 0 0 / 7 1 6 9 4 を参照のこと）。1つ
の実施形態において、この融合は、遺伝子 I I I タンパク質、例えば、アンカータンパク
質または「基部（s t u m p）」のドメインに対してである（例えば、遺伝子 I I I タン
パク質アンカードメインの記載については米国特許第 5, 6 5 8, 7 2 7 号を参照されたい）。
非ペプチド結合、例えば、非共有結合または非ペプチド共有結合を使用してコート 20
することが示されるタンパク質を物理的に結合することもまた可能である。例えば、ジス
ルフィド結合および / または c - f o s および c - j u n コイルドコイルが、物理的結合
のために使用され得る（例えば、C r a m e r i ら (1 9 9 3) G e n e 1 3 7 : 6 9
および W O 0 1 / 0 5 9 5 0 を参照のこと）。

【 0 1 0 3 】

ポリペプチド成分の結合価もまた制御され得る。例えば、ポリペプチド成分をコードす
る配列の、完全なファージゲノムへのクローニングは、多価ディスプレイを生じる。なぜ
なら、遺伝子 I I I タンパク質のすべての複製がこのポリペプチド成分に融合されるから
である。この系において、遺伝子 I I I に融合されたポリペプチド成分をコードする核酸
は、典型的には 7 0 0 0 ヌクレオチド未満の長さのプラスミド上で提供される。このプラ
スミドはファージの複製基点を含み、その結果、このプラスミドは、このプラスミドを有
する細菌細胞がヘルパーファージ（例えば、M 1 3 K 0 1）で感染されるときに、バクテ 30
リオファージ粒子に取り込まれる。このヘルパーファージは、遺伝子 I I I およびファ
ージの複製およびアセンブリーのために必要である他のファージ遺伝子のインタクトなコピ
ーを提供する。このヘルパーファージは欠損性基点を有し、その結果、ヘルパーファ
ージゲノムは、野生型基点を有するプラスミドと比較して、ファージ粒子には効率的に取り込
まれない。

【 0 1 0 4 】

ポリペプチド成分を表示するバクテリオファージは、増殖され得、そして標準的なファ
ージ調製方法、例えば、増殖培地からの P E G 沈殿を使用して収集され得る。

【 0 1 0 5 】

個々のディスプレイファージの選択後、選択されたペプチド成分をコードする核酸は、 40
選択されたファージを使用して細胞を感染させることによって増幅される。個々のコロニ
ーまたはプラークは拾い上げられ得、対応する核酸は単離および配列決定され得る。

【 0 1 0 6 】

（細胞ベースのディスプレイ）。なおべつの形式において、ライブラリーは細胞ディス
プレイライブラリーである。タンパク質は、細胞、例えば、真核生物細胞または原核生物
細胞の表面上でディスプレイされる。例示的な原核生物細胞には、E . c o l i 細胞、B
. s u b t i l i s 細胞、孢子（例えば、L u ら (1 9 9 5) B i o t e c h n o l o g
y 1 3 : 3 6 6 を参照のこと）。例示的な真核生物細胞には、酵母（例えば、S a c c
h a r o m y c e s c e r e v i s i a e、S c h i z o s a c c h a r o m y c e s
p o m b e、H a n s e u l a、または P i c h i a p a s t o r s）が含まれる。 50

酵母表面ディスプレイは、例えば、BoderおよびWitttrup(1997)Nat. Biotechnol. 15:553-557ならびにWO03/029,456において記載されている。この出願は、Fabフラグメントなどの免疫グロブリンタンパク質をディスプレイするために使用され得る酵母ディスプレイ系、ならびに重鎖および軽鎖の組み合わせを生成するための接合の使用を記載する。

【0107】

1つの実施形態において、変化に富んだ核酸配列が、酵母ディスプレイのためにベクターにクローニングされる。クローニングは、変化に富んだ配列を、ドメイン(または全体)の酵母細胞表面タンパク質、例えば、Aga2、Aga1、Flo1、またはGas1と結合する。これらのタンパク質のドメインは、変化に富んだ核酸配列によってコードされるポリペプチドを、膜貫通ドメインによって(例えば、Flo1)またはリン脂質二重層への共有結合によって(例えば、Gas1)固着し得る。ベクターは、細胞表面上に2つのポリペプチド鎖を発現するように配置され得、その結果、鎖の一方が酵母細胞表面タンパク質に連結される。例えば、2つの鎖は免疫グロブリン鎖であり得る。

10

【0108】

(リボソームディスプレイ)。RNAおよびRNAによってコードされるポリペプチドは、RNAを翻訳しているリボソームを安定化することによって物理的に結合され得る。典型的には、高い二価 Mg^{2+} 濃度および低温が使用される。例えば、Mattheakisら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022およびHanesら(2000)Nat. Biotechnol. 18:1287-92; Hanesら(2000)Methods Enzymol. 328:404-30ならびにSchaffitzelら(1999)J. Immunol. Methods. 231(1-2):119-35を参照のこと。

20

【0109】

(ペプチド-核酸融合物)。別の形式はペプチド-核酸融合物を利用する。ペプチド-核酸融合物は、例えば、RobertsおよびSzostak(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302、ならびに米国特許第6,207,446号に記載されるような共有結合したピューロマイシン基を含むmRNAのインビトロ翻訳によって生成され得る。次いで、mRNAは、DNAに逆転写され得、そしてポリペプチドに架橋され得る。

30

【0110】

(他のディスプレイ形式)。なお別のディスプレイ形式は非生物学的ディスプレイであり、ここでは、ポリペプチド成分がポリペプチドを同定する非核酸タグに結合される。例えば、このタグは、ポリペプチドまたは高周波タグをディスプレイするビーズに結合された化学タグであり得る(例えば、米国特許第5,874,214号を参照のこと)。

【0111】

(骨格)。ディスプレイのための骨格には、抗体(例えば、Fabフラグメント、単鎖Fv分子(scFv)、単ドメイン抗体、ラクダ抗体、およびラクダ化抗体); T細胞レセプター; MHCタンパク質; 細胞外ドメイン(例えば、フィブロネクチンIII型反復、EGF反復); プロテアーゼインヒビター(例えば、Kunitzドメイン、エコチン、BPTIなど); TPR反復; トリホイル構造; ジンクフィンガードメイン; DNA結合タンパク質; 特にモノマー性DNA結合タンパク質; RNA結合タンパク質; 酵素、例えば、プロテアーゼ(特に不活性化プロテアーゼ)、RNase; シャペロン、例えば、チオレドキシン、および熱ショックタンパク質; ならびに細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、SH2ドメインおよびSH3ドメインなど)が含まれ得る。

40

【0112】

骨格ドメインを評価するための適切な判断基準には以下が含まれ得る: (1)アミノ酸配列、(2)いくつかの相同ドメインの配列、(3)三次元構造、および/または(4)一定の範囲のpH、温度、塩分、有機溶媒、オキシダント濃度に対する安定性データ。1つの実施形態において、骨格ドメインは小さく、安定なタンパク質ドメインであり、例え

50

ば、100アミノ酸、70アミノ酸、50アミノ酸、40アミノ酸、または30アミノ酸未満のタンパク質である。このドメインは、1つ以上のジスルフィド結合を含んでもよく、または金属（例えば、亜鉛）をキレートしてもよい。

【0113】

小さな骨格ドメインの例には以下が含まれる：Kunitzドメイン（58アミノ酸、3ジスルフィド結合）、Cucurbita maximaトリプシンインヒビタドメイン（31アミノ酸、3ジスルフィド結合）、グアニリンに関連するドメイン（14アミノ酸、2ジスルフィド結合）、グラム陰性細菌からの熱安定性エンテロトキシンIAに関連するドメイン（18アミノ酸、3ジスルフィド結合）、EGFドメイン（50アミノ酸、3ジスルフィド結合）、クリングルドメイン（60アミノ酸、3ジスルフィド結合）、真菌の炭水化物結合ドメイン（35アミノ酸、2ジスルフィド結合）、エンドセリンドメイン（18アミノ酸、2ジスルフィド結合）、および連鎖球菌G IgG結合ドメイン（35アミノ酸、ジスルフィド結合なし）。

10

【0114】

小さな細胞内骨格ドメインの例には、SH2ドメイン、SH3ドメイン、およびEVHドメインが含まれる。一般的には、任意のモジュールドメイン（細胞内または細胞外）が使用され得る。

【0115】

別の有用な型の骨格ドメインは、免疫グロブリン（Ig）ドメインである。ディスプレイのために免疫グロブリンドメインを使用する方法は以下に記載される（例えば、「抗体ディスプレイライブラリー」を参照のこと）。

20

【0116】

ディスプレイ技術はまた、標的の特定のエピトープに結合するリガンド（例えば、抗体リガンド）を得るために使用され得る。これは、例えば、特定のエピトープを欠くか、またはエピトープ内で、例えば、アラニンで置換されている非標的分子を競合させることを使用することによって行われ得る。このような非標的分子は、標的にディスプレイライブラリーを結合するときの競合分子として、または例えば、洗浄溶液中で、標的に特異的でない解離しているディスプレイライブラリーメンバーを捕捉するためのプレ溶出剤として、以下に記載されるようなネガティブ選択手順において使用され得る。

【0117】

（反復選択）。1つの好ましい実施形態において、ディスプレイライブラリー技術は、反復様式で使用される。第1のディスプレイライブラリーは、標的について1つ以上のリガンドを同定するために使用される。次いで、これらの同定されたリガンドは、第2のディスプレイライブラリーを形成するために変異誘発方法を使用して変化される。次いで、高い親和性リガンドが、例えば、より高いストリンジェンシーまたはより反復性の結合および洗浄条件を使用することによって、第2のライブラリーから選択される。

30

【0118】

ある実行においては、変異誘発は、知られているか、またはおそらく結合界面にある領域に標的化される。例えば、同定されたリガンドが抗体であるならば、変異誘発は、本明細書に記載されたような重鎖または軽鎖のCDR領域に指向され得る。さらに、変異誘発は、CDRの近傍にあるか、またはCDRに隣接するフレームワーク領域に指向され得る。抗体の場合において、変異誘発はまた、例えば、正確な段階的改善を作製するために、1つまたは数個のCDRに限定され得る。同様に、同定されるリガンドが酵素である場合、変異誘発は活性部位および近傍に指向され得る。

40

【0119】

いくつかの例示的な変異誘発技術には以下が含まれる：誤りがちのPCR（Leungら（1989）Technique 1:11-15）、組換え、ランダム切断を使用するDNAシャッフリング（Stemmer（1994）Nature 389-391；「核酸シャッフリング」と呼ばれる）、RACHITT（商標）（Cocora（2001）Nature Biotech. 19:354）、部位特異的変異誘発（Zollee

50

rら(1987)NuclAcids Res 10:6487-6504)、カセット変異誘発(Reidhaar-Olson(1991)Methods Enzymol. 208:564-586)および縮重オリゴヌクレオチドの組み込み(Griffithsら(1994)EMBO J 13:3245)。

【0120】

反復選択の1つの例において、本明細書に記載される方法は、少なくとも標的についての最小結合特異性または最小活性、例えば、1nM、10nM、または100nM未満の結合のための平衡解離定数でET2を結語usルウディスプレイライブラリーからのタンパク質リガンドを最初に同定するために使用される。初期の同定されたタンパク質リガンドをコードする核酸配列は、例えば、初期のタンパク質リガンドと比較して増強された特性(例えば、結合親和性、反応速度論、または安定性)を有する第2のタンパク質リガンドを同定するために、パリエーションの導入のための鋳型核酸として使用される。

10

【0121】

(オフレート選択)。遅い解離速度は、特にポリペプチドとそれらの標的との間の相互作用に関して高い親和性を予測し得るので、本明細書に記載される方法は、標的に対する結合相互作用について、所望される反応速度論的解離速度(すなわち、減少されている)を用いてリガンドを単離するために使用され得る。

【0122】

遅く解離するリガンドをディスプレイライブラリーから選択するために、ライブラリーは、固定化された標的に接触される。次いで、固定化された標的は、非特異的にまたは弱く結合した生体分子を除去する第1の溶液で洗浄される。次いで、結合したリガンドは、飽和量の遊離の標的(すなわち、粒子に結合されない標的の複製)を含む第2の溶液で溶出される。この遊離の標的は、標的から解離する生体分子に結合する。再結合は、はるかに低濃度の固定化標的と比較して、飽和量の遊離の標的によって効果的に妨害される。

20

【0123】

第2の溶液は、実質的に生理学的であるか、またはストリンジェントである溶液条件を有し得る。典型的には、第2の溶液の溶液条件は、第1の溶液の溶液条件と同一である。第2の溶液の画分は、後期の画分から初期の画分を区別するために時間的な順番で収集される。後期の画分は、初期の画分中の生体分子よりも、標的からより遅い速度で解離する生体分子を含む。

30

【0124】

さらに、延長されたインキュベーション後でさえ、標的に結合したままであるディスプレイライブラリーメンバーを回収することもまた可能である。これらは、カオトロピック条件を使用して解離され得るか、または標的に結合したままで増幅され得るかのいずれかである。例えば、標的に結合したファージは、細菌細胞に接触され得る。

【0125】

(特異性についての選択またはスクリーニング)。本明細書に記載されるディスプレイライブラリースクリーニング方法は、非標的分子に結合するディスプレイライブラリーメンバーを廃棄する選択またはスクリーニングのプロセスを含み得る。非標的分子の例には、例えば、抗ET2抗体のFcドメインが含まれる。

40

【0126】

1つの実行において、いわゆる「ネガティブ選択」工程が、標的および関連する非標的分子と、関連するが別個の非標的分子との間を区別するために使用される。ディスプレイライブラリーまたはそのプールは、非標的分子と接触される。非標的に結合しないサンプルのメンバーが収集され、標的分子への結合のための引き続く選択において、または引き続くネガティブ選択のためでさえ、使用される。このネガティブ選択工程は、標的分子に結合するライブラリーメンバーを選択する前、またはその後であり得る。

【0127】

別の実行において、スクリーニング工程が使用される。ディスプレイライブラリーメンバーが、標的分子への結合について単離され、各単離されたライブラリーメンバーは非標

50

的分子（例えば、上記に列挙された非標的）に結合するその能力について試験される。例えば、高スループットELISAスクリーニングが、このデータを得るために使用され得る。ELISAスクリーニングはまた、標的への各ライブラリーメンバーの結合についての定量的データを得るために使用され得る。非標的および標的の結合データが、標的に特異的に結合するライブラリーメンバーを同定するために比較される（例えば、コンピュータおよびソフトウェアを使用して）。

【0128】

（他の発現ライブラリー）

他の型のタンパク質のコレクション（例えば、発現ライブラリー）が、特定の特性（例えば、ET2を結合する能力および/またはET2を阻害する能力）を有するタンパク質を同定するために使用され得、これには、例えば、抗体のタンパク質アレイ（例えば、De Wildtら（2000）*Nat. Biotechnol.* 18:989-994を参照のこと）、gt11ライブラリー、ツーハイブリッドライブラリーなどが含まれる。

10

【0129】

（タンパク質アレイ）。異なるタンパク質が固体支持体上に、例えば、ビーズまたはアレイ上に固定化され得る。タンパク質アレイについては、各々のタンパク質が支持体上の独自のアドレスに固定化される。典型的には、このアドレスは二次元アドレスである。

【0130】

ある実行において、タンパク質を発現する細胞またはファージは、アレイとして使用されるフィルター上で直接的に増殖され得る。他の実行において、組換えタンパク質産生が、タンパク質の少なくとも部分精製されたサンプルを産生するために使用される。部分精製されたサンプルまたは純粋なサンプルはアレイ上に配置される。

20

【0131】

タンパク質アレイを産生する方法は、例えば、以下において記載されている：De Wildtら（2000）*Nat. Biotechnol.* 18:989-994；Luekingら（1999）*Anal. Biochem.* 270:103-111；Ge（2000）*Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII；MacBeathおよびSchreiber（2000）*Science* 289:1760-1763；WO 01/40803およびWO99/51773A1。アレイのためのタンパク質は、高速で、タンパク質、市販のロボット装置（例えば、Genetic Micro SystemsまたはBioRoboticsからのもの）を使用してスポットされ得る。アレイ基材は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面修飾されたガラスであり得る。例えば、このアレイは、例えば、De Wildt、前出において記載されるような抗体のアレイであり得る。

30

【0132】

（多様性）

ディスプレイライブラリーは、ディスプレイされたポリペプチド中の1つ以上の位置でバリエーションを含む。所定の位置におけるバリエーションは合成または天然のものであり得る。あるライブラリーについては、合成と天然の両方の多様性が含まれる。

40

【0133】

（合成的多様性）。ライブラリーは、人工的に合成された配列から生じる多様な核酸配列の領域を含み得る。典型的には、これらは、各所定の位置におけるヌクレオチドの分布を含む縮重オリゴヌクレオチド集団から形成される。所定の配列の包含は、分布に関してはランダムである。合成的多様性の縮重供給源の1つの例は、NNNを含むオリゴヌクレオチドであり、ここでNは等しい割合の4つのヌクレオチドのいずれかである。

【0134】

合成的多様性はまた、例えば、NNNよりも小さな分布に所定のトリヌクレオチドにおける核酸配列中のコドンの数を制限するために、より制約され得る。例えば、このような分布は、コドンのある位置において、4ヌクレオチド未満を使用して構築され得る。さら

50

に、トリヌクレオチド付加技術は、分布をさらに制約するために使用され得る。

【0135】

いわゆる「トリヌクレオチド付加技術」は、例えば、Wellsら(1985) Gene 34:315-323、米国特許第4,760,025号および同第5,869,644号に記載されている。オリゴヌクレオチドは、1度に1コドン(すなわち、トリヌクレオチド)、固体支持体上で合成される。この支持体は、合成のための多くの官能基を含み、その結果、多くのオリゴヌクレオチドが並行して合成される。この支持体は、最初に、第1の位置についてのコドンのセットの混合物を含む溶液に露出される。この単位は保護され、それゆえにさらなる単位が付加されない。第1の混合物を含む溶液は洗い流され、そして固体支持体が脱保護され、それゆえに第2の位置についてのコドンのセットを含む第2の混合物が、結合した第1の単位に付加され得る。このプロセスは、複数のコドンを持続的にアセンブルするために反復される。トリヌクレオチド付加技術は、所定の位置において多数のアミノ酸をコードし得る核酸の合成を可能にする。これらのアミノ酸の頻度は、混合物中のコドンの割合によって調節され得る。所定の位置におけるアミノ酸のさらなる選択は、単一のヌクレオチドの混合物が合成の間に付加される場合と同様に、コドン表の象限に制限されない。

10

【0136】

(天然の多様性)。ライブラリーは、異なる天然に存在する配列から生じる(またはそれに基づいて合成される)多様な核酸配列の領域を含み得る。ディスプレイライブラリーに含まれ得る天然の多様性の例は、免疫細胞中に存在する配列の多様性である(以下もまた参照のこと)。核酸はこれらの免疫細胞から調製され、ポリペプチドディスプレイについての形式に操作される。天然に存在する多様性の別の例は、異なる種の生物間の配列の多様性である。例えば、多様な核酸配列が、環境サンプル、例えば、土壌などから増幅され得、そしてディスプレイライブラリーを構築するために使用され得る。

20

【0137】

(抗体ディスプレイライブラリー)

1つの実施形態において、ディスプレイライブラリーは、多様なポリペプチドのプールを提示し、これらの各々は、免疫グロブリンドメイン、例えば、免疫グロブリン可変ドメインを含む。ディスプレイライブラリーは、例えば、ヒト抗原を認識するヒト抗体または「ヒト化」抗体を同定するために特に有用である。このような抗体は、癌などのヒト障害を処置するための処置として使用され得る。抗体の定常領域およびフレームワーク領域はヒトであるので、これらの処置用抗体は、それら自体が、抗原として認識されかつ標的化されることを回避する可能性がある。定常領域はまた、ヒト免疫系のエフェクター機能を補充するために最適化されてもよい。インビトロディスプレイ選択プロセスは、自己抗原に対する抗体を生成することの通常ヒト免疫系の不可能性を克服する。他の型の抗体発現ライブラリーが使用され得、これには、例えば、抗体のタンパク質アレイ(例えば、De Wildtら(2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994を参照のこと)、gt11ライブラリーなどが含まれる。

30

【0138】

代表的な抗体ディスプレイライブラリーは、VHドメインおよびVLドメインを含むポリペプチドを提示する。「免疫グロブリンドメイン」とは、免疫グロブリン分子の可変ドメインまたは定常ドメインからのドメインをいう。免疫グロブリンドメインは、典型的には、約7個の鎖から形成される2つのシート、および保存性ジスルフィド結合を含む(例えば、A.F.WilliamsおよびA.N.Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6:381-405を参照のこと)。ディスプレイライブラリーは、Fabフラグメントとして(例えば、2つのポリペプチド鎖を使用して)、または単鎖Fvとして(例えば、単一のポリペプチド鎖を使用して)抗体をディスプレイし得る。他の形式もまた使用され得る。

40

【0139】

Fabおよび他の形式の場合と同様に、ディスプレイされた抗体は、軽鎖および/または

50

は重鎖の一部として、1つ以上の定常領域を含み得る。1つの実施形態において、各鎖は、例えば、Fabの場合と同様に、1つの定常領域を含む。他の実施形態において、さらなる定常領域がディスプレイされる。

【0140】

抗体ライブラリーは、多数のプロセスによって構築され得る（例えば、de Haarら（1999）*J. Biol. Chem.* 274:18218-30; Hoogenboomら（1998）*Immunotechnology* 4:1-20およびHoogenboomら（2000）*Immunol Today* 21:371-8を参照のこと）。さらに、各プロセスの要素は、他のプロセスの要素と組み合わせられ得る。これらのプロセスは、バリエーションが単一の免疫グロブリンドメイン（例えば、VHまたはVL）、または複数の免疫グロブリンドメイン（例えば、VHおよびVL）に導入される。このバリエーションは、免疫グロブリン可変ドメインに、例えば、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、およびFR4の1つ以上の領域中に、重鎖および軽鎖の可変ドメインのいずれかおよびその両方のこのような領域を参照して、導入され得る。1つの実施形態において、バリエーションは、所定の可変ドメインの3つすべてのCDRに導入される。別の好ましい実施形態において、このバリエーションは、例えば、重鎖可変ドメインのCDR1およびCDR2に導入される。任意の組み合わせが実行可能である。1つのプロセスにおいて、抗体ライブラリーは、核酸の対応する領域にCDRをコードする多様なオリゴヌクレオチドを挿入することによって構築される。これらのオリゴヌクレオチドは、モノマー性ヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを使用して合成され得る。例えば、Knappikら（2000）*J. Mol. Biol.* 296:57-86は、トリヌクレオチド合成およびオリゴヌクレオチドを受容する操作された制限部位を有する鋳型を使用して、オリゴヌクレオチドをコードするCDRを構築するための方法を記載している。

10

20

【0141】

別のプロセスにおいて、動物、例えば、齧歯類がET2で免疫される。この動物は、必要に応じて、応答をさらに刺激するために抗原でブーストされる。次いで、脾臓細胞が動物から単離され、VHドメインおよび/またはVLドメインをコードする核酸が、ディスプレイライブラリー中での発現のために増幅およびクローニングされる。

【0142】

なお別のプロセスにおいて、抗体ライブラリーは、未処置の生殖系列免疫グロブリン遺伝子から増幅された核酸から構築される。増幅された核酸は、VHドメインおよび/またはVLドメインをコードする核酸を含む。免疫グロブリンをコードする核酸の供給源は以下に記載される。増幅は、例えば、保存性定常領域にアニーリングされるプライマーを用いるPCR、または別の増幅方法を含み得る。

30

【0143】

免疫グロブリンドメインをコードする核酸は、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダ、または齧歯類の免疫細胞から得られ得る。1つの例において、細胞は、特定の特性について選択される。成熟の種々の段階のB細胞が選択され得る。別の例において、B細胞は未処置である。

40

【0144】

1つの実施形態において、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）が、表面結合したIgM、IgD、またはIgG分子を発現するB細胞を分別するために使用される。さらに、IgGの異なるアイソタイプを発現するB細胞が単離され得る。別の好ましい実施形態において、B細胞またはT細胞がインビトロで培養される。これらの細胞は、例えば、フィーダー細胞と用いる培養によって、またはマイトジェンもしくは他の調節試薬、例えば、CD40に対する抗体、CD40リガンドもしくはCD20、ホルボールミリストレート酢酸塩、細菌リポポリサッカリド、コンカナバリンA、フィトヘマグルチニンまたはヤマゴボウマイトジェンなどを加えることによってインビトロで刺激され得る。

【0145】

50

なお別の実施形態において、細胞は、免疫学的障害、例えば、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ、脈管炎、シェーグレン病、全身性硬化症、または抗リン脂質症候群を有する被験体から単離される。この被験体はヒト、または動物 (例えば、ヒト疾患の動物モデル、もしくは類似の障害を有する動物) であり得る。なお別の実施形態において、細胞は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック非ヒト動物から単離される。

【0146】

1つの好ましい実施形態において、細胞は、体細胞超変異のプログラムを活性化している。細胞は、例えば、抗免疫グロブリン抗体、抗CD40抗体、および抗CD38抗体を用いる処理によって、免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異誘発を受けるように刺激され得る (例えば、Bergthorsdottrら (2001) *J Immunol* . 166 : 2228 を参照のこと)。別の実施形態において、細胞は未処置である。

10

【0147】

免疫グロブリン可変ドメインをコードする核酸は、以下の実験方法によって天然のレパートリーから単離され得る。第1に、RNAが免疫細胞から単離される。全長 (すなわち、キャップされている) mRNAが単離される (例えば、仔ウシ腸ホスファターゼを用いる未キャップRNAの分解によって)。次いで、キャップが、タバコ酸性ホスファターゼを用いて除去され、そして逆転写が使用されてcDNAを産生する。

【0148】

第1 (アンチセンス) 鎖の逆転写は、任意の適切なプライマーを用いて任意の様式で行われ得る。例えば、de Haardら (1999) *J. Biol. Chem* 274 : 18218 - 30 を参照のこと。プライマー結合領域は、例えば、免疫グロブリンの異なるアイソタイプを逆転写するために、異なる免疫グロブリン間で一定であり得る。プライマー結合領域はまた、免疫グロブリンの特定のアイソタイプに特異的であり得る。典型的には、プライマーは、少なくとも1つのCDRをコードする配列に対して3'である領域について特異的である。別の実施形態において、ポリ-dTプライマーが使用されてもよい (および重鎖遺伝子について好ましいかもしれない)。

20

【0149】

合成配列は、逆転写された鎖の3'末端にライゲーションされ得る。合成配列は、逆転写後のPCR増幅の間にフォワードプライマーの結合のためのプライマー結合部位として使用され得る。合成配列の使用は、利用可能な多様性を十分に捕捉するために、異なるフォワードプライマーのプールを使用する必要性を取り除き得る。

30

【0150】

次いで、可変ドメインコード遺伝子が、例えば、1回以上のラウンドを使用して増幅される。複数のラウンドが使用される場合、ネスト化プライマーが、忠実度を増加させるために使用され得る。次いで、増幅された核酸が、ディスプレイライブラリーベクターにクローニングされる。

【0151】

核酸配列を増幅するための方法が、増幅のために使用されてもよい。多様性を最大化しこれを偏向しない方法が好ましい。種々の技術が核酸増幅のために使用され得る。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; 米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号、Saikiら (1985) *Science* 230, 1350 - 1354) は、核酸合成のラウンドを駆動するために温度を変化させるサイクルを利用する。転写に基づく方法は、核酸を増幅するためにRNAポリメラーゼによるRNA合成を利用する (米国特許第6,066,457号; 同第6,132,997号; 同第5,716,785号; Sarkerら、*Science* (1989) 244 : 331 - 34; Stoflerら、*Science* (1988) 239 : 491)。NASBA (米国特許第5,130,238号; 同第5,409,818号; および同第5,554,517号) は、DNAサンプルを増幅するために、転写、逆転写、およびRNaseHに基づく分解を利用する。なお他の増幅方法には、ローリングサークル増幅 (RCA; 米国特許第5,854,033

40

50

号および同第6, 143, 495号)ならびに鎖置換増幅(SDA; 米国特許第5, 455, 166号および同第5, 624, 825号)が含まれる。

【0152】

(二次スクリーニング法)

標的に結合する候補ディスプレイライブラリーメンバーを選択する後で、各候補ディスプレイメンバーは、例えば、標的についてのその結合特性をさらに特徴付けするためにさらに分析され得る。各候補ディスプレイライブラリーメンバーは、1回以上の二次スクリーニングアッセイに供せられ得る。このアッセイは、結合特性、触媒特性、阻害特性、生理学的特性(例えば、細胞傷害性、腎臓クリアランス、免疫原性)、構造的特性(例えば、細胞傷害性、オリゴマー化状態)、または別の機能的特性についてであり得る。同じアッセイが、例えば、pH、イオン、または熱の感受性を決定するために、種々の条件を用いて反復して使用され得る。

10

【0153】

適切な場合、アッセイは、ディスプレイライブラリーメンバーを直接的に使用し得、ディスプレイされたポリペプチドをコードする核酸から産生された組換えポリペプチドを使用し得、またはディスプレイされたペプチドの配列に基づいて合成された合成ペプチドを使用し得る。結合特性についての例示的アッセイには以下が含まれる：

(ELISA)。ディスプレイライブラリーによってコードされるポリペプチドはまた、ELISAアッセイを使用する結合特性についてスクリーニングされ得る。例えば、各ポリペプチドは、マイクロタイタープレートに接触され、その底面は標的(例えば、限定量の標的)でコートされている。このプレートは、非特異的に結合したポリペプチドを除去するために緩衝液で洗浄される。次いで、プレートに結合したポリペプチドの量が、ポリペプチド(例えば、ポリペプチドのタグまたは一定の部分)を認識し得る抗体を用いてプレートをプローブすることによって決定される。この抗体は、アルカリホスファターゼなどの酵素に連結され、これは、適切な基質が供給される場合に、比色分析用生成物を産生する。このポリペプチドは、細胞から精製され得、またはディスプレイライブラリー形式において、例えば、糸状バクテリオファージコートへの融合物として、アッセイされ得る。別のバージョンのELISAアッセイにおいて、多様な鎖ライブラリーの各ポリペプチドは、マイクロタイタープレートの異なるウェルをコートするために使用される。次いで、ELISAが、各ウェルを照会するための一定の標的分子を使用して進行する。

20

30

【0154】

(均質結合アッセイ)。候補ポリペプチドの標的との結合相互作用は、均質アッセイを使用して分析され得、すなわち、アッセイのすべての成分が加えられた後で、さらなる液体操作は必要とされない。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が均質アッセイとして使用され得る(例えば、Lakowiczら、米国特許第5, 631, 169号; Stavrianoopoulosら、米国特許第4, 868, 103号を参照のこと)。第1の分子(例えば、画分中で同定された分子)上のフルオロフォア標識は、その発光蛍光エネルギーが、第2の分子が第1の分子に対して近接している場合に、その第2の分子(例えば、標的)上の蛍光標識によって吸収され得るように選択される。第2の分子上の蛍光標識は、それが移動したエネルギーに吸収される場合に、蛍光を発する。標識間のエネルギー移動の効率は分子の間隔をあける距離に関連するので、分子間の空間的な関連性が評価され得る。結合が分子間で起こる状況において、アッセイにおける「アクセプター」分子の蛍光発光は最大であるべきである。FRETによってモニターされるために構成される結合事象は、当該分野において周知である標準的な蛍光検出手段を通して(例えば、蛍光測定装置を使用して)首尾よく測定され得る。第1および第2の結合分子の量を滴定することによって結合曲線が、平衡結合定数を見積もるために生成され得る。

40

【0155】

均質アッセイの別の例は、Alpha Screen(Packard Bioscience, Meriden CT)である。Alpha Screenは、2つの標識されたビーズを使用する。1つのビーズは、レーザーによって励起されたときにシングレッ

50

ト酸素を生成する。他方のピーズは、シングレット酸素が第1のピーズから発散し、それと衝突するとき光シグナルを生成する。この四 Guanilシフェラーゼは、2つのピーズが近接しているときのみ生成する。1つのピーズは、ディスプレイライブラリーメンバーに結合し得、他方は標的に結合し得る。シグナルは、結合の程度を決定するために測定される。

【0156】

均質アッセイは、候補ポリペプチドがディスプレイライブラリービヒクル、例えば、バクテリオファージに結合される間に実行され得る。

【0157】

(表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) (SPR))。ディスプレイライブラリーから単離された分子および標的の結合相互作用は SPR を使用して分析され得る。SPR または生体分子相互作用分析 (Biomolecular Interaction Analysis) (BIA) は、いずれの反応体を標識することもなく、リアルタイムで二特異性相互作用を検出する。BIA チップの結合表面における質量の変化 (結合事象の指標である) は、表面の近傍の光の屈折率の変化を生じる (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学的現象)。屈折率の変化は検出可能なシグナルを生成し、これは、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として測定される。SPR を使用するための方法は、例えば、米国特許第 5,641,640 号; Raether (1988) Surface Plasmon Springer Verlag; Sjolander および Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345 Szaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 ならびに BIAcore International AB (Uppsala, Sweden) によって供給されているオンライン情報源に記載されている。

【0158】

SPR からの情報は、標的への生体分子の結合についての平衡解離定数 (K_d) および反応速度論的パラメーター (K_{on} および K_{off} を含む) の正確かつ定量的な測定を提供するために使用され得る。このようなデータは、異なる生体分子を比較するために使用され得る。例えば、多様な鎖のライブラリーから選択される核酸によってコードされるタンパク質は、標的に対して高い親和性を有する、または遅い K_{off} を有する個体を同定するために比較され得る。この情報はまた、構造-活性相関 (SAR) を構築するために使用され得る。例えば、成熟バージョンの親のタンパク質の反応速度論的パラメーターおよび平衡結合パラメーターは、親のタンパク質のパラメーターと比較され得る。特定の結合パラメーター (例えば、高い親和性および遅い K_{off}) と相関する、所定の位置におけるバリエーションアミノ酸が同定され得る。この情報は、構造的モデリングと組み合わせ得る (例えば、相同性モデリング、エネルギー最小化、または x 線結晶学もしくは NMR による構造決定を使用する)。結果として、タンパク質とその標的との間の物理的相互作用の理解は、他の設計プロセスを導くために、考案および使用され得る。

【0159】

(タンパク質アレイ)。ディスプレイライブラリーから同定されたポリペプチドは、固体支持体上に、例えば、ピーズまたはアレイ上に固定化され得る。タンパク質アレイについては、ポリペプチドの各々が、支持体上の独特のアドレスに固定化される。典型的には、このアドレスは二次元アドレスである。タンパク質アレイは以下に記載される (例えば、診断を参照のこと)。

【0160】

(細胞アッセイ)。候補ポリペプチドのライブラリー (ディスプレイライブラリーまたは他のライブラリーによって以前に同定されたもの) が、宿主細胞にライブラリーを形質転換することによってスクリーニングされ得る。例えば、このライブラリーは、ポリペプチドをコードし発現を指向し、例えば、その結果、ポリペプチドが細胞内で産生され、細胞から分泌され、または細胞表面に結合される、ベクター核酸配列を含み得る。細胞は、

ET2に結合するポリペプチドについて、例えば、細胞表現型または細胞媒介活性の変化によって検出されるように、スクリーニングされ得る。例えば、ET2に結合する抗体の場合において、活性は、細胞または補体媒介細胞傷害性であってもよい。

【0161】

(自動化)

1つの実施形態において、スクリーニング方法の少なくともいくつかの態様が自動化される。自動化方法は、例えば、結合相互作用または酵素相互作用(例えば、ET2活性の阻害)などの、ET2との相互作用を検出するために、抗スループットスクリーニングのために使用され得る。例えば、一次スクリーニングから単離され候補リガンドをコードしているクローンは、アレイ化形式で保存される(例えば、マイクロタイタープレート)。ロボットデバイスは、種々の形式で、例えば、ELISA(精製されたリガンドまたはリガンドをファージディスプレイすることを使用する)、酵素アッセイ、細胞ベースのアッセイなどで、候補リガンドの各々についてのアッセイを設定するために自動的に制御され得る。酵素活性は、例えば、分光学的に、比色分析的に、質量スペクトル分析法を使用して、などを含む種々の方法のいずれかによって検出され得る。

10

【0162】

特定のアッセイ、例えば、結合アッセイ、活性アッセイ、または細胞ベースのアッセイについて各クローンの実行を示すデータは、データベース中に保存され得る。ソフトウェアは、データベースにアクセスするため、および特定の判断基準に合致する、例えば、アッセイについての閾値を超過するクローンを選択するために使用され得る。次いで、ソフトウェアは、保存されたアレイから選択されたクローンを拾い上げ、リガンドをコードする核酸を調製し、リガンドそれ自体を調製し、ならびに/または、それらのメンバーが最初に拾い上げたりガンドの変異されたバリエーションである二次ライブラリーを産生およびスクリーニングするようにロボットアームに指示し得る。

20

【0163】

オートメーションプロセスにおいて利用され得る種々のロボットデバイスには、μウエルプレート運搬システム、磁気ビーズ粒子プロセッサ、液体取り扱いユニット、コロニー拾い上げユニットが含まれる。これらのデバイスは、商業的な供給源、例えば、Autogen(Framingham MA)、Beckman Coulter(USA)、Biorobotics(Woburn MA)、Genetix(New Milton, Hampshire UK)、Hamilton(Reno NV)、Hudson(Springfield NJ)、LabSystems(Helsinki, Finland)、Perkin Elmer Lifesciences(Wellesley MA)、Packard Bioscience(Meriden CT)、およびTecan(Mannedorf, Switzerland)から、特別仕様で構築されるか、または購入され得る。

30

【0164】

(ET2結合抗体を得るための方法)

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、他の方法が、ET2結合抗体を得るために使用され得る。例えば、ET2タンパク質またはその領域は、非ヒト動物、例えば、齧歯類において抗原として使用され得る。

40

【0165】

1つの実施形態において、この非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、マウス抗体産生において欠損しているマウス株を、ヒトIg遺伝子座の大きなフラグメントを用いて操作することが可能である。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する遺伝子に由来する抗原特異的Mabが、産生および選択され得る。例えば、Xenomouse(商標)、Greenら、Nature Genetics 7:13-21(1994)、U.S. 2003-0070185、WO 96/34096(1996年10月31日公開)、およびPCT公開番号PCT/US96/05928(1996年4月29日出願)を参照のこと。

50

【0166】

別の実施形態において、モノクローナル抗体が非ヒト動物から得られ、次いで修飾される(例えば、ヒト化または脱免疫される)。Winterは、本明細書のヒト化抗体を調製するために使用されてもよいCDR移植法を記載している(1987年3月26日に出願されたUK特許出願GB 2188638A;米国特許第5,225,539号)。特定のヒト抗体のCDRのすべてが非ヒトCDRの少なくとも一部で置き換えられてもよく、またはCDRのいくつかのみが非ヒトCDRで置き換えられてもよい。所定の抗原へのヒト化抗体の結合のために必要とされる数のCDRを置き換えることのみが必要である。

【0167】

ヒト化抗体は、ヒトFv可変領域からの等価な配列との抗原結合には直接的には関与しないFv可変領域の配列を置き換えることによって生成され得る。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法は、Morrison, S. L. 1985, Science 229: 1202-1207によって、Oira, 1986, BioTechniques 4: 214によって、およびQueenら、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、および同第5,693,762号によって提供される。これらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも1つから、免疫グロブリンFv可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離、操作、および発現する工程を包含する。このような核酸の供給源は当業者に周知であり、例えば、上記に記載されるように、所定の標的に対する抗体を産生するハイブリドーマから得られてもよい。次いで、ヒト化抗体またはそのフラグメントをコードする組換えDNAは、適切な発現ベクターにクローニングされ得る。

【0168】

ET2結合抗体はまた、WO 98/52976およびWO 00/34317(これらの内容は参照として本明細書に具体的に援用される)において開示される方法によって、ヒトT細胞エピトープの特異的欠失によって修飾されてもよく、または「脱免疫」されてもよい。手短に述べると、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域は、MHCクラスIIに結合するペプチドについて分析され得る;これらのペプチドは、潜在的なT細胞エピトープを提示する(WO 98/52976およびWO 00/34317に定義される通りである)。潜在的なT細胞エピトープの検出のために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピュータモデリングアプローチが適用され得、さらに、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースが、WO 98/52976およびWO 00/34317に記載されるように、V_HおよびV_Lの配列中に存在するモチーフについて検索され得る。これらのモチーフは、18個の主要なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、従って、潜在的なT細胞エピトープを構成する。検出された潜在的なT細胞エピトープは、可変領域中の少数のアミノ酸残基を置換することによって、または好ましくは単一アミノ酸置換によって、除去され得る。可能な保存性置換が作製される限り、しばしば、しかし独占的ではなく、ヒト生殖系列抗体配列におけるこの位置で共通のアミノ酸が使用されてもよい。ヒト生殖系列配列は、Tomlinson, I. A.ら(1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G. P.ら(1995) Immunol. Today 第16巻(5): 237-242; Chothia, D.ら(1992) J. Mol. Bio. 227: 799-817に開示されている。VBASEディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリを提供する(Tomlinson, I. A.ら、MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UKによって編集されている)。脱免疫変化が同定された後、V_HおよびV_Lをコードする核酸は、変異誘発または他の合成方法(例えば、デノボ合成、カセット置換など)によって構築され得る。変異誘発された可変配列は、必要に応じて、ヒト定常領域、例えば、ヒトIgG1または定常領域に融合され得る。

【0169】

ある場合において、潜在的なT細胞エピトープは、抗体機能のために重要であることが知られているか、またはそのことが予測されている残基を含む。例えば、潜在的なT細胞

10

20

30

40

50

エピトープは、CDRに向けて通常偏向している。さらに、潜在的なT細胞エピトープは、抗体の構造および結合のために重要なフレームワーク残基において存在し得る。これらの潜在的なエピトープを除外するための変化は、ある場合において、例えば、変化を有するかまたは有さない鎖を作製および試験することによって、より多くの精査を必要とする。可能である場合、CDRと重複するT細胞エピトープは、CDRの外側の置換によって除外された。ある場合において、CDR内の変化は任意選択のみであり、従って、この置換を有し、および有さないバリエーションが試験されるべきである。他の場合において、潜在的なT細胞エピトープを除外するために必要とされる置換は、抗体結合のために決定的であるかもしれないフレームワーク中の残基位置においてである。これらの場合において、この置換を有するバリエーション、およびこの置換を有さないバリエーションが試験されるべきである。従って、ある場合において、いくつかのバリエーションの脱免疫された重鎖および軽鎖の可変領域が設計され、そして種々の重鎖/軽鎖の組み合わせが、最適な脱免疫化抗体を同定するために試験された。次いで、最終的な脱免疫された抗体の選択は、脱免疫化の程度、すなわち、可変領域に残存する潜在的なT細胞エピトープの数とともに、異なるバリエーションの結合親和性を考慮することによってなされ得る。脱免疫化は、任意の抗体、例えば、ヒト配列を含む抗体、例えば、合成抗体、マウス抗体、他の非ヒトモノクローナル抗体、またはディスプレイライブラリーから単離された抗体を修飾するために使用され得る。

10

【0170】

(生殖系列抗体)

20

1つ以上の生殖系列配列により類似する抗体の可変領域を作製するために、ET2を結合する抗体、例えば、本明細書に記載される抗体を修飾することが可能である。例えば、抗体は、例えば、フレームワークまたはCDR領域において、それを参照生殖系列配列により類似させるために、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を含み得る。1つの例示的な生殖系列法は、単離された抗体の配列に類似する(例えば、特定のデータベースにおいて最も類似する)1つ以上の生殖系列配列を同定する工程を包含し得る。次いで、変異(アミノ酸レベルにおける)が、単離された抗体において、増加的に、組み合わせ、またはその両方のいずれかで作製され得る。例えば、いくつかのまたはすべての可能な生殖系列変異をコードする配列を含む核酸ライブラリーが作製される。次いで、変異した抗体は、例えば、単離された抗体と比較して1つ以上のさらなる生殖系列残基を有しな有用である(例えば、機能的活性を有する)抗体を同定するために評価される。1つの実施形態において、可能な限り、多くの生殖系列残基が、単離された抗体に導入される。

30

【0171】

1つの実施形態において、変異誘発は、CDR領域に1つ以上の生殖系列残基を置換または挿入するために使用される。例えば、生殖系列CDR残基は、修飾される可変領域に類似する(例えば、最も類似する)生殖系列配列からであり得る。変異誘発後、抗体の活性(例えば、結合活性または他の機能的活性)が、生殖系列残基が許容されるか否かを決定するために評価され得る。類似の変異誘発がフレームワーク領域において実行され得る。

40

【0172】

生殖系列配列を選択することは、異なる方法で実行され得る。例えば、生殖系列配列は、これが選択性または類似性についての所定の判断基準(例えば、少なくとも特定の同一性パーセント、例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%の同一性)に合致する場合に、選択され得る。選択は、少なくとも2個、3個、5個、または10個の生殖系列配列を使用して実行され得る。CDR1およびCDR2の場合において、類似の生殖系列配列を同定することは、1つのこのような配列を選択することを含み得るが、別々にアミノ末端部分およびカルボキシ末端部分に寄与する2つの生殖系列配列を使用することを含んでもよい。他の実行において、1つまたは2つより多くの生殖系列配列が

50

、例えば、コンセンサス配列を形成するために使用される。

【0173】

1つの実施形態において、特定の参照可変ドメイン配列、例えば、本明細書に記載される配列に関して、関連する可変ドメイン配列は、参照CDR配列の残基、ヒト生殖系列配列における対応する位置の残基と同一である残基（すなわち、ヒト生殖系列核酸によってコードされるアミノ酸配列）とは同一ではない、CDRアミノ酸位置の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%を有する。

【0174】

1つの実施形態において、特定の参照可変ドメイン配列、例えば、本明細書に記載される配列に関して、関連する可変ドメイン配列は、ヒト生殖系列配列からのFR配列、例えば、参照可変ドメイン配列に関連する生殖系列配列の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%を有する。

【0175】

従って、目的の所定の抗体に対して類似の活性を有するが、1つ以上の生殖系列配列（特に、1つ以上のヒト生殖系列配列）により類似する抗体を単離することが可能である。例えば、抗体は、CDR（例えば、フレームワーク領域）の外側の領域において、生殖系列配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%の同一性であり得る。さらに、抗体は、CDR領域中の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの生殖系列残基を含み得、この生殖系列残基は、修飾される可変領域に対して類似する（例えば、最も類似する）生殖系列配列からである。第1の目的の生殖系列配列は、ヒト生殖系列配列である、抗体の活性（例えば、結合活性）は、もともとの抗体の100、10、5、2、0.5、0.1、および0.001の因数内であり得る。

【0176】

V についての例示的な生殖系列参照配列には以下が含まれる：012/02、018/08、A20、A30、L14、LI、L15、L4/18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、011/01、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10、およびA14。例えば、Tomlinsonら（1995）EMBO J. 14（18）：4628-3を参照のこと。

【0177】

HC可変ドメインについての生殖系列参照配列は、H1およびH2超可変ループにおける特定の標準的構造、例えば、1-3構造を有する配列に基づき得る。免疫グロブリン可変ドメインの超可変ループの標準的構造は、Chothiaら（1992）J. Mol. Biol. 227：799-817；Tomlinsonら（1992）J. Mol. Biol. 227：776-798）；およびTomlinsonら（1995）EMBO J. 14（18）：4628-38に記載されるように、その配列から推測され得る。1-3構造を有する例示的な配列は、DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53、およびDP-54を含む。

【0178】

（リガンド産生）

標準的な組換え核酸方法が、ET2に結合するタンパク質リガンドを発現するために使用され得る。一般的に、タンパク質リガンドをコードする核酸配列は、核酸発現ベクターにクローニングされる。当然、タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含む場合、各鎖は、発現ベクター、例えば、同じ細胞または異なる細胞において発現される同じまたは異なるベクターにクローニングされなければならない。

10

20

30

40

50

【0179】

(抗体産生)。ある抗体(例えば、Fab)は、細菌細胞(例えば、E. coli細胞)中で産生され得る。例えば、Fabが、ディスプレイ実体およびバクテリオファージタンパク質(またはそのフラグメント)の間で抑制可能な終止コドンを含むファージディスプレイベクター中の配列によってコードされる場合、ベクター核酸は、終止コドンを抑制可能でない細菌細胞に移動され得る。この場合において、Fabは遺伝子IIIタンパク質に融合されず、ペリプラズムおよび/または培地に分泌される。

【0180】

抗体はまた、真核生物細胞中で産生され得る。1つの実施形態において、抗体(例えば、scFv)は、Pichia(例えば、Powersら(2001)J Immunol Methods, 251:123-35を参照のこと)、Hansenula、またはSaccharomycesなどの酵母細胞中で発現される。

10

【0181】

1つの好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物細胞中で産生される。クローン抗体またはその抗原結合フラグメントを発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(described in UrlaubおよびChasin(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220によって記載されているdhfr-CHO細胞を含み、DHFR選択マーカーとともに、例えば、KaufmanおよびSharp(1982)Mol. Biol. 159:601-621において記載されるように使用される)、リンパ細胞株、例えば、NS0ミエローマ細胞およびSP2細胞、COS細胞、およびトランスジェニック動物(例えば、トランスジェニック哺乳動物)からの細胞が含まれる。例えば、この細胞は哺乳動物上皮細胞である。

20

【0182】

多様化された免疫グロブリンドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、さらなる配列、例えば、宿主細胞中でベクターの複製を調節する配列(例えば、複製の起点)および選択マーカー遺伝子などを有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号、および5,179,017号を参照のこと)。例えば、典型的には、選択マーカーは、ベクターが導入された宿主細胞に、薬物(例えば、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなど)に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキサート選択/増幅を用いるdhfr宿主細胞における使用のため)およびneo遺伝子(G418選択のため)を含む。

30

【0183】

本発明の抗体、またはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的な系において、抗体の重鎖と抗体の軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによって、dhfr-CHO細胞に導入される。組換え発現ベクターにおいて、抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子は、各々、エンハンサー/プロモーター調節エレメント(例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来、CMVエンハンサー/AΔMLPプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー/AΔMLPプロモーター調節エレメントなど)に作動可能に連結され、高いレベルの遺伝子の転写を駆動する。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサート選択/増幅を使用して、ベクターでトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能にする、DHFR遺伝子を有する。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体の重鎖および軽鎖の発現を可能にするために培養され、インタクトな抗体が培養培地から回収される。標準的な分子生物学的技術が使用されて、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、そして培養培地から抗体を回収する。例えば、ある抗体は、プロテインAまたはプロテインGがカップリングされた担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって単離され得る。

40

50

【0184】

Fcドメインを含む抗体について、抗体産生系は、好ましくは、Fc領域がグリコシル化されている抗体を合成する。例えば、IgG分子のFcドメインは、CH2ドメインのアスパラギン297でグリコシル化されている。このアスパラギンは、ニアンテナ(biantennary)型オリゴサッカリドを用いる修飾のための部位である。このグリコシル化は、Fcレセプターおよび補体C1qによって媒介されるエフェクター機能のために必要とされることが実証されてきた(BurtonおよびWoolf(1992)Adv. Immunol. 51:1-84; Jeffersら(1998)Immunol. Rev. 163:59-76)。1つの実施形態において、Fcドメインは、アスパラギン297に対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳動物発現系において産生される。Fcドメインはまた、他の真核生物の翻訳後修飾を含み得る。 10

【0185】

抗体はまた、トランスジェニック動物によって産生され得る。例えば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック動物の乳腺において抗体を発現する方法を記載している。乳特異的プロモーターおよび目的の抗体をコードする核酸および分泌のためのシグナル配列を含む導入遺伝子が構築される。このようなトランスジェニック哺乳動物の雌によって産生される乳は、そこに分泌された目的の抗体を含む。この抗体は、乳から精製され得るか、またはある応用のためには、直接的に使用される。

【0186】

トランスジェニック動物の生成は当該分野において周知である。トランスジェニックマウスを作製するための1つの方法は以下の通りである。手短に述べると、抗体をコードする標的構築物は、受精した卵母細胞の雄性前核にマイクロインジェクションされる。この卵母細胞は、生存可能な仔に、発生のために、偽妊娠したフォスターマザーの子宮に注入する。いくつかの子孫は導入遺伝子を組み込んでいた。 20

【0187】

(ET2リガンドについてのアッセイ系)

潜在的なET2リガンドは、ET2またはそのフラグメントに向けたそれらの調節活性を測定するアッセイにおいてインビボおよびインビトロでさらに特徴付けされ得る。例えば、ET2は、基質とのET2の反応を可能にするアッセイ条件下で、基質と組み合わせられ得る。このアッセイは、潜在的なET2リガンドの非存在下で、および潜在的なET2リガンドの濃度の増加の存在下で実行される。ET2活性の50%が試験化合物によって阻害されるリガンドの濃度は、この化合物についてのIC₅₀値(阻害濃度)およびEC₅₀(有効濃度)値である。一連の試験リガンドまたはその群の中において、より低いIC₅₀値またはEC₅₀値を有するものは、より高いIC₅₀値またはEC₅₀値を有する化合物よりも、より強力なET2のインヒビターと見なされる。好ましいリガンドは、ET2活性の阻害についてのインビトロアッセイにおいて測定される場合に、100nM未満のIC₅₀値を有する。 30

【0188】

これらのリガンドはまた、ET2に向けた選択性について評価され得る。例えば、潜在的なET2リガンドは、ET2およびセリンプロテアーゼおよび他の酵素のパネルに向けたその効力についてアッセイされ得、そしてIC₅₀値またはEC₅₀値が各酵素標的についで決定され得る。1つの実施形態において、ET2についての低いIC₅₀値またはEC₅₀値、および試験パネル中の他の酵素(例えば、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、トロンピン、第Xa因子)についてより高いIC₅₀値またはEC₅₀値を実証する化合物は、ET2に向けて選択性であると見なされる。1つの実施形態において、ET2についての低いIC₅₀値またはEC₅₀値、およびET2よりもET1についてより高いIC₅₀値またはEC₅₀値を実証する化合物は、ET2に向けて選択性であると見なされる。 40

【0189】

潜在的なET2リガンドはまた、インビボでそれらの活性について評価され得る。例え 50

ば、エンドセリナーゼの阻害を通して腫瘍増殖を減少するリガンドの能力を評価するために、P A I - 1 を評価するために J a n k u n ら、C a n c . R e s . , 5 7 : 5 5 9 - 5 6 3 (1 9 9 7) によって記載される手順が利用され得る。手短に述べると、A T C C 細胞株 D U 1 4 5 および L n C a P が S C I D マウスに注入される。腫瘍が樹立された後、マウスは試験リガンドを投与される。腫瘍体積測定が約 5 週間にわたって 2 回行われる。適切なコントロール化合物（例えば、非特異的抗体分子）を受容する動物と比較して、リガンドが投与された動物が腫瘍体積の減少を示した場合に、このアッセイにおいて活性であると見なされ得る。

【 0 1 9 0 】

転移の出現を減少する、または転移を阻害するリガンドの能力を評価するために、K o b a y a s h i ら、I n t . J . C a n c . , 5 7 : 7 2 7 - 7 3 3 d (1 9 9 4) によって記載される手順が利用され得る。手短に述べると、マウス異種移植片は、C 5 7 B 1 / 6 マウスに静脈内に（実験的転移）または腹壁（自発的転移）に皮下的に注射された高度な肺コロニー形成潜在能力について選択される。試験される種々の濃度の化合物が、注射の前に M a t r i g e l 中で腫瘍細胞と混合され得る。試験化合物の日々の腹腔内注射が、腫瘍接種の 1 ~ 6 日後または 7 ~ 1 3 日後のいずれかで行われる。動物は、腫瘍接種の約 3 または 4 週間後に屠殺され、肺腫瘍コロニーが計数される。得られるデータの評価は、試験化合物の効力、最適用量、および投与の経路に関する決定を可能にする。

10

【 0 1 9 1 】

腫瘍体積および転移の減少に向けてのリガンドの活性は、R a b b a n i ら、I n t . J . C a n c e r 6 3 : 8 4 0 - 8 4 5 (1 9 9 5) において記載されるモデルにおいて評価され得る。X i n g ら、C a n c . R e s . , 5 7 : 3 5 8 5 - 3 5 9 3 (1 9 9 7) もまた参照のこと。ここでは、M a t L y L u 腫瘍細胞がコペンハーゲンラットの脇腹に注射された。これらの動物は、種々の用量の試験化合物を、3 週間まで、継続して投与するために、浸透ポンプが移植された。実験動物およびコントロール動物の腫瘍の質量および体積は、転移の増殖と同様に、実験の間に評価された。得られるデータの評価は、試験化合物の効力、最適用量、および投与の経路に関する決定を可能にする。これらの著者の何人かは、X i n g ら、C a n c . R e s . , 5 7 : 3 5 8 5 - 3 5 9 3 (1 9 9 7) において関連するプロトコールを記載した。

20

【 0 1 9 2 】

新血管新生に向けたリガンドの阻害活性を評価するために、ウサギ角膜新血管新生モデルが利用され得る。例えば、A v e r y ら、A r c h . O p h t h a l m o l . , 1 0 8 : 1 4 7 4 - 1 4 7 5 (1 9 9 0) を参照のこと。このモデルにおいて、ニュージーランドアルビノウサギが麻酔される。中心角膜切開が行われ、放射状核膜ポケットを形成する。遅延放出プロスタグランジンペレットが、新血管新生を誘導するためにポケット中に配置される。試験リガンドが 5 日間腹腔内投与され、次いで動物が屠殺される。試験リガンドの効果が、角膜輪部の定期的に撮影された写真の再調査によって評価される。角膜輪部は、新生血管応答の領域、それゆえに縁部の新生血管新生を計算するために使用され得る。適切なコントロールと比較した場合の新生血管新生の領域の減少は、新生血管新生を減少または阻害する際に試験リガンドが有効であったことを示す。

30

40

【 0 1 9 3 】

血管新生を阻害する際に試験化合物の効果を評価するために使用される例示的な血管新生モデルは、M i n ら、C a n c . R e s . , 5 6 : 2 4 2 8 - 2 4 3 3 (1 9 9 6) によって記載されている。このモデルにおいて、C 5 7 B L 6 マウスは、試験化合物ありおよびなしで、血管新生誘導剤として、b F G F を含む M a t r i g e l 混合物の皮下注射を受容する。5 日後、動物を屠殺し、新血管新生が可視化され得る M a t r i g e l プラグが写真撮影される。M a t r i g e l および有効用量の試験リガンドを受容する実験動物は、コントロール動物またはより少ないかもしくは有効でない用量のリガンドを受容する実験動物よりも、より少ない血管新生を示す。

【 0 1 9 4 】

50

原発性腫瘍の伝播を制限するそれらの能力について化合物を試験するために設計されるインビボ系は、Crowleyら、Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 5021-5025 (1993) によって記載されている。ヌードマウスは、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) を発現するように操作された腫瘍細胞 (PC3) を注射される。腫瘍サイズおよび/または転移を減少するそれらの能力について試験される化合物が動物に投与され、腫瘍サイズおよび/または転移性増殖の引き続く測定が行われる。さらに、種々の器官において検出されたCATのレベルは、転移を阻害する試験化合物の能力の指標を提供し; コントロール動物に対して、処置された動物の組織中でのより少ないCATの検出は、その組織に移動したより少ないCAT発現細胞を示す。

10

【0195】

腫瘍細胞株F311を使用する、試験セリンプロテアーゼインヒビターの阻害ポテンシャルを評価するために設計されたインビボ実験様式は、Alonsoら、Breast Canc. Res. Treat., 40: 209-223 (1996) によって記載されている。このグループは、毒性の決定、腫瘍増殖、侵襲性、自発的転移、実験的肺転移、および血管新生アッセイについてのインビボ研究を記載している。

【0196】

最初にOssowski (J. Cell. Biol., 107: 2437-2445 (1988)) によって記載されたCAMモデル (ニワトリ胚絨毛尿膜モデル) は、試験化合物のプロテアーゼ阻害活性を評価するための別の方法を提供する。CAMモデルにおいて、腫瘍細胞はCAMを含む絨毛尿膜を通して浸潤し、いくつかのセリンプロテアーゼインヒビターの存在下での腫瘍細胞は、膜を通しての腫瘍細胞の浸潤がより少ないか、または浸潤がないことを生じる。従って、CAMアッセイは、種々の濃度の試験化合物の存在下および非存在下でCAMおよび腫瘍細胞を用いて実行される。腫瘍細胞の侵襲性は、化合物の阻害活性の指標を提供するために、このような条件下で測定される。阻害活性を有する化合物は、より少ない腫瘍浸潤と相関する。

20

【0197】

CAMモデルはまた、血管新生をアッセイするために使用され得る (新規な血管の形成に対する効果 (Brooksら、Methods in Molecular Biology, 129: 257-269 (1999)))。このモデルに従うと、血管新生インデューサー (例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) など) を含むフィルターディスクがCAMの上に配置される。CAMへのサイトカインの拡散が局所的血管新生を誘導し、これは、いくつかの方法において、例えば、フィルターディスクのすぐ下のCAM中の血管分岐点の数を計数することによって測定されてもよい。サイトカイン誘導された血管新生を阻害する、同定された化合物の能力は、このモデルを使用して試験され得る。試験化合物は、血管新生インデューサーを含むフィルターディスクに加えられるか、膜に直接的に配置されるか、または全身的に投与されるかのいずれかであり得る。試験化合物の存在下および/または非存在下での新規な血管新生の程度が、このモデルを使用して比較され得る。試験化合物の存在下でのより少ない新規な血管の形成は、抗血管新生活性の指標である。

30

40

【0198】

内皮細胞増殖。候補ET2結合リガンドは、生物学的アッセイ (例えば、ウシ毛細血管内皮細胞増殖アッセイ、ニワトリCAMアッセイ、マウス核膜アッセイ、および移植された腫瘍上のリガンドの効果の評価することなど) を使用して、内皮増殖阻害活性について試験され得る。ニワトリCAMアッセイは、例えば、O'Reillyら「Angiogenic Regulation of Metastatic Growth」Cell, 第79巻(2), 1994年10月21日, 315-328頁によって記載されている。手短に述べると、インタクトな卵黄を有する3日齢ニワトリ胚が卵から単離され、ペトリ皿に配置される。3日間のインキュベーション後、試験されるタンパク質を含むメチルセルロースディスクが、個々の肺のCAMに適用される。48時間のインキュベーション

50

ン後、内皮増殖が阻害されたか否かを決定するために、胚およびCAMが観察される。マウス核膜アッセイは、疑いのある内皮増殖インヒビターを含む別のペレットとともに、増殖因子含有ペレットをマウスの核膜に移植する工程、および核膜において構成される毛細血管のパターンを観察する工程を包含する。

【0199】

血管新生。血管新生は、例えば、種々のヒト内皮細胞系、例えば、臍静脈、冠状動脈、または真皮細胞などを使用してアッセイされてもよい。適切なアッセイには、増殖を測定するためのAlamar Blueアッセイ(Biosource Internationalより利用可能)；蛍光分子を使用する移動アッセイ、例えば、血管新生エンハンサーおよびサプレッサーの存在下または非存在下で膜を通しての細胞の移動を測定するためのBecton Dickinson Falcon HTS FluoroBlock細胞培養挿入物の使用など；およびMatrigel(商標)(Becton Dickinson)上での内皮細胞による管状構造の形成に基づく管形成アッセイが含まれる。

10

【0200】

細胞接着。細胞接着アッセイは、候補ET2結合リガンドの存在下または非存在下で、精製接着タンパク質への細胞の接着、または互いへの細胞の接着を測定する。細胞-タンパク質アッセイは、精製タンパク質への細胞の接着を調節する薬剤の能力を測定する。例えば、組換えタンパク質が産生され、PBS中で2.5g/mLに希釈され、そしてマイクロタイタープレートのウェルをコートするために使用される。ネガティブコントロールのために使用されるウェルはコートされない。次いで、コートされたウェルは洗浄され、1%BSAでブロックされ、そして再度洗浄される。化合物は、最終的な試験濃度の2倍まで希釈され、そしてブロックされ、コートされたウェルに加えらる。次いで、細胞がウェルに加えられ、未結合の細胞が洗い流される。保持された細胞は、膜透過性の蛍光色素(例えば、カルセイン-AM)を加えることによってプレート上で直接的に標識され、そしてシグナルが蛍光マイクロプレートリーダー中で定量される。

20

【0201】

細胞-細胞接着アッセイは、互いへの細胞の結合を調節する、候補ET2結合リガンドの能力を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、選択の接着タンパク質を天然にまたは組換え的に発現する細胞を使用し得る。例示的なアッセイにおいて、細胞接着タンパク質を発現する細胞は、他の細胞(より多くの同じ細胞型、またはその細胞が接着する別の型の細胞)と一緒にマルチウェルプレートのウェル中にプレートされる。接着し得る細胞は、膜透過性の蛍光色素(例えば、BCECF)で標識され、候補リガンドの存在下で単層に接着することが可能にされる。未結合細胞は洗い流され、結合した細胞は、蛍光プレートリーダーを使用して検出される。高スループット細胞接着アッセイもまた記載されている。例えば、Falsey JRら、Bioconjug Chem. 2001年5月-6月; 12(3): 346-53を参照のこと。

30

【0202】

細管形成。細管形成アッセイは、培養細胞、一般的には内皮細胞の、細胞外マトリックスの環境を一般的にシミュレートする、マトリックス基材上の細管構造を形成する能力をモニターするために使用され得る。例示的な基材には、Matrigel(商標)(Becton Dickinson)、ラミニンを含む基底膜タンパク質の抽出物、IV型コラーゲン、および4では液体であり、37では固体ゲルを形成するヘパリン硫酸プロテオグリカンが含まれる。他の適切なマトリックスには、コラーゲン、フィブロネクチン、および/またはフィブリンなどの細胞外成分が含まれる。細胞は、プロ血管新生刺激剤を用いて刺激され、細管を形成するそれらの能力は画像処理によって検出される。細管は、一般的には、刺激との一晩のインキュベーション後に検出され得るが、より長いまたはより短い時間フレームもまた、使用されてもよい。細管形成アッセイは、当該分野において周知である(例えば、Jones MKら、1999, Nature Medicine 5: 1418-1423)。これらのアッセイは、伝統的に、血清を用いる、

40

50

または増殖因子 FGF もしくは VEGF を用いる刺激を含んでいる。1つの実施形態において、このアッセイは、1種以上のプロ血管新生剤、例えば、炎症性血管新生因子（例えば、TNF- α 、FGF、VEGF、ホルポールミリストレート酢酸塩（PMA）、TNF- α 、エフリンなど）の存在下で実行される。

【0203】

細胞移動。内皮細胞移動についての例示的なアッセイは、ヒト微小血管内皮（HMVEC）移動アッセイである。例えば、Tolismaら、(1993) J. Cell Biol 122, 497-511を参照のこと。移動アッセイは当該分野において公知である（例えば、Paik J Hら、2001, J Biol Chem 276:11830-11837）。1つの例において、培養された内皮細胞は、代表的な細胞サイズよりも一般的に小さなポアサイズを有する、マトリックスコートされた多孔性薄膜に播種される。この薄膜は、典型的には、トランスウェルポリカーボネートメンブレン（Corning Costar Corporation, Cambridge, Mass.）などのメンブレンであり一般的には、プロ血管新生性刺激を含むより低いチャンバーと接触している液体中にあるより高いチャンバーの一部である。移動は、一般的には、刺激との一晚のインキュベーション後にアッセイされ得るが、より長いまたはより短い時間フレームもまた、使用されてもよい。移動は、薄膜を横切った細胞の数として評価され、そしてヘモキシリン溶液（VWR Scientific.）で細胞を染色することによって、または細胞数を決定するためのいずれかの他の方法によって検出されてもよい。別の例示的な設定において、細胞は蛍光標識され、移動は、蛍光の読み取りを使用して、例えば、Falcon HTS FluoroBlok（Becton Dickinson）を使用して検出される。刺激の非存在下である程度の移動が観察されるのに対して、移動は、プロ血管新生因子に応答して、非常に増大する。このアッセイは、内皮細胞移動に対するET2結合リガンドの効果を試験するために使用され得る。

【0204】

出芽アッセイ。例示的な出芽アッセイは、コラーゲンゲルベースのマトリックス中に包埋された内皮細胞の、細胞数で規定された球状体凝集を使用する、三次元インビトロ血管新生アッセイである。この球状体は、細胞外マトリックスへの侵入によって、毛細管様構造の出芽のため（「細胞出芽」と呼ばれる）、およびネットワークを吻合する複合体の引き続く形成の開始点として働き得る（KorffおよびAugustin, 1999, J Cell Sci 112:3249-58）。1つの例示的な実験設定において、球状体は、400個の臍静脈内皮細胞（HMVEC）を、非接着性96ウェルプレートの個々のウェルにピペティングし、一晚の球状体凝集を可能にすることによって調製する（KorffおよびAugustin, J Cell Biol 143:1341-52, 1998）。球状体は収集され、900 μ lのメトセル-コラーゲン溶液中に播種され、そして24ウェルプレートの個々のウェルにピペティングされ、コラーゲンゲル重合を可能にする。試験薬剤は、ゲルの上端に試験物質の10倍ワーキング希釈100 μ lをピペティングすることによって、30分後に加えられる。プレートは37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートされる。ディッシュは、パラホルムアルデヒドの添加により、実験のインキュベーション時間の終わりに固定される。内皮細胞の出芽強度は、自動画像分析システムによって定量され得、球状体あたりの累積的な出芽の長さを決定する。

【0205】

ある実施形態において、ET2結合リガンドは、本明細書に記載されるアッセイ、例えば、本明細書に記載される細胞アッセイにおいて統計学液に有意な効果を有する。

【0206】

（薬学的組成物）

別の態様において、本発明は、ET2リガンド、例えば、ET2に結合するとして同定されたか、または本明細書に記載される、抗体分子、他のポリペプチド、またはペプチドを含み、薬学的に受容されるキャリアとともに製剤化される組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。本明細書において使用される場合、「薬学的組成物」とは、インビボ加

増処理のための標識されたりガンド、ならびに治療用組成物を含む。

【0207】

本明細書において使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」には、任意のおよびすべての、溶媒、分散媒体、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれ、これらは生理学的に適合可能である。好ましくは、このキャリアは、静脈内、筋肉内、皮下、非経口的、脊髄、または表皮の投与（例えば、注射または注入によって）のために適切である。投与の経路に依存して、活性化合物、すなわち、タンパク質リガンドは、酸の作用、およびその化合物を不活性化するかもしれない他の天然の条件からその化合物を保護するための物質中でコートされてもよい。

【0208】

「薬学的に受容可能な塩」とは、親の化合物の所望の生物学的活性を保持しいかなる望ましくない毒性効果をも付与しない塩をいう（例えば、Berge, S. M.ら(1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照のこと）。このような塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、非毒性無機酸由来のもの、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸など、ならびに非毒性有機酸由来のもの、例えば、脂肪族モノ-およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などが含まれる。塩基付加塩には、アルカリ土類金属由来のもの、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど、ならびに非毒性有機アミン由来のもの、例えば、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカミン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどが含まれる。

【0209】

本発明の組成物は種々の形態であってもよい。これらには、例えば、液体、半固体、および固体投薬型、例えば、液体溶液（例えば、注射可能溶液および注入可能溶液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸薬、散剤、リポソーム、および坐剤が含まれる。好ましい形態は、意図される投与の様式および治療的適用に依存する。代表的な好ましい組成物は、注射可能または注入可能な溶液の形態であり、例えば、抗体を用いるヒト投与のために使用されるものと類似の組成物である。投与の好ましい様式は非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。1つの実施形態において、ET2リガンドは、静脈内注入または静脈内注射によって投与される。別の好ましい実施形態において、ET2リガンドは、筋肉内注射または皮下注射によって投与される。

【0210】

語句「非経口投与」および「非経口的に投与される」は、本明細書において使用される場合、経腸投与および局所的投与以外の投与の様式を意味し、通常は注射により非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内の注射および注入を含む。

【0211】

薬学的組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で無菌および安定でなくてはならない。薬学的組成物はまた、それが投与のための規制および業界規準に合致することを保証するために試験され得る。例えば、調製物のエンドトキシンレベルは、Limulusアメーバ様細胞溶解物アッセイを使用して（BioWhittakerロット#7L3790、感度0.125 EU/mL）、USP 24/NF 19方法に従って試験され得る。薬学的組成物の無菌性は、USP 24/NF 19方法に従ってチオグリコレート媒体を使用して決定され得る。例えば、調製物は、チオグリコレート媒体を摂取するために使用され、14日間以上、35°Cでインキュベートされる。この媒体は、微生物の増殖を検出するために定期的に検査される。

【0212】

この組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高い薬物濃度のために適切である他の次元の構造として製剤化され得る。滅菌注射溶液は、必要に応

10

20

30

40

50

じて、上記に列挙された成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中で必要とされる量の活性化化合物（すなわち、リガンド）を組み込むことによって、続いて濾過滅菌によって調製され得る。一般的に、分散剤は、塩基性分散媒体および上記に列挙されたものからの必要とされる他の成分を含む滅菌菌ピヒクルに活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、好ましい調製の方法は、活性成分の粉末および前に濾過滅菌したその溶液からの任意のさらなる所望の成分を生じる、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合においては必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンをその組成物中に含めることによってもたらされ得る。 10

【0213】

本発明の抗ET2リガンドは、当該分野で公知の種々の方法によって投与され得るが、多くの適用のためには、投与の好ましい経路/様式は、静脈内注射または静脈内注入である。例えば、治療的適用のためには、ET2リガンドは、約1~100mg/m²または7~25mg/m²の用量に到達するために、30、20、10、5、または1mg/分未満の速度で静脈内注入によって投与され得る。投与の経路および/または様式は、所望の結果に依存して変化する。特定の実施形態において、活性化化合物は、急速な放出に対して化合物を保護するキャリア（例えば、移植体を含む制御放出処方物など）、およびマイクロカプセル化送達系を用いて調製されてもよい。生物分解可能な、生体適合性ポリマーが使用され得、これは例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸である。このような製剤の調製のための多くの方法が特許になり、一般的に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。 20

【0214】

特定の実施形態において、リガンドは、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食性キャリアとともに経口投与されてもよい。化合物（および所望される場合、他の成分）もまた、ハードシェルまたはソフトシェルのゼラチンカプセル中に封入され、錠剤に圧縮され、または被験体の食餌に直接組み込まれてもよい。経口治療剤投与のために、化合物は賦形剤とともに組み込まれてもよく、そして消化可能な錠剤、バツカル錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェファースなどの形態で使用されてもよい。非経口的投与以外によって本発明の化合物を投与するために、その不活性化を妨害するための物質で化合物をコートする、またはその物質とともに化合物を同時投与することが必要であるかもしれない。 30

【0215】

薬学的組成物は、当該分野で公知の医学用デバイスを用いて投与され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号において開示されるデバイスなどの、針のない皮下注射デバイスを用いて投与され得る。本発明において有用である周知の移植体およびモジュールの例には以下が含まれる：米国特許第4,487,603号、これは、制御された速度で医薬を分配するための移植可能な微小注入ポンプを開示する；米国特許第4,486,194号、これは、皮膚を通して医薬を投与するための治療用デバイスを開示する；米国特許第4,447,224号、これは、連続的薬物送達のための変動流移植可能注入装置を開示する；米国特許第4,439,196号、これは、マルチチャンパー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する；および米国特許第4,475,196号、これは、浸透圧薬物送達システムを開示する。当然、多くの他のこのような移植体、送達システム、およびモジュールもまた公知であ 50

る。

【0216】

特定の実施形態において、本発明の化合物は、インビボでの適切な分布を保証するように製剤化され得る。例えば、血液脳関門(BBB)は、多くの高度に親水性の化合物を排除する。本発明の治療用化合物がBBBを通過することを保証するために(所望される場合)、これらは、例えば、リポソーム中で製剤化され得る。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号;同第5,374,548号;同第5,399,331号を参照のこと。リポソームは、特異的な細胞または器官、に選択的に輸送される1つ以上の部分を含んでもよく、従って、標的化された薬物送達を増強してもよい(V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685)。

10

【0217】

投薬レジメンは、最適な所望される応答(例えば、治療的応答)を提供するように調整される。例えば、単回のボラスが投与されてもよく、数回に分けた用量が時間をかけて投与されてもよく、または用量は治療状況の緊急性によって示されるように比例的に減少または増加されてもよい。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために投薬単位形態で非経口組成物を製剤化することがとりわけ有利である。投薬単位形態は、本明細書において使用される場合、処置される被験体のための単位用量として適切な物理的に別々の単位をいい;各単位は、必要とされる薬学的キャリアと共同して、所望の治療効果を生産するように計算された活性化合物の所定の量を含む。本発明の投薬単位形態のための詳細は、(a)活性化合物の独特な特徴および達成される特定の治療的効果、ならびに(b)個体における感受性の処理のためにこのような活性化合物を化合物作製する技術分野における固有の制限によって決定され、ならびにこれらに直接的に依存する。

20

【0218】

本発明の抗体の、治療的または予防的に有効な量のための例示的な、非限定的な範囲は、0.1~20mg/kg、より好ましくは1~10mg/kgである。抗ET2抗体は、約1~100mg/m²または約5~30mg/m²の用量に到達するために、30、20、10、5、または1mg/分未満の速度の静脈内注入によって投与され得る。抗体よりも分子量が小さいリガンドについては、適切な量は比例的に少なくあり得る。投薬量の値は、緩和される状態の型および重篤度に伴って変化するかもしれないことが注目されるべきである。任意の特定の被験体については、特定の投薬レジメンが、個体の必要性および組成物を投与する人または組成物の投与を監督する人の専門的判断に従って、時間をかけて調製されるべきであること、ならびに本明細書に記載される投薬量範囲は例示のみであって、特許請求される組成物の範囲および実施を制限することを意図するものではないことがさらに理解されるべきである。

30

【0219】

本発明の薬学的組成物は、本発明のET2リガンドの「治療有効量」または「予防有効量」を含んでもよい。「治療有効量」とは、所望の治療的結果を達成するために、必要な投薬量および時間の間で、有効である量をいう。組成物の治療有効量は、疾患の状態、年齢、性別、および個体の体重、ならびに個体において所望の応答を誘発するタンパク質リガンドの能力などの要因に従って変動する可能性がある。治療有効量はまた、組成物のいかなる毒性または有害な効果も、治療的に有益な効果の方が上回るものである。「治療有効投薬量」は、好ましくは、測定可能なパラメータを阻害し、例えば、未処置の被験体と比較して、少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、なおより好ましくは少なくとも約60%、およびさらにより好ましくは少なくとも約80%、腫瘍増殖を阻害する。測定可能なパラメータ(例えば、癌)を阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における効力を予測する動物モデル系において評価され得る。代替的には、組成物のこの特性は、熟練した実施者に公知のアッセイによってインビトロでこのような阻害を阻害する化合物の能力を試験することによって評価され得る。

40

【0220】

50

「予防有効量」とは、所望の予防的効果を達成するために、必要な投薬量および時間の間で、有効である量をいう。典型的には、予防用量は、疾患の初期段階の前またはその段階にある被験体において使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【0221】

ET2に結合するタンパク質リガンド、および使用、例えば、治療的、予防的、または診断的な使用のための指示書を含むキットもまた、本発明の範囲内にある。1つの実施形態において、診断的適用のための指示書は、インビトロで、例えば、サンプル、例えば、癌または新生物障害を有する患者からの生検または細胞において、あるいはインビボで、ET2を検出するためのET2リガンド（例えば、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または他のポリペプチドもしくはペプチド）の使用を含む。別の実施形態において、治療的適用のための指示書は、癌または新生物障害を有する患者における、示唆される投薬量および/または投与の様式を含む。このキットはさらに、1つ以上の別個の薬学的調製物中に、適切に製剤化された、少なくとも1種のさらなる試薬、例えば、診断剤もしくは治療剤（例えば、本明細書に記載される診断剤もしくは治療剤）、および/または1種以上のさらなるET2リガンドを含み得る。

10

【0222】

（安定化および保持）

1つの実施形態において、ET2リガンドは、その安定性および/または循環中（例えば、血液、血清、リンパ、もしくは他の組織中）での保持を、少なくとも1.5、2、5、10、または50倍改善する部分と物理的に結合される。

20

【0223】

例えば、ET2リガンドは、ポリマー、例えば、ポリアルキレンオキサイドまたはポリエチレンオキサイドなどの実質的に非抗原性ポリマーと結合され得る。適切なポリマーは、実質的に重量によって変動する。約200～約35,000（または約1,000～約15,000、および2,000～約12,500）の範囲の数平均分子量を有するポリマーが使用され得る。

【0224】

例えば、ET2リガンドは、水溶性ポリマー、例えば、親水性ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンに結合体化され得る。このようなポリマーの非限定的なリストは、ポリアルキレンオキサイドホモポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化ポリオール、そのコポリマーおよびそのブロックコポリマー（ブロックコポリマーの水溶性が維持されるという条件で）を含む。さらなる有用なポリマーには、ポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンなどのポリオキシアルキレン、ならびにポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンのブロックコポリマー（Pluronic）；ポリメタクリレート；カルボマー；分枝または分枝でないポリサッカリド、これはサッカリドモノマーD-マンノース、D-およびL-ガラクトース、フコース、フルクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルクロン酸、シアル酸、D-ガラクトツロン酸、D-マンヌロン酸（例えば、ポリマンヌロン酸またはアルギン酸）、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、D-グルコース、およびノイラミン酸が含まれ、ホモポリサッカリドおよびヘテロポリサッカリド、例えば、ラクトース、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、硫酸デキストラン、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、または酸ムコポリサッカリドのポリサッカリドサブユニット、例えば、ヒアルロン酸；糖アルコールのポリマー、例えば、ポリソルビトールおよびポリマンニトール；ヘパリンまたはヘパロンが含まれる。

30

40

【0225】

他の化合物、例えば、サイトキシン、標識、または別の標的化薬剤、例えば、別のET2リガンドまたは関連のないリガンドもまた、同じポリマーに結合される。モノ活性化されたアルコキシ末端を有するポリアルキレンオキサイド（PAO）、例えば、モノメトキシ末端を有するポリエチレングリコール（mPEG）；C₁₋₄アルキル末端を有する

50

ポリマー；およびビス活性化ポリエチレンオキサイド（グリコール）は、架橋のために使用され得る。例えば、米国特許第5,951,974号を参照のこと。

【0226】

1つの実施形態において、リガンドへの架橋の前のポリマーは、水溶性である必要はないが、好ましくは水溶性である。一般的に、架橋後、生成物は水溶性であり、例えば、少なくとも約0.01mg/ml、およびより好ましくは、少なくとも約0.1mg/ml、およびなおより好ましくは少なくとも約1mg/mlの水溶性を示す。さらに、このポリマーは、結合体型で高度に免疫原性であるべきではなく、また、これは、結合体が静脈内経路によって投与されることが意図されるならば、静脈内注入または静脈内注射と適合可能でない粘性を有するべきではない。

10

【0227】

1つの実施形態において、ポリマーは、反応性である単一の基のみを含む。このことは、互いに対してのリガンド分子の架橋を回避するように補助する。しかし、リガンド分子間の架橋を減少するように反応条件を最大化すること、または実質的に均質な誘導体を回収するために、ゲル濾過またはイオン交換クロマトグラフィーを通して反応生成物を精製することは、本発明の範囲内にある。他の実施形態において、ポリマーは、ポリマーバックボーンに複数のリガンドを連結することの目的のために、2つ以上の反応基を含む。再度、実質的に均質な型の所望の誘導体を回収するために、ゲル濾過またはイオン交換クロマトグラフィーが使用され得る。

【0228】

ポリマーの分子量は、約500,000Dまでの範囲であり得、および好ましくは少なくとも約20,000D、または少なくとも約30,000D、または少なくとも約40,000Dである。選択された分子量は、達成される結合体の有効サイズ、ポリマーの性質（例えば、直鎖状または分枝状などの構造）、および誘導体化の程度に依存し得る。

20

【0229】

共有結合は、ポリマーにET2リガンドを結合するために使用され得、例えば、リガンドのN末端アミノ基、およびリガンドのリジン残基上のアミノ基、ならびに他のアミノ基、イミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、または他の親水性基に架橋する。ポリマーは、多官能性（通常、二官能性）架橋剤の使用を伴うことなく、ET2リガンドに直接的に共有結合されてもよい。アミノ基への共有結合は、塩化シアヌル、カルボニルジイミダゾール、アルデヒド反応基（PEGアルコキシドおよびプロモアセトアルデヒドのジエチルアセタール；PEGおよびDMSOおよび無水酢酸、またはPEGクロライドおよび4-ヒドロキシベンズアルデヒドのフェノキシド、活性化スクシミジルエステル、活性化ジチオカルボネートPEG、2,4,5-トリクロロフェニルクロロホルメートまたはp-ニトロフェニルクロロホルメート活性化PEG）に基づく既知の化学物質によって達成される。カルボキシル基は、カルボジイミドを使用してPEG-アミンをカップリングすることによって誘導体化され得る。スルフヒドリル基は、マレイミド置換PEGにカップリングすることによって誘導体化され得る（例えば、アルコキシ-PEGアミンおよびスルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート）WO 97/10847またはShearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala.から市販されているPEG-マレイミド）。代替的には、リガンド上の遊離のアミノ基（例えば、リジン残基上のアミノ基）が、2-イミノ-チオレン（Traut試薬）を用いてチオール化され得、次いで、例えば、Pedleyら、Br. J. Cancer, 70:1126-1130 (1994)において記載されるように、PEGのマレイミド含有誘導体にカップリングされ得る。

30

40

【0230】

ET2リガンドに結合され得る、官能基化されたPEGポリマーは、例えば、Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.)から入手可能である。このような市販のPEG誘導体には例えば以下が含まれる：アミノ-PEG

50

G、PEGアミノ酸エステル、PEG-ヒドラジド、PEG-チオール、PEG-スクシネート、カルボキシメチル化PEG、PEG-プロピオン酸、PEGアミノ酸、PEGスクシニミジルスクシネート、PEGスクシニミジルプロピオネート、カルボキシメチル化PEGのスクシニミジルエステル、PEGのスクシニミジルカ-ボネート、アミノ酸PEGのスクシニミジルエステル、PEG-オキシカルボニルイミダゾール、PEG-ニトロフェニルカ-ボネート、PEGトレシレート、PEG-グリシジルエーテル、PEG-アルデヒド、PEGビニルスルホン、PEG-マレイミド、PEG-オルトピリジル-ジスルフィド、ヘテロ官能性PEG、PEGビニル誘導体、PEGシラン、およびPEGホスホリド。これらのPEG誘導体をカップリングするための反応条件は、ET2リガンド、PEG化の所望される程度、および利用されるPEG誘導体に依存して変動する可能性がある。PEG誘導体の選択に関連するいくつかの因子には以下が含まれる：結合の所望される点（例えば、リジンまたはシステインのR基）、誘導体の加水分解安定性および反応性、安定性、連結の毒性および抗原性、分析のための適合性など。任意の特定の誘導体の使用のための詳細な指示書は、製造業者から利用可能である。

【0231】

ET2リガンドおよびポリマーの結合体は、例えば、ゲル濾過またはイオン交換クロマトグラフィー、例えば、HPLCによって、未反応の出発物質から単離され得る。異種の結合体は、同じ様式で互いから精製される。異なる種の分解能（例えば、1つまたは2つのPEG残基を含む）もまた、未反応のアミノ酸のイオン特性の違いに起因して可能である。例えば、WO 96/34015を参照のこと。

【0232】

（キット）

本明細書に記載されるET2リガンドは、キットにおいて、例えば、キットの成分として提供され得る。例えば、このキットは、(a) ET2リガンド、例えば、ET2リガンドを含む組成物、および必要に応じて(b) 情報用資料を含む。この情報用資料は、本明細書に記載される方法および/または本明細書に記載される方法のためのET2リガンドの使用に関する、説明的、指示的、営業的、または他の資料であり得る。

【0233】

このキットの情報用資料は、その形態が制限されない。1つの実施形態において、この情報用資料は、化合物の製造、化合物の分子量、濃度、使用期限の日付、バッチまたは製造場所の情報などに関する情報を含み得る。1つの実施形態において、この情報用資料は、本明細書に記載される障害（例えば、血管新生または内皮細胞関連障害）を処置、予防、または診断するためにリガンドを使用することに関する。

【0234】

1つの実施形態において、情報用資料は、本明細書に記載される方法を実行するために適切な様式で、例えば、適切な用量、投薬形態、または投与の様式（例えば、本明細書に記載される用量、投薬形態、または投与の様式）で、ET2リガンドを投与するための指示書を含み得る。別の実施形態において、この情報用資料は、適切な被験体、例えば、ヒト、例えば、血管新生の増加（例えば、癌または転移性癌）を有する、またはそのリスクがあるヒトにET2リガンドを投与するための指示書を含み得る。例えば、この資料は、癌患者、炎症性障害を有する患者、または過度の内皮細胞活性を有する患者にET2リガンドを投与するための指示書を含み得る。

【0235】

このキットの情報用資料は、その形態が制限されない。多くの場合において、情報用資料、例えば、指示書は、印刷物、例えば、印刷された文章、図面、および/または写真で、例えば、ラベルまたは印刷シートで提供される。しかし、情報用資料はまた、他の形式、例えば、コンピュータ読み取り可能な資料、ビデオ録画、または音声録音で提供され得る。別の実施形態において、このキットの情報用資料は、連絡先、例えば、実際の住所、Eメールアドレス、ウェブサイト、または電話番号であり、ここでこのキットのユーザは、本明細書に記載のET2リガンドおよび/または方法におけるその使用に関する実質的

な情報入手し得る。当然、この情報用資料はまた、任意の形式の組み合わせで提供され得る。

【0236】

ET2リガンドに加えて、このキットの組成物は、他の構成成分、例えば、溶媒または緩衝液、安定剤、保存剤、香料（例えば、苦いアンタゴニストおよび甘味料）、芳香剤もしくは他の化粧品成分、および/または本明細書に記載される状態または障害（例えば、癌または炎症）を処置するための第2の薬剤を含み得る。代替的には、他の構成成分はキットに含まれ得るが、ET2リガンドとは異なる組成物または容器に含まれ得る。このような実施形態において、このキットは、ET2リガンドおよび他の構成成分を混合するため、または他の構成成分と一緒にET2リガンドを使用するための指示書を含み得る。

10

【0237】

ET2リガンドは、任意の型、例えば、液体、乾燥型、または凍結乾燥型で提供され得る。ET2リガンドは、実質的に純粋であり、および/または滅菌されていることが好ましい。ET2リガンドが液体溶液で提供される場合、この液体溶液は、好ましくは、水溶液であり、滅菌水溶液が好ましい。ET2リガンドが乾燥型で提供される場合、再構築は、一般的には、適切な溶媒の付加によってである。この溶媒、例えば、滅菌水または緩衝液は、必要に応じてキット中で提供され得る。

【0238】

このキットは、ET2リガンドを含む組成物のための1つ以上の容器を含み得る。ある実施形態において、このキットは、組成物および情報用資料のための、別個の容器、仕切り、または区画を含む。例えば、この組成物は、ボトル、バイアル、またはシリンジ中に含まれ得、そして情報用資料は、プラスチックスリーブまたはパッケージ中に含まれ得る。他の実施形態において、キットの別々の要素は、単一の、分割されていない容器内に含まれる。例えば、組成物はボトル、バイアル、またはシリンジ中に含まれ、これは、そこにラベルの形で付けられた情報用資料を有する。ある実施形態において、このキットは、複数の（例えば、パックの）個別の容器を含み、各々がET2リガンドの1つ以上の単位投薬形態（例えば、本明細書に記載される投薬形態）を含む。例えば、このキットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイールパッケージ、またはプリスターパックを含み、各々がET2リガンドの単回の単位用量を含む。キットの容器は、気密性、防水性（例えば、湿度または蒸発の変化に対して透過性でない）、および/または遮光性であり得る。

20

30

【0239】

このキットは、必要に応じて、組成物の投与のために適切なデバイス、例えば、シリンジ、吸入デバイス、ピペット、ピンセット、計量スプーン、滴下デバイス（例えば、点眼デバイス）、綿棒（例えば、綿棒または木製綿棒）、または任意のこのような送達デバイスを含む。好ましい実施形態において、このデバイスは、計量した用量のリガンドを分配する移植可能なデバイスである。

【0240】

（処置）

ET2リガンドに結合し本明細書に記載の方法によって同定され、および/または本明細書に詳述されるタンパク質リガンドは、治療的および予防的な有用性を有する。例えば、これらのリガンドは、種々の障害（例えば、望ましくない血管新生によって特徴付けられる疾患（例えば、癌）など）を処置、予防、および/または診断するために、培養中の細胞に（例えば、インビトロもしくはエキソビボで）、または被験体中の細胞に（例えば、インビボ）で投与され得る。

40

【0241】

本明細書において使用される場合、用語「処置（処理）する」または「処置（処理）」は、障害、障害の徴候、または障害に向けた素因を治療し、治癒し、緩和し、軽減し、変化させ、修復し、寛解し、改善し、または影響を与える目的で、単独、または第2の薬剤と組み合わせ、被験体（例えば、患者）への抗ET2抗体の適用または投与として、あるいは、障害（例えば、本明細書に記載されるような障害）、障害の徴候、または障害に

50

向けた素因を有する被験体（例えば、患者）から単離された組織または細胞（例えば、細胞株）の薬剤の適用または投与として定義される。細胞を処理するとは、インビトロおよびインビボでの、細胞の阻害、除去、もしくは死滅、またはそれ以外の場合は、異常な細胞が障害、例えば、本明細書に記載されるような障害（例えば、癌性の障害）を媒介する能力を減少させることをいう。1つの実施形態において、「細胞を処理する」とは、細胞（例えば、過剰増殖性細胞）の活性および/または増殖の減少をいう。このような減少は、細胞の全体的な除去を必ずしも意味しないが、細胞の活性または増殖速度の減少（例えば、統計学的に有意な減少）を意味する。

【0242】

本明細書において使用される場合、障害を治療するために有効なET2リガンドの量、または「治療有効量」とは、細胞、例えば、癌細胞（例えば、ET2発現癌細胞）を治療するときに、またはこのような治療の非存在下で予測されるものよりも、本明細書に記載されるような障害を有する被験体の寿命を延長し、被験体の状態を治癒し、緩和し、回復し、もしくは改善するときに、被験体への単回または複数回の用量の投与の際に有効であるリガンドの量をいう。本明細書において使用される場合、新生物の「増殖を阻害する」とは、その増殖および転移を遅延、中断、静止、または停止することをいい、新生物増殖の全体的な除去を必ずしも示すものではない。

10

【0243】

本明細書において使用される場合、障害を予防するために有効なET2リガンドの量、またはリガンドの「予防有効量」とは、障害（例えば、癌）の発症または再発の発生を予防または遅延するときの、被験体における単回または複数回の用量投与の際に有効である、ET2リガンド（例えば、本明細書に記載される抗ET2抗体）の量をいう。

20

【0244】

用語「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「上昇させる」、「増加させる」、「減少させる」などは、例えば、これらが2つの状態の間の定量的な違いを示し、2つの状態の間の違い、例えば、統計学的に有意な違いをいう。例えば、「ET2発現過剰増殖性細胞の増殖を阻害するために有効な量」は、細胞の増殖の速度が、未処理の細胞とは異なる、（例えば、統計学的に有意に異なる）ことを意味する。

【0245】

本明細書において使用される場合、用語「被験体」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。好ましいヒト動物は、異常な細胞増殖または細胞分化によって特徴付けられる障害を有するヒト患者を含む。用語本発明の「非ヒト動物」は、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト哺乳動物（例えば、ニワトリ、両生類、爬虫類）および哺乳動物、例えば、非ヒト類人猿、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタなどを含む。

30

【0246】

1つの実施形態において、被験体はヒト被験体である。代替的には、被験体は、本発明の抗体が交差反応するET2様抗原を発現する哺乳動物であり得る。本発明のタンパク質リガンドは、治療目的のためにヒト被験体に投与され得る（以下でさらに議論される）。さらに、ET2リガンドは、獣医学的目的のため、またはヒト疾患の動物モデルとして、このリガンドが結合するET2様抗原を発現する非ヒト哺乳動物に投与され得る。、後者

40

【0247】

1つの実施形態において、本発明は、細胞（例えば、非癌性細胞、例えば、正常、良性、もしくは過形成細胞、または癌性細胞、例えば、悪性相棒、例えば、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、または転移性病巣において見出される細胞（例えば、腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺、乳房、または肝臓の癌および/または転移において見出される細胞））を治療する（例えば、細胞を除去する、細胞を死滅する、細胞の増殖または細胞分裂を減少する）方法を提供する。本発明の方法は、細胞を治療する（例えば、細胞の増殖または分裂を阻害する、または細胞を除去する、または細胞を死滅する）ために十分な量で、ET2リガ

50

ンド（例えば、本明細書に記載される抗 E T 2 抗体）と細胞を接触させる工程を包含する。

【0248】

対象の方法は、培養中の細胞に対して、例えば、インビトロまたはエキソビボで使用され得る。例えば、癌性細胞または転移性細胞（例えば、腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺、乳房、卵巣、前立腺、または肝臓の癌性細胞または転移性細胞）が、インビトロで培養培地中で培養され得、そして接触工程は、培養培地に E T 2 リガンドを加えることによってもたらされ得る。この方法は、インビトロ（例えば、治療的または予防的）プロトコールの一部として、被験体中に存在する細胞（例えば、癌性細胞または転移性細胞）に対して実行され得る。インビボの実施形態のために、接触工程は、被験体中でもたらされ細胞へのリガンドの結合および治療（例えば、増殖もしくは分裂の阻害、または細胞の死滅もしくは除去）の両方を可能にするために有効な条件下で、被験体に E T 2 リガンドを投与する工程を包含する。

10

【0249】

E T 2 のインヒビターは、血管新生（例えば、制御されないかまたは望ましくない血管新生） - 例えば、血管新生異常および心臓血管障害と関連する血管新生（例えば、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、および動静脈奇形）、慢性炎症性疾患（例えば、糖尿病、炎症性腸疾患、乾癬、および関節リウマチ）、異常な創傷修復（例えば、エキシマレーザー眼手術後に観察されるもの）、循環障害（例えば、Raynaud 現象）、クレスト症候群（例えば、石灰沈着症、食道運動障害）、皮膚科学的障害（例えば、ポートワイン母斑、動脈潰瘍、全身性脈管炎）、または眼の障害（例えば、新生血管疾患によって引き起こされる失明、新生血管緑内障、角膜新生血管新生、トラコーマ、糖尿病性網膜症、および近視性変性）などを減少し得る。例えば、Carmeliet および Jain, Nature, 407: 249 - 257, 2000 を参照のこと。

20

【0250】

この方法は、癌を治療するために使用され得る、本明細書において使用される場合、用語「癌」、「過剰増殖性」、「悪性」、および「新生物」は交換可能に使用され、急速な増殖または新生物によって特徴付けられる異常な状態または症状にある細胞をいう。これらの用語は、侵襲性の組織病理学的な型または段階とは無関係な、すべての型の癌性増殖または発癌プロセス、転位組織または悪性に形質転換した細胞、組織、または器官を含む。「病理学的な過剰増殖」細胞は、悪性腫瘍増殖によって特徴付けられる疾患状態において起こる。

30

【0251】

用語「新生物」の一般的な医学的意味は、正常な増殖制御に対する応答性の喪失として生じる「新規な細胞増殖」、例えば、新生物細胞増殖をいう。「過形成」とは、非常に高速の増殖を受ける細胞をいう。しかし、本明細書において使用される場合、用語新生物および過形成は、それらの状況が示す場合には、交換可能に使用され得、異常な細胞増殖速度を受ける細胞を一般的にいう。新生物および過形成は、「腫瘍」を含み、これは、良性、前悪性、または悪性である可能性がある。

【0252】

癌性障害の例には、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、および転移病巣が含まれるがこれらに限定されない。固形腫瘍の例には、種々の器官系、例えば、肺、乳房、リンパ、胃腸（例えば、結腸）、および尿生殖路（例えば、腎臓細胞、尿路上皮細胞）、咽頭、前立腺、卵巣に影響を与えるものの悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺癌、および癌腫、ならびに悪性腫瘍を含む腺癌、例えば、大部分の結腸癌、直腸癌、腎臓細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸の癌などが含まれる。上述の癌の転移病巣はまた、本発明の方法および組成物を使用して治療および予防され得る。

40

【0253】

対象の方法は、種々の器官系、例えば、肺、乳房、リンパ、胃腸（例えば、結腸）、および尿生殖路、前立腺、卵巣、咽頭、に影響を与えるものの悪性腫瘍、ならびに悪性腫瘍

50

を含む腺癌、例えば、大部分の結腸癌、腎臓細胞癌、前立腺癌および/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸の癌、および食道の癌などを治療する際に有用であり得る。治療され得る例示的な固形腫瘍には以下が含まれる：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、および網膜芽細胞腫。

10

【0254】

用語「癌腫」は、当業者によって認識され、呼吸系癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖器頸癌種、精巣癌腫、乳房癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、および黒色腫を含む、上皮または内分泌組織の悪性腫瘍をいう。例示的な癌腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、および卵巣の組織から掲載されるものが含まれる。この用語はまた癌肉腫を含み、例えば、これは、癌腫組織および肉腫組織から構成される悪性腫瘍を含む。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、またはそこで腫瘍組織が認識可能な腺状構造を形成する癌腫をいう。

【0255】

用語「肉腫」は、当業者に認識され、間葉油対の悪性腫瘍をいう。

20

【0256】

対象の方法はまた、造血起源の、例えば、脊髄、リンパ、または赤血球系統、またはその前駆細胞から生じる、過形成/新生物細胞の増殖を阻害するために使用され得る。例えば、本発明は、急性前骨髄性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）、および慢性骨髄性白血病（CML）（Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol. / Hemotol. 11: 267-97において概説されている）の治療を意図する。対照の方法によって治療され得るリンパの悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（これはB系統ALLおよびT系統ALLを含む）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、ヘアリー細胞白血病（HLL）およびヴァルデンストレーママクログロブリン血症（WM）が含まれるがこれらに限定されない。本発明の治療方法によって意図される悪性リンパ腫のさらなる型は、非ホジキンリンパ腫およびそのバリエーション、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ球白血病（LGF）、およびホジキン病が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0257】

アゴニストであるET2リガンドが、血管新生を刺激するため、例えば、創傷治癒、熱傷、および血管新生の増加を必要とする他の障害を補助するために使用され得る。

【0258】

ET2リガンドを投与する方法は、「薬学的組成物」において記載されている、使用される分子の適切な投薬量は、被験体の年齢および体重、ならびに使用される特定の薬物に依存する。これらのリガンドは、例えば、天然のまたは病理学的薬剤とET2との間の望ましくない相互作用を阻害、減少するための競合剤として使用され得る。

40

【0259】

1つの実施形態において、ET2リガンドは、インビボで、癌性細胞ならびに正常細胞、良性の過形成細胞、および癌性細胞を死滅し、除去し、またはこれらの細胞の増殖を阻害するために使用される。これらのリガンドは、これらだけで使用され得るか、または薬剤、例えば、細胞傷害性薬物、放射性同位元素に結合体化され得る。この方法は：リガンド単独、または細胞傷害性薬物と結合したリガンドを、このような治療を必要とする被験体に投与する工程を包含する。

【0260】

50

用語「細胞傷害性薬剤」および「細胞増殖抑制剤」および「抗腫瘍剤」は、本明細書において交換可能に使用され、過剰増殖細胞、例えば、異常な癌細胞の成長もしくは増殖を阻害し（例えば、細胞増殖抑制剤）、またはこれらの細胞の死滅を誘導する特性を有する薬剤をいう。癌治療の実施形態において、用語「細胞傷害性薬剤」は、新生物（特に、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、または転移病巣）の発生または進行を阻害する薬剤を意味するために、「抗癌」または「抗腫瘍」を交換可能に使用される。

【0261】

抗癌剤の非限定的な例には、例えば、微小管阻害剤、トポイソメラーゼインヒビター、代謝拮抗物質、分裂抑制剤、アルキル化剤、インターカレート剤、シグナル伝達経路を妨害可能な薬剤、アポトーシスを促進する薬剤、放射線、および他の腫瘍関連抗原に対する抗体（裸の抗体、イムノトキシン、および放射性結合体を含む）が含まれる。特定のクラスの抗癌剤の例は以下に詳細に提供される：抗チューブリン/抗微小管、例えば、パクリタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ピノレルピン、タキソテレ；トポイソメラーゼI阻害剤、例えば、トポテカン、カンプトテシン、ドキシソルピシン、エトポシド、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシン、テノポシド、アムサクリン、エピルピシン、メルパロン、ピロキサントロン塩酸塩；代謝拮抗物質、例えば、5-フルオロウラシル（5-FU）、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、リン酸フルダラビン、シタラビン/Ara-C、トリメトトレキサート、ゲムシタピン、アクチビン、アラノシン、ピラゾフリン、N-ホスホルアセチル-L-アスパレート=PALA、ペントスタチン、5-アザシチジン、5-アザ2'-デオキシシチジン、ara-A、クラドリビン、5-フルオロウリジン、FUDR、チアゾフリン、N-[5-[N-(3,4-ジヒドロ-2-メチル-4-オキソキアゾリン-6-イルメチル)-N-メチルアミノ]-2-セノイル]-L-グルタミン酸；アルキル化剤、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシンC、BCNU=カルムスチン、メルファラン、チオテパ、プスルファン、クロラムブシル、プリカマイシン、デカルバジン、硫酸イフォスファミド、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、ウラシルマスタード、ピボプロマン、4-イポメアノール；他の作用のメカニズムを介して作用する薬剤、例えば、ジヒドロレンペロン、スピロムスチン、およびデシペプチド；生物学的応答モディファイアー、例えば、抗腫瘍応答を増強するために、インターフェロンなど；アポトーシス剤、アクチノマイシンDなど；および抗ホルモン、例えば、タモキシフェンなどの抗エストロゲン、または4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3'-(トリフルオロメチル)プロピオンアニリドなどの抗アンドロゲン。

【0262】

ET2リガンドは、通常の内皮細胞を認識する。これらのリガンドはまた、癌性細胞の近傍の細胞に結合し得る。これらのリガンドは、これらの細胞の増殖を阻害し得、および/またはこれらの細胞を死滅し得る。この様式において、リガンドは、栄養、増殖シグナルなどのために周囲の細胞に頼るかもしれない癌性細胞を間接的に攻撃するかもしれない。このように、ET2リガンド（例えば、細胞毒で修飾されている）は、癌性組織（癌性細胞それ自体を含む）中の細胞を選択的に標的とし得る。

【0263】

これらのリガンドは、治療薬物、放射線を放射する化合物、植物、真菌、または細菌起源の生物学的タンパク質、およびこれらの混合物を含む種々の細胞傷害性薬物を送達するために使用されてもよい。細胞傷害性薬物は、例えば、本明細書に記載されるような短距離の高エネルギー放射体を含む、短距離放射線放射体などの細胞内で作用する細胞傷害性薬物であり得る。

【0264】

酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントは、ジフテリア毒素Aフラグメント、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、-サクリン、特定のA

10

20

30

40

50

leurites fordii タンパク質、特定の Dianthin タンパク質、Phytolacca americana タンパク質 (PAP、PAPII、および PAP-S)、Morodica charantia インヒビター、クルシン、クロチン、Saponaria officinalis インヒビター、ゲロニン、ミトグリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシンによって例示される。イムノトキシンの酵素的に活性なポリペプチドを調製するための手順は、W084/03508 および W085/03508 に記載されている。抗体に結合体化され得る細胞傷害性部分の例には、アドリアマイシン、クロラムブシル、ダウノマイシン、メトトレキサート、ネオカルジノスタチン、および白金が含まれる。

【0265】

ポリペプチド毒素の場合において、組換え核酸技術が、翻訳融合物として、リガンド (例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント) をコードする核酸を構築するために使用され得る。次いで、組換え核酸が、例えば、細胞中で発現され、コードされた融合ポリペプチドが単離される。

【0266】

細胞傷害性薬剤とのタンパク質リガンド (例えば、抗体) の結合体化のための手順は以前に記載されている。クロラムブシルを抗体と結合体化するための手順は、Flechner (1973) European Journal of Cancer, 9: 741-745; Ghose ら (1972) British Medical Journal, 3: 495-499; および Szekerke ら (1972) Neoplasma, 19: 211-215 によって記載されている。ダウノルピシンおよびアドリアマイシンを抗体に結合体化するための手順は、Hurwitz, E. ら (1975) Cancer Research, 35: 1175-1181 および Arnon ら (1982) Cancer Surveys, 1: 429-449 によって記載されている。抗体-リシン結合体を調製するための手順は、米国特許第 4, 414, 148 号において、および Osaawa, T., ら (1982) Cancer Surveys, 1: 373-388、およびそこに引用される参考文献によって記載されている。カップリング手順はまた、EP 86309516.2 に記載されている。

【0267】

正常細胞、良性の過形成細胞、または癌性細胞を死滅または除去するために、第1のタンパク質リガンドが、プロドラッグアクチベーターと密接に近接した場合にのみ活性化されるプロドラッグと結合体化される。プロドラッグアクチベーターは、第2のタンパク質リガンド、好ましくは、標的分子上の非競合部位に結合するものと結合体化される。2つのタンパク質リガンドが競合結合部位または非競合結合部位に結合するか否かは、首尾よい競合結合アッセイによって決定され得る。本発明の実施における使用のために適切な薬物-プロドラッグ対は、Blakey ら (1996) Cancer Research, 56: 3287-3292 において記載されている。

【0268】

代替的には、ET2 リガンドは、高エネルギー放射線放射体、例えば、腫瘍部位に配置されたときに、いくつかの細胞直径の死滅を生じる、放射体である ^{131}I などの放射性同位元素にカップリングされ得る。例えば、S.E. Order, 「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin ら (編), 303-316 頁 (Academic Press 1985) を参照のこと。他の適切な放射性同位元素は、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、および ^{211}At などの放射体、ならびに ^{186}Re および ^{90}Y などの放射体が含まれる。さらに、 Lu^{117} もまた、画像化薬剤および細胞傷害性薬剤の療法として使用されてもよい。

【0269】

10

20

30

40

50

^{131}I 、 ^{90}Y 、および ^{177}Lu で標識された抗体を使用する放射免疫療法 (RIT) は、強烈な臨床研究が行われている。これらの3種の核種の物理的特徴には顕著な違いが存在し、結果として、放射性核種の選択は、腫瘍に対して最大放射線量を送達するために非常に決定的である。より高いベータエネルギー粒子の ^{90}Y は、かさ高い腫瘍のために良好である可能性がある。比較的低エネルギーのベータ粒子の ^{131}I は理想的であるが、放射性ヨード化分子のインビボ脱ハロゲン化が、内部移行抗体についての主要な欠点である。対照的に、 ^{177}Lu は、0.2~0.3mmのみの範囲の低エネルギーベータ粒子を有し、 ^{90}Y と比較して骨髄にはるかに低い放射線量を送達する。さらに、より長い物理的半減期 (^{90}Y と比較して) に起因して、腫瘍への存在時間がより長い。結果として、 ^{177}Lu 標識された薬剤のより高い活性 (より多いmCi量) が、骨髄への比較的小さい放射線量を伴って、投与され得る。種々の癌の治療における ^{177}Lu 標識抗体の使用を調べているいくつかの臨床研究が既存の (Mulligan Tら (1995) Clin Cancer Res. 1:1447-1454; Meredith Rら (1996) J Nucl Med 37:1491-1496; Alvarez RDら (1997) Gynecologic Oncology 65:94-101) 。

【0270】

ET2リガンドは、天然の補体依存性細胞傷害性 (CDC) または抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を介して、抗原発現細胞を除去するためにインビボで直接的に使用され得る。本発明のタンパク質リガンドは、IgG1、-2、もしくは-3からのFc部分、または補体を結合するIgMの対応する部分などの補体結合エフェクタードメインを含み得る。1つの実施形態において、標的細胞の集団は、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞でエキソビボ処理される。この処理は、補体および補体を含む血清の添加によって補充され得る。さらに、本発明のタンパク質リガンドでコートされた標的細胞の食作用は、補体タンパク質の結合によって改善され得る。別の実施形態において、補体結合エフェクタードメインを含むタンパク質リガンドでコートされた細胞は、補体によって溶解される。

【0271】

予防のためにET2リガンドを使用する工程を含む、死滅または除去のための方法もまた、本発明に含まれる。例えば、これらの物質は、癌の発症または進行を妨害または遅延させるために使用され得る。

【0272】

癌を治療するための本発明の治療方法の使用は、多数の利点を有する。タンパク質リガンドはET2を特異的に認識するので、他の組織は傷つけられず、高レベルの薬剤が、治療が必要とされる部位に直接的に送達される。本発明に従う治療は、臨床的パラメーターを用いて効果的にモニターされ得る。代替的には、これらのパラメーターは、このような治療がいつ利用されるべきであることを示すために使用され得る。

【0273】

本発明のET2リガンドは、癌を治療するための既存の様式 (外科手術; 放射線治療、および化学療法) の1つ以上と組み合わせて投与され得る。

【0274】

(診断的使用)

ET2に結合し、および本明細書に記載の方法によって同定され、および/または本明細書に詳述されるタンパク質リガンドは、インビトロおよびインビボで、診断的、治療的、および予防的な有用性を有する。

【0275】

1つの態様において、本発明は、インビトロで (例えば、組織、生検などの生物学的サンプル (例えば、癌性組織)) またはインビボで (例えば、被験体中でのインビボ画像処理) ET2の存在を検出するための診断方法を提供する。

【0276】

10

20

30

40

50

この方法は以下の工程を包含する：(i) サンプルをET2リガンドと接触させる工程；および(ii) ET2リガンドとサンプルとの間の複合体の形成を検出する工程。この方法はまた、参照サンプル(例えば、コントロールサンプル)をリガンドと接触させる工程、およびリガンドとサンプルとの間の複合体の形成の程度を、参照サンプルについてのそれに対して比較して、決定する工程。コントロールサンプルまたは被験体と比較した、サンプルまたは被験体における複合体の形成の変化(例えば、統計学的に有意な変化)が、サンプル中のET2の存在の指標であり得る。

【0277】

別の方法は以下の工程を包含する：(i) 被験体にET2リガンドを投与する工程；および(ii) ET2リガンドと被験体との間の複合体の形成を検出する工程。この検出する工程は、複合体の形成の位置または時間を決定することを含み得る。

10

【0278】

ET2リガンドは、結合した抗体または未結合の抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接的または間接的に標識され得る。適切な検出可能な物質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射活性物質が含まれる。

【0279】

ET2リガンドとET2の間の複合体形成は、ET2に結合したリガンドまたは未結合リガンドのいずれかを測定または可視化することによって検出され得る。従来の検出アッセイ(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または組織免疫組織化学)が使用され得る。ET2を標識化することに加えて、ET2の存在が、サンプル中で、検出可能な基質で標識した標準、および未標識のET2リガンドを利用する競合イムノアッセイによってアッセイされ得る。このアッセイの1つの例において、生物学的試料、標識された標準、およびET2結合剤は合わせられ、未標識リガンドに結合した標識された標準の量が決定される。サンプル中のET2の量は、ET2結合剤に結合した標識された標準の量に逆比例する。

20

【0280】

フルオロフォアおよびクロモフォア標識されたタンパク質リガンドが調製され得る。抗体および他のタンパク質は約310nmまでの波長を有する光を吸収するので、蛍光部分は、約310nmより上の波長、および好ましくは400nmより上の波長で実質的な吸収を有するように選択されるべきである。種々の適切な蛍光体およびクロモフォアが、Stryer(1968) Science, 162:526およびBrandら(1972) Annual Review of Biochemistry, 41:843-868によって記載されている。タンパク質リガンドは、米国特許第3,940,475号、同第4,289,747号、および同第4,376,110号において開示されているものなどの従来の手順によって、蛍光クロモフォアで標識され得る。上記の所望の特性の多くを有する蛍光体の1つの群はキサントレン色素であり、これはフルオレセインおよびローダミンを含む。別の群の蛍光化合物はナフチルアミンである。一旦フルオロフォアまたはクロモフォアで標識されると、タンパク質リガンドは、例えば、蛍光顕微鏡(例えば、共焦点顕微鏡または逆重畳積分顕微鏡)を使用して、サンプル中のET2の存在または局在を検出するために使用され得る。

30

40

【0281】

(組織学的分析)。免疫組織化学が、本明細書に記載されるタンパク質リガンドを使用して実行され得る。例えば、抗体の場合においては、抗体は、標識を伴って合成され得(例えば、精製またはエピトープタグ)、または、例えば、標識もしくは標識結合基によって検出可能に標識され得る。例えば、キレート剤が抗体に結合され得る。次いで、抗体は、組織学的調製物、例えば、顕微鏡スライド上にある、組織の固定化切片に接触される。結合のためのインキュベーション後、この調製物は、未結合の抗体を除去するために洗浄される。次いで、この調製物は、抗体がこの調製物に結合したか否かを同定するために、例えば、顕微鏡を使用して分析される。

【0282】

50

当然、抗体（または他のポリペプチドもしくはペプチド）は結合の時点で未標識であり得る。結合および洗浄の後、抗体は、それを検出可能にするために、標識される。

【0283】

（タンパク質アレイ）。ET2リガンドはまた、タンパク質アレイ上に固定化され得る。このタンパク質アレイは、例えば、医学的サンプル（例えば、単離された細胞、血液、血清、生検など）をスクリーニングするための診断用ツールとして使用され得る。当然、タンパク質アレイは、例えば、ET2または他の標的分子に結合する他のリガンドを含み得る。

【0284】

ポリペプチドを産生する方法は、例えば、De Wildtら（2000）*Nat. Biotechnol.* 18: 989-994; Luekingら（1999）*Anal. Biochem.* 270: 103-111; Ge（2000）*Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII; MacBeathおよびSchreiber（2000）*Science* 289: 1760-1763; WO01/40803およびWO99/51773 A1において記載されている。アレイのためのポリペプチドは、例えば、Genetic MicroSystemsまたはBioRoboticsからの、例えば、市販のロボット装置を使用して、高速でスポットされ得る。このアレイ基材は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面修飾ガラスであり得る。このアレイはまた、多孔性マトリックス、例えば、アクリルアミド、アガロース、または別のポリマーに含まれ得る。

10

20

【0285】

例えば、アレイは、例えば、De Wildt、前出によって記載されるような抗体のアレイであり得る。タンパク質リガンドを産生する細胞は、アレイ化形式でフィルター上で増殖され得る。ポリペプチド産生が誘導され、発現したポリペプチドは、細胞の位置でフィルターに固定化される。

【0286】

タンパク質アレイは、多様な鎖ライブラリーからの各々の固定化ポリペプチドへの標的の結合の程度を決定するために、標識した標的と接触され得る。標的が未標識の場合、未標識標的の結合を検出するために、例えば、標識したプローブを使用するサンドイッチ法が使用され得る。

30

【0287】

アレイの各アドレスにおける結合の程度に関する情報は、プロフィールとして、例えば、コンピュータデータベースに保存され得る。タンパク質アレイは、複製中で産生され得、そして結合プロフィールを、例えば、標的および非標的のプロフィールと比較するために使用され得る。従って、タンパク質アレイは、1つ以上の分子に関して所望の結合特性を有する多様な鎖ライブラリーの個々のメンバーを同定するために使用され得る。

【0288】

（FACS（蛍光活性化細胞ソーティング））。ET2リガンドは、細胞、例えば、サンプル（例えば、親のサンプル）中の細胞を標識するために使用され得る。このリガンドはまた、蛍光化合物に結合される（または結合可能である）。次いで、これらの細胞は、蛍光活性化細胞ソーティングを使用して分別され得る（例えば、Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CAから入手可能なソーターを使用する；米国特許第5,627,037号；同第5,030,002号；および同第5,137,809号もまた参照のこと）。細胞がソーターを通過するとき、レーザービームが蛍光化合物を励起し、そのときに検出器が通過する細胞を計数し、蛍光を検出することによって、蛍光化合物が細胞に結合しているか否かを決定する。各細胞に結合した標識の量が、定量および分析されて、サンプルを特徴付けし得る。

40

【0289】

ソーターは、細胞を偏光させ、リガンドによって結合されていない細胞から、リガンド

50

によって結合された細胞を単離し得る。単離された細胞は、培養および/または特徴付けされ得る。

【0290】

(インビボ画像化)。なお別の実施形態において、本発明は、インビボでET2発現癌性組織の存在を検出するための方法を提供する。この方法は以下の工程を包含する：(i)被験体(例えば、癌または新生物障害を有する患者)に、検出可能なマーカーに結合体化された抗ET2抗体を投与する工程；(ii)ET2発現組織または細胞へのこの検出可能なマーカーを検出するための手段に、被験体を曝露する工程。例えば、被験体は、例えば、NMRまたは他の断層撮影手段によって画像化される。

【0291】

本発明に従う診断的画像化のために有用である標識の例には、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{188}Rh などの放射性標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、ポジトロン放出断層撮影(PET)スキャナによって検出可能なポジトロン放出アイソトープ、ルシフェリンなどの化学発光剤、およびペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素的マーカーが含まれる。短距離検出器プローブによって検出可能なアイソトープなどの短距離放射線放射体もまた、利用され得る。タンパク質リガンドは、このような試薬を用いて、既知の技術を使用して標識され得る。例えば、WenselおよびMeares(1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York for techniques relating to the radiolabeling of antibodies ならびにD. Colcherら(1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816を参照のこと。

【0292】

放射性標識された本発明のリガンドはまた、インビトロ診断試験のために使用され得る。アイソトープ標識されたリガンドの比活性は、半減期、放射活性標識のアイソトープ純度、および標識がどのようにして抗体に組み込まれたかに依存する。

【0293】

放射活性アイソトープ(例えば、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{131}I)を有するポリペプチドを標識するための手順は一般的に知られている。例えば、トリチウム標識手順は、米国特許第4,302,438号に記載されている。ヨウ素化、トリチウム標識、および ^{35}S 標識手順は、例えば、マウスモノクローナル抗体について適合されるように、例えば、Goding, J.W. (Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 第2版 London; Orlando: Academic Press, 1986. 124-126頁およびそこに引用される参考文献によって記載されている。ヨウ素化ポリペプチド(例えば、抗体など)についての他の手順は、HunterおよびGreenwood(1962) Nature 144: 945, Davidら(1974) Biochemistry 13: 1014-1021、ならびに米国特許第3,867,517号および同第4,376,110号によって記載されている。画像化において有用である放射性標識元素は、例えば、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を含む。抗体をヨウ素化するための手順は、Greenwood, F.ら(1963) Biochem. J. 89: 114-123; Marchalonis, J.(1969) Biochem. J. 113: 299-305; およびMorrisson, M.ら(1971) Immunochimistry 289-297によって記載されている。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識のための手順は、Rhodes, B.ら Burchiel, S.ら(編) Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-

10

20

30

40

50

123 (1982) およびそこに引用される参考文献によって記載されている。¹¹¹ I n 標識抗体のために適切な手順は、Hnatowich, D. J. ら (1983) J. I mmun. Methods, 65: 147 - 157、Hnatowich, D. ら (1984) J Applied Radiation, 35: 554 - 557、および Buckley, R. G. ら (1984) F. E. B. S. 166: 202 - 204 によって記載されている。

【0294】

放射性標識リガンドの場合において、リガンドは患者に投与され、リガンドが反応する抗原を有する腫瘍に局在化され、そして例えば、ガンマカメラまたは放出断層撮影法を使用する放射核スキャンニングなどの公知の技術を使用して、インビトロで検出されるかまたは「画像化」される。例えば、A. R. Bradwell ら「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin ら (編), 65 - 85 頁 (Academic Press 1985) を参照のこと。代替的には、ポジトロン放出軸横断断層撮影スキャナ、例えば、Brookhaven National Laboratory に配置されている Pet VI と呼ばれるものが使用され得、ここでは、放射性標識がポジトロンを放出する (例えば、¹¹C、¹⁸F、¹⁵O、および¹³N)。

【0295】

(MRI 造影剤)。磁気共鳴映像法 (MRI) は、生きている被験体の内部の特徴を可視化するために NMR を使用し、予後診断、診断、治療、および外科手術のために有用である。MRI は、明白な利点のために放射活性トレーサー化合物なしで使用され得る。いくつかの MRI 技術が、EP - A - 0 502 814 に要約されている。一般的には、異なる環境における水プロトンの緩和時間定数 T1 および T2 に関する差異が画像を生成するために使用される。しかし、これらの違いは、鋭敏な高解像度画像を提供するには不十分であり得る。

【0296】

これらの緩和時間定数における差異は、造影剤によって増強され得る。このような造影剤の例には、多数の磁性体、常磁性体 (これは主として T1 を変化させる)、および強磁性体または超磁性体 (これは主として T2 応答を変化させる) が含まれる。キレート剤 (例えば、キレート剤 EDTA、DTPA、および NTA) は、いくつかの常磁性物質 (例えば、Fe⁺³、Mn⁺²、Gd⁺³) に結合するために (および毒性を減少するために) 使用され得る。他の薬剤は、例えば、10 μm 未満 ~ 約 10 mM の直径の粒子の形態であり得る。粒子は、強磁性、反強磁性、または超磁性特性を有し得る。粒子は、例えば、マグネタイト (Fe₃O₄)、- Fe₂O₃、フェライト、および他の遷移元素の磁性鉱物性化合物を含み得る。磁気粒子は、非磁気物質を有するかまたは有さない、1 つ以上の磁気結晶を含んでもよい。非磁気物質は、合成または天然のポリマー (例えば、セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなど) を含み得る。

【0297】

ET2 リガンドはまた、NMR 活性¹⁹F 原子または複数のこのような原子を含む表示基で標識され得、このような原子は、以下と同程度である: (i) 実質的にすべての天然に豊富なフッ素原子は¹⁹F アイソトープであり、従って、実質的にすべてのフッ素含有化合物は NMR 活性である; (ii) 多くの化学的に活性なポリフッ化合物 (例えば、トリフルオロ酢酸無水物) は比較的低いコストで市販されており、および (iii) 多くのフッ化合物はヒトにおける使用のために医学的に受容可能であることが見出されており、例えば、ペルフルオロポリエーテルは、ヘモグロビン置換物として酸素を運ぶために利用される。インキュベーションのためのこのような時間の許容後、癌性組織を位置決めおよび画像化するために、全身 MRI が、Pykett (1982) Scientific American, 246: 78 - 88 によって記載されたもののうちの 1 つなどの装置を使用して実行される。

10

20

30

40

50

【0298】

ET2に結合するタンパク質リガンドおよび診断的使用のための指示書を含むキットもまた、本発明の範囲内にあり、この使用は、例えば、インビトロで、例えばサンプル（例えば、癌または新生物障害を有する患者からの生検または細胞）中で、あるいはインビボで、例えば、被験体を画像化することによって、ET2を検出するための使用である。このキットはさらに、少なくとも1種の試薬、例えば、標識またはさらなる診断剤を含み得る。インビボ使用のために、リガンドは、薬学的組成物として製剤化され得る。

【0299】

以下の本発明は、さらなる限定とは見なされるべきではない以下の実施例によってさらに例証される。本願を通して引用される、すべての参考文献、係属中の特許出願、および公開された特許は、参照として明白に本明細書に援用される。

【実施例】

【0300】

（実施例1：選択および一次スクリーニング）

ET2を結合する抗体を単離するために、ファージミドFabライブラリーを、ET2のプロテアーゼドメインに対してスクリーニングした。

【0301】

ET2のビオチン化プロテアーゼドメインを、ストレプトアビジンコートした磁気ビーズ（M280-DYNAL）上で捕捉した。ET2コートされたビーズを、ライブラリーファージの付加の前に、PBS中2%ノンファットミルクで3回洗浄した。ライブラリーファージ（ 10^{12} 粒子）を、 $100\mu\text{l}$ の最終容量で磁気ビーズに加えた。この混合物を、端をひっくり返して混合しながら、2時間室温でインキュベートした。この時点で、上清を除去し、ビーズを、PBS中0.1%Tween、2%ノンファットミルクで3回洗浄した。最終洗浄後、ビーズを、新たなチューブに移した。ファージを、 1ml の 100mM トリエタノールアミン緩衝液（TEA）の付加によって、ビーズから溶出した。室温で10分間のインキュベーション後、上清を取り出し、 $500\mu\text{l}$ のTris-HCl pH 7.5に加えた。次いで、溶出したファージを増幅し、さらなる選択のラウンドのために使用した。3回の選択のラウンド後、産物を以下のように分析した（方法については、Chamesら（2002）Methods Mol Biol. 178:147-57もまた参照のこと）。

【0302】

選択から回収したライブラリーメンバーを、ファージELISAによってET2結合について試験した（図3）。各単離物を、ET2、およびブランクのストレプトアビジンウェルへの結合について試験した。ストレプトアビジン結合に対して2倍のET2についてのELISAシグナルを与えた単離物を「ポジティブ」と見なして、小スケール可溶性Fab産生のために選択した。全部で184個の単離物をファージELISAにおいて試験し、この方法に従うと、このうちの171個がポジティブと試験された。例示的なデータを以下の表4に示す。

【0303】

（表4：例示的なファージELISAデータ）

【0304】

10

20

30

40

【表 4 - 1】

BSA-ストレプト-

rET2

BSA-ストレプト

0.342	0.120
0.323	0.090
0.320	0.086
0.278	0.082
0.261	0.090
0.280	0.086
0.247	0.091
0.244	0.088
0.263	0.131
0.264	0.102
0.172	0.087
0.223	0.088
0.200	0.100
0.272	0.083
0.263	0.087
0.233	0.097
0.158	0.129
0.490	0.111
0.225	0.092
0.191	0.092
0.193	0.113
0.210	0.089
0.186	0.103
0.259	0.098
0.198	0.143
0.177	0.116
0.197	0.097
0.173	0.094
0.198	0.148

10

20

30

【 0 3 0 5 】

【表 4 - 2】

0.202	0.102
0.270	0.108
0.204	0.095
0.189	0.164
0.202	0.128
0.163	0.110
0.188	0.106
0.199	0.122
0.187	0.109
0.246	0.120
0.215	0.102
0.178	0.162
0.169	0.158
0.189	0.114
0.210	0.125
0.192	0.134
0.182	0.151
0.251	0.115
0.185	0.114

10

20

。

【0306】

(実施例 2 : F a b 産生およびスクリーニング)

小スケール量の可溶性 F a b を、96 ウェル形式で産生し、E T 2 への結合について試験した。F a b を特徴付けすることをさらに補助するために、E L I S A w、E T 2 の活性部位に結合する競合リガンドの存在下および非存在下で実行した。F a b E L I S A シグナルが競合リガンドの存在下で減少する場合、これらの F a b は活性部位にまたはその近傍に結合する可能性が高い。例示的なデータを以下の表 5 に示す。

【0307】

(表 5 : 例示的な可溶性 E L I S A データ)

30

【0308】

【表 5】

	可溶性	可溶性	
	Fab + rET	Fab - rET	
	ペプチド 阻害	ペプチド 阻害	
A1	0.21	0.31	
B1	0.89	0.947	
C1	0.135	0.143	
D1	0.267	0.351	
E1	0.118	0.204	
F1	0.124	0.239	10
G1	0.22	0.392	
H1	0.271	0.472	
A2	0.872	0.992	
B2	0.172	0.23	
C2	0.154	0.191	
D2	0.611	0.599	
E2	0.128	0.205	
F2	0.872	1.248	
G2	0.126	0.192	
H2	0.128	0.232	
A3	0.241	0.435	
B3	0.132	0.168	20
C3	0.114	0.145	
D3	0.822	0.83	
E3	0.118	0.143	
F3	0.224	0.388	
G3	0.332	0.591	
H3	0.173	0.304	
A4	0.168	0.167	
B4	0.173	0.229	
C4	0.112	0.155	
D4	0.134	0.172	
E4	0.119	0.168	
F4	0.138	0.189	30
G4	0.652	0.735	
H4	0.321	0.42	
A5	0.182	0.26	
B5	0.184	0.325	
C5	0.236	0.419	
D5	0.958	0.758	
E5	0.154	0.169	
F5	0.127	0.219	
G5	0.315	0.322	
H5	0.225	0.277	
A6	0.133	0.128	40
B6	0.155	0.146	
C6	1.091	1.063	
D6	0.122	0.163	
E6	0.137	0.15	
F6	0.186	0.224	

【0309】

このアッセイにおいて、全部で64個のET2結合可溶性Fabを同定した。これらのうち、31個がペプチドによって強力に競合され、さらに8個がペプチドの存在下で弱い競合を示した。本発明者らは、ペプチドインヒビターによる、標的酵素へのFab結合の

競合が、インヒビターを同定するための有用な方法であることを見出した。これは、別の型のアッセイによって、Fabによる阻害を試験することによって行った。ET2を結合する可溶性Fabを、大スケール(450ml培養)で調製し、そして連続するインビトロ酵素アッセイにおいてET2の阻害を決定するために使用した。

【0310】

ET2のインヒビターを評価するためのアッセイを、以下のように実行し得る：ET2のプロテアーゼドメインのプロテアーゼ活性の阻害のための試験化合物を、Costar 96ウェル組織培養プレート(Corning NY)においてアッセイする。約2~3nM ET2を、29.2mM Tris、pH 8.4、29.2mM イミダゾール、217mM NaCl(100mL 最終容量)中で、様々な濃度のインヒビターとともに混合し、30分間、室温でのインキュベーションに供する。400mM 基質S2765(Diapharma, Westchester, OH)を加え、反応を、SpectraMAX Plusマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale CA)中で、405nmにおける吸収の変化を1時間、37で追跡することによってモニターする。他に示されない限り、すべての試薬はSigma Chemical Co.(St. Louis, MO)から入手した。ET1アッセイに従って、さらなる詳細は以下にさらに提供され得る。

10

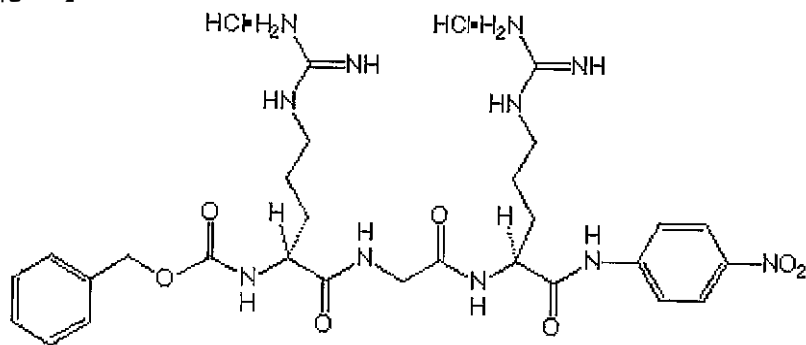
【0311】

S2765の例示的な構造は、以下：

【0312】

20

【化1】



30

である。

【0313】

本発明者らは、ペプチドによる強力な競合を示すFabがET2の良好な酵素インヒビターであることを示した。最良のインヒビターについての K_i 値を表6に示す。これらのクローンは引き続き配列決定した。

【0314】

(表6：Fabインヒビターについての阻害データ)

【0315】

【表 6】

クローン	コード	ライブラリー	Ki
D5:	R3 rET2 MP3	CJ ファージミド	70 ± 10 pM
D2:	R3 rET2 MP1	CJ ファージミド	90 ± 30 pM
A2:	R3 rET2 MP1	CJ ファージミド	160 ± 50 pM
H10:	R3 rET2 MP1	CJ ファージミド	190 ± 10 pM
F8:	R3 rET2 MP1	CJ ファージミド	240 ± 20 pM
B5:	R3 rET2 MP3	CJ ファージミド	250 ± 60 pM
C9:	R3 rET2 MP3	CJ ファージミド	260 ± 50 pM

10

【0316】

以下は、ET1 活性についてのアッセイである。ET1 活性をアッセイするためのアッセイ緩衝液は HBSA (10 mM Hepes、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4、0.1% ウシ血清アルブミン) であった。すべての試薬は、他に示されない限り、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。30分 (試験 Fab および酵素の30分間のプレインキュベーション) および0分 (試験 Fab および酵素のプレインキュベーションなし) での2回の IC₅₀ アッセイを行った。30分での IC₅₀ アッセイについては、以下の試薬を Corning マイクロタイタープレートの適切なウェル中で合わせた: 50 μl の HBSA、50 μl の試験化合物、HBSA 中で希釈 (広範な濃度範囲を網羅する) (または阻害されていない速度測定のためには HBSA 単独)、および緩衝液中で希釈した 50 μl の rET1 (Corvas International)、250 pM の最終濃度を生じる。大気温度における30分間のインキュベーション後、アッセイを、50 μl の基質 Spectrozyme tPA (メチルスルホニル-D-シクロヘキシル-L-グリシル-L-アルギニン-P-ニトロアニリンアセテート、American Diagnostica, Inc. (Greenwich, CT) より入手、脱イオン水中で再構成、続いてアッセイの前に HBSA 中で希釈) の付加によって開始し、これをウェルに加え、200 μl の最終容量および 300 μM の最終基質濃度 (Km の約 1.5 倍) を生じた。

20

30

【0317】

0分での IC₅₀ アッセイのために、同じ試薬を合わせた: 50 μl の HBSA、50 μl の試験化合物、HBSA 中で希釈 (同一の濃度範囲を網羅する) (または阻害されていない速度測定のためには HBSA 単独)、および 50 μl の基質 Spectrozyme tPA。アッセイを、50 μl の rET2 の付加によって開始した。すべての成分の最終濃度は、両方の IC₅₀ アッセイ (30分インキュベーションおよび0分インキュベーション) において同一であった。

40

【0318】

発色性基質加水分解の初期速度を、Thermo Max Kinetic マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を使用して、405 nm における吸収の変化によって両方のアッセイにおいて、5分間の時間にわたって測定し、この時間では、加えられた基質の 5% 未満が使用された。加水分解の初期の速度を 50% 減少する、加えられたインヒビターの濃度を、2回のアッセイ (30分および0分) の各々において、それぞれの IC₅₀ 値として定義した。

【0319】

(実施例 3. Fab インヒビターの選択性)

50

F a b インヒビターについての配列データを表 1 に示す（上記、要約の節）。4 個のクローン（A 2、B 5、D 2、および H 1 0）は、同じ重鎖配列を共有する。この配列は、リジンからアンバー終止コドンへの変異を含む。このような変異は、重鎖の短縮を生じ、結果として非機能的 F a b を生じることが通常予測されるが、すべての増殖が、E . c o l i の s u p E 変異体において実行された。この変異体株は、アンバー終止コドンにおいて、配列データにおいて q で示されるグルタミン残基を挿入し、従って、成熟 F a b の産生を可能にする。

【 0 3 2 0 】

上記の 7 個の F a b を I g G 1 抗体に再編成した。F a b 再編成は 2 段階プロセスであり、ここでは、F a b は最初に、重鎖および軽鎖ならびに重鎖定常配列の発現を駆動する真核生物プロモーターを提供する I g G 1 発現ベクター（p R R V）にクローニングされる。第 2 の段階において、重鎖の発現を駆動するために使用される E . c o l i プロモーターを、真核生物内部リボソームエンター配列（I R E S）で置換する。アンバー終止コドンを有する 4 個のクローンが哺乳動物系における発現を可能にするために、A 2、B 5、D 2、および H 1 0 は、アンバー終止コドンを、この位置に天然に存在するアミノ酸であるリジンで置換した。

【 0 3 2 1 】

一旦、発現ベクター構築が完了すると、抗体は H E K 2 9 3 T 細胞中で一過性に発現され、引き続いて、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞培養培地から精製される。精製された抗体を、F a b の分析のために以前に使用された同じ連続的インビトロアッセイにおいて試験した。K i 値を表 7 に示す。

【 0 3 2 2 】

選択性スクリーニングにおいて、すべての I g G は、プロテアーゼトリプシノーゲ I V、M T S P - 1、M T S P - 6、M T S P - 7、M T S P - 1 0、および E T 1 に対して、1 0 0 n M で < 5 % 活性を実証した。

【 0 3 2 3 】

（表 7：F a b および I g G インヒビターについての阻害データの比較）

【 0 3 2 4 】

【表 7】

クローン	標的	Ki (Fab)	Ki (IgG)
D5	rET2	70 pM	86 pM
D2	rET2	95 pM	44 pM
A2	rET2	150 pM	53 pM
H10	rET2	315 pM	136 pM
F8	rET2	410 pM	840 pM
B5	rET2	325 pM	102 pM
C9	rET2	310 pM	110 pM

【 0 3 2 5 】

（実施例 4 . 腫瘍増殖の減少）

E T - 2 に結合する 1 つの抗体を、小動物効力研究において評価した。

【 0 3 2 6 】

D U - 1 4 5 腫瘍細胞を、6 ~ 8 週齢の S C I D マウス（C h a r l e s R i v e r）の動物の脇腹に皮下注射した。腫瘍移植の 5 ~ 1 0 日後、動物を 1 0 ~ 1 5 匹の動物の

群にランダムに分けた。処置は、I P注射により、F a bを1日1回(0、200、もしくは400 μ g/動物)、またはI g Gを1日毎に1回(0、10、50、もしくは500 μ g/動物)のいずれかであった。この研究は、腫瘍が許容可能な最大サイズに達するまで、継続させた。腫瘍サイズは、パーニアキリパー(M i t u t o y oモデル573)で測定し、腫瘍体積を計算した。研究の最後に、腫瘍を切除し、秤量した。研究の間の動物の健康状態を、規則的な秤量によって評価した。400 μ gのF a b H10を用いる処置は、コントロール処置を与えられた動物の速度と比較して、腫瘍増殖の速度を減少した。例えば、初回用量の35日後に、平均腫瘍体積(図3A)および腫瘍重量(図3B)は、400 μ gのF a b H10で処置した動物については減少した。他の有用な抗体も同様に、例えば、35日後に、コントロールと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、腫瘍増殖を減少、例えば、腫瘍重量を減少し得る。

10

【0327】

(実施例5 . 例示的配列 - A10)

【0328】

【化2】

A10 HC の翻訳(1-344)

```

1          EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMWVVRQA PGKGLEWVSY
51         ISSSGGFTNY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
101        RRALPSMDVW GKGT (配列番号 25)

```

20

A10 LC の翻訳(1-354)

```

1          QSALTQPPSA SGTPGQRVTI SCSGSSSNIG SNYVYWYQQL PGTAPKLLIY
51         SNNQRPSGVP DRFSGSKSGT SASLAISGLR SEDEADYYCA AWDDSLSGPV
101        FGGGTKLTVL GQPKAAPS (配列番号 26)

```

A10 HC 核酸配列

```

GAAGTTCAATFGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCCTTTCTT
GCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCGTTACCGTATGTGGTGGGTCGCCAAGCTCCTGGTAA
AGTTTTGGAGTGGGTTTTCTTATATCTCTTCTTCTGGTGGCTTTACTAATTATGCTGACTCCGTT
AAAGTTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCAAGAGCTCTTCCCTCCAT
GGACGTCCTGGGGCAAAGGGACCAC

```

(配列番号 27)

30

A10 LC 核酸配列

```

CAGAGCGCTTTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT
GTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAAC
GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTG
ATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCT
GACCGTCTTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG (配列番号 28)

```

40

【0329】

(実施例6 . 例示的配列 - G3)

【0330】

【化 3】

G3 HC の翻訳 (1-342)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYGMSWVRQA PGKGLEWVSV
 51 IYSSGGITRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARRA
 101 PRGEVAFDIW GQGT (配列番号 29)

G3 LC の翻訳 (1-345)

1 QDIQMTQSPS FLSASIGDRV TITCWASQGI SNYLAWYQOK PGKAPKLLIS
 51 SASTLQSGVP SRFSGSGSGT EFTLTISLQ PEDSATYYCQ QANSEFPWTFG
 101 QGTRVEIRRT VAAPS (配列番号 30)

10

G3 HC 核酸配列

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCFTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCAC TTTCTCTCGTTACGGTATGTCTTGGGTT CGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCTATTCTTCTGGTGGCATTACTCGTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTACTGTGCGAGACGGGCCCGAGGGGGGAGGTTCGCTTT
 TGATATCTGGGGCCAAGGGACA
 (配列番号 31)

20

G3 LC 核酸配列

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGTAATTAATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAA
 AGCCCCAAGCTCCTGATCTCTTCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAA
 CTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAGGGTGGAAAT
 CAGACGAAC TGTGGCTGCACCATCT
 (配列番号 32)

30

【 0 3 3 1 】

(実施例 7 . 例示的配列 - A 6)

【 0 3 3 2 】

【化 4】

A6 HC の翻訳 (1-344)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYKMWWVRQA PGKGLEWVSY
 51 ISPSGGYTG Y ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
 101 RRAFPSMDVW GKGT (配列番号 33)

A6 LC の翻訳 (1-345)

1 QSALTQDPAV SVALGQTVRI TCRGDRLRSY YSSWYQQKPR QAPVLVMFGR
 51 NNRPSGIPDR FSGSTSGSTA SLTITATQAD DEADYFCSSR DSGSNFLFGG
 101 GTKLTVLGQP KAAPS (配列番号 34)

10

A6 HC 核酸配列

GAAGTTCAAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACAAGATGTGGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTATATCTCTCCTTCTGGTGGCTATACTGGTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGTTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTTGTGCGAAAAACGCGGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC

(配列番号 35)

20

A6 LC 核酸配列

CAGAGCGCTTTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGGCAGACAGTCAGGATCACAT
 GCCGAGGAGACAGACTCAGAAGTTATTATTCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCACGACAGGCCCC
 TGTCTTGTTCATGTTTGGTAGAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCC
 ACCTCAGGAAGCACAGCTTCTTGACCATCACTGCGACTCAGGCGGACGATGAGGCTGACTATT
 TCTGTAGTTCCCGGACGGCAGTGGTAATTTCTCTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCGTCT
 TGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG

(配列番号 36)

。

【0 3 3 3】

(実施例 8 . 例示の配列 - A 7)

30

【0 3 3 4】

【化5】

A7 HC の翻訳(1-342)

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMSWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISSSGGITY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED AAIYYCAKNA
 101 RRAFPSMDVW GKGT (配列番号 37)

A7 LC の翻訳(1-348)

1 QDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASQSI SSYLNWYQQK PGKAPKLLIY
 51 AASSLQSGVP SRFSGSGSGT EFTLTINSLQ PEDFATYYCQ QLTGYPSITF
 101 GQGTRLDIKR TVAAPS (配列番号 38)

10

A7 HC 核酸配列

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACCTTTCTCTCGTTACCGTATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTTCTTCTGGTGGCATTACTACTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACGCTGCAATCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACCTCTGGGGCAAAGGGACC

(配列番号 39)

20

A7 LC 核酸配列

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA
 AGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCACAAATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA
 CTTATTACTGTCAACAACCTACTGGTTACCCCTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA
 CATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT (配列番号 40)

。【0335】

(実施例9. 例示の配列 - C8)

30

【0336】

【化 6】

C8 HC の翻訳 (1-342)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYTMSWVRQA PGKGLEWVSY
 51 IVPSGGMTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARRA
 101 PRGEVAFDIW GQGT (配列番号 41)

C8 LC の翻訳 (1-354)

1 QSVLTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI
 51 YDVKRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC TSYTSSSTWV
 101 FGGGTKLTVL GQPKAAPS (配列番号 42)

10

C8 HC 核酸配列

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTCCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCGTTACACTATGTCTTGGGFTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTATATCGTTCCTTCTGGTGGCATGACTAAGTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGACGGGCCCCGAGGGGGAGGTCGCTTT
 TGATATCTGGGGCCAAGGGACA
 (配列番号 43)

C8 LC 核酸配列

CAGAGCGTCTTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCT
 GCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGG
 CAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGTGAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTC
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGG
 CTGATTATTACTGCACCTCATATACAAGTAGCAGCACTTGGGTGTTGCGCGGAGGGACCAAGCT
 GACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG (配列番号 44)

20

。

【 0 3 3 7 】

(実施例 10 . 例示の配列 - H 9)

30

【 0 3 3 8 】

【化 7】

H9 HC の翻訳 (1-344)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYSMHWRQA PGKGLEWVSS
 51 IGPSGGKTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARPF
 101 RGSYYYFDYW GQGT (配列番号 45)

H9 LC の翻訳 (1-345)

1 QDIQMTQSPS SLSASIGDRV TITCQASQDT YNRLHWYQQK SGKAPKLLIY
 51 DAVNLKRGVP SRFRGSGSGT NFILITINLQ PEDTATYFCQ HSDDLALAFG
 101 GGTKVEIKRT VAAPS (配列番号 46)

10

H9 HC 核酸配列

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTC ACTTTCTCTCGTTACTCTATGCATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCGGTCCTTCTGGTGGCAAGACTAAGTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGTTCACTATCTCTAGAGACA AACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGACCCTTCCGTGGGAGCTACTACTACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
 (配列番号 47)

20

H9 LC 核酸配列

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCA
 TAAC TTGCCAGGCGAGT CAGGACACTTACAACCGTCTACATTGGTATCAGCAGAAATCAGGGAA
 AGCCCC TAAACTCCTCATCTACGATGCAGTCAATTTGAAAAGGGGGTCCCTTCAAGGTTCGTT
 GGAAGTGGATCTGGGACAAATTTTATTTTGACCATCACCAACCTGCAGCCTGAAGATACTGCAA
 CATATTTCTGTCAACATTCTGATGATCTGTCACTCGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
 CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT
 (配列番号 48)

。

【0339】

(実施例 11 . 例示の配列 - G10 - R2)

30

【0340】

【化 8】

G10-R2 HC の翻訳 (1-382)

```

1          EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYKMWWVRQA PGKGLEWVSY
51         ISPSGGYTGY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
101        RRAFPSMDVW GKGTTVTVSS ASTKGPS (配列番号 49)

```

G10-APSR2 LC の翻訳 (1-360)

```

1          QDIQMTQSPL SLPVTPGEPA SISCRSSQSL LYSNGYNYLD WYLQRPQSP
51         QLLIYLGSNR ASGVPDRFSG SGSSTDFTLK ISRVEAKDVG VYYCMQALQI
101        PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS (配列番号 50)

```

10

G1 HC コード配列0-R2

```

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTG
CTTCCGGATTCACTTCTCTCGTTACAAGATGTGGTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTG
GGTTTCTTATATCTCTCCTTCTGGTGGCTATACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATC
TCTAGAGACA AACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCT
ACTATTTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC
CGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG (配列番号 51)

```

G1 LC コード配列0-R2

```

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCT
GCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAGACCAGG
GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGC
AGTGGATCAGGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTAAGGATGTTGGGGTTTATTA
GCATGCAAGCTCTACAAATTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGGC
TGCACCATCT (配列番号 52)

```

20

【 0 3 4 1 】

(実施例 1 2 . 例示的配列 - F 3 - R 2)

【 0 3 4 2 】

【化9】

F3-R2 HC の翻訳(1-382)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMHWVRQA PGKGLEWVSG
 51 ISSSGGDTNY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
 101 RRAFPSMDVW GKGTTVTVSS ASTKGPS (配列番号 53)

F3-R2 LC の翻訳(1-345)

1 QDIQMTQSPS SVSASVGDIV TITCRASLPV NTWLAWYQQK PGKAPKLLLY
 51 AASRLQSGVP SRFSGSGSGT DFTLNISLQ PEDFATYYCQ QANTFPYTFG
 101 QGTKVDIKRT VAAPS (配列番号 54)

10

F3 HC コード配列-R2

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCAC TTTCTCTCGTTACCGTATGCATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTCTTCTTCTGGTGGCGATACTAATTATGCTGACTCCGTT
 AAAGTTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA AACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACGCTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 (配列番号 55)

F3 LC コード配列-R2

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACACAGTCACCA
 TCACTTGTTCGGGCGAGTCTGCCTGTTAACACCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGGAA
 AGCCCC TAAACTCCTGCTCTATGCTGCATCCAGATTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGC
 GGCAGTGGCTCTGGGACAGATTTCACTCTCAACATCAGCAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAA
 CCTACTATTGTCAACAGGCGAACACTTTCCCGTACACTTTTGCCAGGGGACCAAAGTGGATAT
 CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT
 (配列番号 56)

20

【0343】

(実施例13 . 例示的配列 - C6 - R2)

【0344】

30

【化 1 0】

C6-R2 HC の翻訳 (1-382)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYSMHWVRQA PGKGLEWVSR
 51 IVPSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
 101 RRAFPMDVW GKGTTVTVSS ASTKGPS (配列番号 57)

C6-R2 LC の翻訳 (1-348)

1 QSALTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY YASWYQKPG QAPVLVIYSK
 51 SNRPSGIPDR PSGSSSGSTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNHLVFG
 101 GGTKLTVLGG PKAAPS (配列番号 58)

10

C6 HC コード配列-R

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCCGATTCACTTTCTCTCGTTACTCTATGCATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGTTTTGGAGTGGGTTTCTCGTATCGTTCCTTCTGGTGGCACTACTTTTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 (配列番号 59)

C6 LC コード配列-R2

CAGAGCGCTTTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACAT
 GCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCC
 TGTACTTGTATATATAGTAAAAGTAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCC
 AGCTCAGGAAGCACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATT
 ATTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATCTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT
 CCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG (配列番号 60)

20

。

【 0 3 4 5】

(実施例 1 4 . 例示的配列 - A 4 - R 3)

【 0 3 4 6】

30

【化 1 1】

A4-R3 HC の翻訳 (1-382)

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYNMYWVRQA PGKGLEWVSG
 51 IRPSGGSTQY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKNA
 101 RRAFPSMDVW GKGT TVTVSS ASTKGPS (配列番号 61)

A4-R3 LC の翻訳 (1-345)

1 QSELTQDPAV SVALGQTVRI TCRGDRLRSY YSSWYQOKPR QAPVLVMFGR
 51 KNRPSGI PDR FSGSTSGSTA SLTITATQAD DEADYFCSSR DGSGNFLFGG
 101 GTKLTVLGQP KAAPS (配列番号 62)

10

A4 HC コード配列-R3

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTCTTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACAATATGTATTGGGTTCCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTCTCTGGTATCCGTCCTTCTGGTGGCTCTACTCAGTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 (配列番号 63)

A4 LC コード配列-R3

CAGAGCGAATTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGGCAGACAGTCAGGATTACAT
 GCCGAGGAGACAGACTCAGAAGTTATTATCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCACGACAGGCCCC
 TGTTCTTGTCA TGTTTGGTAGAAAGAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCC
 ACCTCAGGAAGCACAGCTTCTTGACCATCACTGCGACTCAGGCGGACGATGAGGCTGACTATT
 TCTGTAGTTCCCGGGACGGCAGTGGTAATTTCTCTTTCCGGCGGAGGGACCAA ACTGACCGTCT
 TGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG
 (配列番号 64)

20

【 0 3 4 7 】

(実施例 1 5 . 例示的配列 - C 1 - R 3)

30

【 0 3 4 8 】

【化 1 2】

C1-R3 HC の翻訳(1-382)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYSMHVVRQA PGKGLEWVSG
 51 IRPSGGSTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCAKNA
 101 RRAFPMDVW GKGTTVTVSS ASTKGPS (配列番号 65)

C1-R3 LC の翻訳(1-345)

1 QDIQMTQSPS SLSASVGDV TITCRASQSI STYLNWYQQR PGEAPKLLIY
 51 GASSLVSGVP SRFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFATYYCH QSYITTSWTFG
 101 QGTKVEIKRT VA (配列番号 66)

10

C1 HC コード配列-R3

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACTCTATGCATTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAA
 AGTTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCCGTCCTTCGGTGGCTCTACTAAGTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAAAAACGCGCGAAGAGCTTTTCCCTCCAT
 GGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 (配列番号 67)

C1 LC コード配列-R3

20

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCACCTACTTAACTGGTATCAGCAGAGACCAGGGGA
 AGCCCCTAAACTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGGTGGTGGGGTCCCATCAAGATTTAGT
 GGCAGCGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCTCCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAA
 CTTACTACTGTCAACAGAGTTACATTACCTCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAAT
 CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT
 (配列番号 68)

【 0 3 4 9 】

30

(実施例 1 6 . 例示的配列 - A 2)

【 0 3 5 0 】

【化 1 3】

A2 HC の翻訳(1-341)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMYWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGDTRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
 101 PRGNKYYFDY WGQ (配列番号 69)

A2 LC の翻訳(1-337)

1 QDIQMTQSPS FLSAFVGDRV TITCRASQDI RSDLAWYQQT PGKAPKLLIY
 51 AASTLKDGAP SRFSGSGSGT EFTLTISSLH PEDLATYYCQ HLNHHPAFGP
 101 GTKVNIQRTV AA (配列番号 70)

10

A2 HC コード核酸

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTGAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCGTTACCGTATGTATTGGGTTGCGCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCGATACTCGTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTTTAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGACCGGGGTAACAAGTACTA
 CTTTACTACTGGGGCCAGGG
 (配列番号 71)

A2 LC コード核酸

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCGATTTGTAGGAGACAGGGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCCAGTCAGGACATTAGAAGTGATTTAGCCTGGTATCAGCAAACACCAGGGAA
 AGCCCCAAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGAAAGATGGGGCCCCATCAAGATTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTACTCTCACAATCAGCAGCCTGCACCCTGAAGATCTTGCGA
 CTTATTACTGTCAACACCTTAATGGTCACCCTGCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGAATATCCA
 AAGAAGTGTGGCTGCAC
 (配列番号 72)

20

【0 3 5 1】

(実施例 1 7 . 例示的配列 - B 5)

30

【0 3 5 2】

【化 1 4】

B5 HC の翻訳 (1-341)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMYWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGDTRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
 101 PRGNKYYFDY WGQ (配列番号 73)

B5 LC の翻訳 (1-334)

1 QYELTQPPSV SVSLGQAANI SCSGDRLGDK YTSWYQQQSG QSPVLVIYQD
 51 KKRPSGIPER FSGSSSGNTA TLTISGAQAI DEAAYYCQAW ATNVVFGAGT
 101 KLTVLGQPKA A (配列番号 74)

10

B5 HC コード核酸

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACCGTATGTATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCGATACTCGTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTTAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGACCGCGGGTAACAAGTACTA
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGG
 (配列番号 75)

B5 LC コード核酸

CAGTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCTAGGACAGGCAGCCAACATCTCCT
 GCTCTGGAGATAGATTGGGGATAAATATACTTCCCTGGTATCAACAACAGTCAGGACAGTCCCC
 TGTCTGGTCATCTATCAAGATAAGAAGCGACCCTCAGGGATCCCCGAGCGATTCTCTGGCTCC
 TCCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGGCCAGGCCATAGATGAGGCTGCCTATT
 ACTGTCAGGCGTGGGCCACCAATGTGGTTTTTCGGCGCTGGGACCAAGCTGACCGTCCCTAGGTCA
 GCCCAAGGCTGCCC (配列番号 76)

20

。 【0 3 5 3】

(実施例 1 8 . 例示の配列 - D 2)

【0 3 5 4】

30

【化 1 5】

D2 HC の翻訳 (1-341)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMYWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGDTRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
 101 PRGNKYYFDY WGQ (配列番号 77)

D2 LC の翻訳 (1-340)

1 QDIQMTQSPS SLSASVGRV TITCRASQTI DNYLNWYQQK PGKAPKLVVY
 51 AASTLQTRVP SRFSGSGSGT DFTLTIDSLK PEDFATYFCQ QGFSNPWTFG
 101 QGTFVAMIRT VAA (配列番号 78)

10

D2 HC コード核酸

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCAC TTTCTCTCGTTACCGTATGTATTGGGTT CGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCGATACTCGTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGTTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTTAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGGACCGGGGTAACAAGTACTA
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGG
 (配列番号 79)

D2 LC コード核酸

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTTGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGCCGGGCAAGCCAGACCATTGACAATTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA
 AGCCCCAAACTCGTGGTCTATGCTGCATCCACTTTGCAA ACTAGGGTCCCATCAAGGTTCACT
 GGCAGTGGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGTCTGAAACCTGAAGATTTTGCAA
 CTTACTTCTGTCAACAGGGTTTCAGTAATCCTTGGACGTT CGGCCAAGGGACCACGGTGGCAAT
 GATACGAACTGTGGCTGCAC
 (配列番号 80)

20

【 0 3 5 5】

(実施例 19 . 例示的配列 - D 5)

【 0 3 5 6】

30

【化 1 6】

D5 HC の翻訳 (1-332)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYDMHWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISSSGGYTAY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGA
 101 RGTSQGYWGQ (配列番号 81)

D5 LC の翻訳 (1-346)

1 QDIQMTQSPG TLSLSPGERG TLSCRASQFV SYSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
 51 YGASSRAKGI PDRFSGSGSG TDFTLTITRL EPEDFAVYYC QQYVPSVPWT
 101 FGQGTKVEVK RTVAA (配列番号 82)

10

D5 HC コード核酸

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTC ACTTTCTCTCGTTACGATATGCATTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTTCTTCTGGTGGCTATACTGCTTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATGTGCGAGAGGCGCCCGAGGTACCAGCCAAGGCTA
 CTGGGGCCAGGG (配列番号 83)

D5 LC コード核酸

CAAGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCATTGTCTCCAGGGGAAAGAGGCACCC
 TCTCCTGCAGGGCCAGT CAGTTTGTTAGTTACAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGG
 CCAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGGCGCATCCAGCAGGGCCAAAGGCATCCAGACAGGTT
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGACTGGAGCCTGAAGACTTTG
 CAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGTTCCCTCAGTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGT
 GGAAGTCAAACGAACTGTGGCTGCAC (配列番号 84)

20

【 0 3 5 7 】

(実施例 20 . 例示的配列 - F 8)

【 0 3 5 8 】

30

【化 1 7】

F8 HC の翻訳(1-341)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYHMWWVRQA PGKGLEWVSG
 51 ISSSRGITKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
 101 PRGNKYYFDY WGQ (配列番号 85)

F8 LC の翻訳(1-343)

1 QDIQMTQSPG TLSLSPGERV TLSCRASQSV TSSDLAWYQQ KPGQAPRLLI
 51 SGASSRATGI PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAVYYC QQYGNSPGTF
 101 GQGTKVEIKR TVAA (配列番号 86)

10

F8 HC コード核酸

GAAGTTC AATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTT CAGCCTGGTGGTTC TTTACGTCTTTCTT
 GCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACCATATGTGGTGGGTT CGCCAAGCTCCTGGTAA
 AGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTCTTCTTCTCGTGGCATTACTAAGTATGCTGACTCCGTT
 AAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACA ACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCT
 TAAGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGAGGGGACCGCGGGTAACAAGTACTA
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGG

(配列番号 87)

F8 LC コード核酸

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACCC
 TCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACCAGCAGCGACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGG
 TCAGGCTCCAGGCTCCTCATTCTGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTT
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCACCATCAGCAGACTGGAACCTGAAGATTTG
 CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAACTCACCTGGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGA
 AATCAAACGAACCTGTGGCTGCAC

(配列番号 88)

20

。 【 0 3 5 9 】

(実施例 2 1 . 例示の配列 - H 1 0)

【 0 3 6 0 】

30

【化 18】

H10 HC の翻訳 (1-341)

1 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYRMYWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGDTRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCARGG
 101 PRGNKYFDY WGQ (配列番号 89)

H10 LC の翻訳 (1-343)

1 QDIQMTQSPG TLSLSPGERA TLSCRASQSV SSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
 51 YGASSRATGI PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAVYYC QOYGSSTWTF
 101 GQGTKVEIKR TVAA (配列番号 90)

10

H10 HC コード核酸

GAAGTTC AATGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTG
 CTCCGGATTCACTTCTCTCGTTACCGTATGTATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTG
 GGTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCGATACTCGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATC
 TCTAGAGACAACCTTTAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCT
 ACTATTGTGCGAGAGGGGACCGCGGGGTAACAAGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG (配列番号
 91)

H10 LC コード核酸

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCC
 TCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGG
 CCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTT
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT
 CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCAACGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAAGTGGA
 AATCAAACGAACTGTGGCTGCAC
 (配列番号 92)

20

【0361】

HC コード核酸中の終止コドンは、別のコドン、例えば、リジンをコードするコドンで置換され得る。代替的には、tRNA サプレッサーを有する細菌株は、この位置にリジンまたは他のアミノ酸を導入するために使用され得る。

30

【0362】

本発明の多数の実施形態は記載されてきた。それにも関わらず、種々の修飾が、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。従って、他の実施形態は、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0363】

【図 1 A】図 1 A および 1 B は、ヒト ET-2 S のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供する(それぞれ配列番号 93 および配列番号 94)。

【図 1 B】図 1 A および 1 B は、ヒト ET-2 S のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供する(それぞれ配列番号 93 および配列番号 94)。

40

【図 2 A】図 2 A および 2 B は、ヒト ET-2 L のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供する(それぞれ配列番号 1 および配列番号 2)。

【図 2 B】図 2 A および 2 B は、ヒト ET-2 L のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供する(それぞれ配列番号 1 および配列番号 2)。

【図 3】図 3 A および 3 B は、マウスモデルにおいて H10 抗体を用いる治療について 39 日目での腫瘍体積(5 A)および腫瘍重量(5 B)の分布を示す。

【 図 1 A 】

FIG. 1A

ヒトエンドセリアーゼ-2 S のヌクレオチド配列 (配列番号93)
(また、GenBank® GI No: 14348013; EMB No: AX149579.1; および 特許 WO0136604
からの配列 3 を参照のこと)

ATGGAGAGGGACGCCAGGGAATGCATCTCCAGCAAGAACACCTTCAGCTGGAGCATCTCCAGCCCGG
CATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAG
TGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCT
CCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAG
CATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCC
TAGAGCACAACCTGGGGGCTGACCCATCCGATCATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCC
ACAGGGAGAGCCAGGTCAGAGCTGCGCAAGTTCACCTTGGCGGGAGGSCAGAAAGCAGCTACCGCTCA
TCGGGTGGCTCCCTCCTCATTGCCCTGGTGGTTCGCTCATCTCCTTCCAGTTCGGCAGGGCCA
CACAGGATCAGGTCACAGGAGCAGGGAGAGCTGTCAGGACAGCTGCCAAGCAGCTGTCGCTGTGCGGGGTGGT
GACTGCAAGCTGAGAGTACAGAGCTGGGCTGGCTGAGGTTTGGCTGGGCAAGTCTCTCTTAAATCT
ACTCTGGGCTCCCTCCATCAGTGGCTCCCATCTGTAGCAGCACTGGAATGACTCTTACTCAGAGAAGAC
CTGCCAGAGCTGGGTTTGGAGAGCTCCACCGGACAAAGGAGTTCGCCACAGGGATTTGCCACAGCT
TCTCAATCTTGAATACAACTCCACCTCCAGGAAAGCTCCACAGTCTGAAAGCCCTTCCAGCGGT
ATATCTCCCTCCAGTTCACCACTCCAGGATGAGGGCCATGACCGGGGATCTGGAGGGGCGCTGGC
CTCGGATAGCAAGTGGCTTGGCAGTGCATCTCCGACCCAGCAGATCTTGGAGGAGCCCTG
ATTGACGGCCAGTGGCTCTCAGTGGCCAGCAGTCTCCAGTCCAGGAGGAGTCTGGAGGGGCT
GGAGGTTGTCGCGGAGCAGGAGCAGTCTGCTTCTGACCCCGGAGGAGTCTGGAGGGCT
AATGACCGCCAGTGGCTCTCAGTGGCCAGCAGTCTCCAGTCCAGGAGGAGTCTGGAGGGCT
GGAAGGTTAGCGGGCAGCAGCAGTCTGACCCAGTTCGCTGGGAGGAGCTCATTTCCGAGGATCATCT
CACAGCAATACAGGAGTGGAGGAGGAGTCTGACCTGAGGAGGAGTCTGGAGGGCT
GAGTCTCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
GGATCAGAGGCTTTGGCAGAGCAGGAGGAGCAGTGAAGACATCCCTTCCGCGGAGGTCAGAT
CAATCTCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
TGCCTGGGAGCTTCTGGGGGAGGAGCTCCGACAGGAGCAGCGGGGGCTCTTGTCTGATGAGC
AGAACACCGCTGGTACCTGGGAGGCTTCCAGGAGTGGGGGAGCAGGCTGGGCGGAGAAACAACCTGG
TGTGTACACCAAGTGCAGAGTCTCCCTCCGATTTACAGCAGATGGAGAGCGAGTCCGATTACATA
AAATCTTAA

【 図 1 B 】

FIG. 1B

ヒトエンドセリアーゼ-2 S のアミノ酸配列 (配列番号94)
(また、GenBank® GI No: 14348014; EMB No: CAC41220.1; および WO0136604
を参照のこと)

MERDSHGASPARTPSAGASPAQASPAQTTPGRASPAQASPAQASPAQTTPGRASPAQASPAQTTPGRAS
PGRASPAQASPARASPALASLSRSSSSRSASASVITSPTRVYLVRATFVGAVPIRSSPARSAFTRA
TRSPGSLPKFTWREGQKQLFLIGCVLLLIALLVLSLII LQFWQSHGTGIRYKQRESCKHVRCDGVV
DCKLKSDELGCVRFWDKSLKLIYSGSSHQWLPICSNMNDYSSEKTCQGLFESRHRHTEVAHRDFANS
FSLIRYNSTIQESLSRSECPQRYISLQCSHGLRMTGRIVGGLASDSKWPQVSLHFGTTHICGGTL
IDAQWVLAHACHFFVTRKVLGKWKYAGTNSLHQLPEASIAEIIINSNVTDEEDDYDIALMRLSKPLT
LSAIIHFACLPMHGQTFSLNETGWITGFKTRTDQKTSFPLREVNQLIDFKKNDYLVYDSYLTFRPM
CAGDLRGRDRSCQDSDGGPLVCEQNNRWYLAGVTSWGTGCGQRNKPVTYKVI EVLFWIYSKMESEVRFI
KS

【 図 3 】

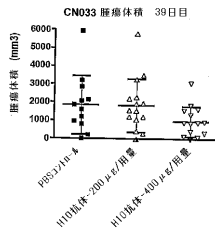


FIG. 3A

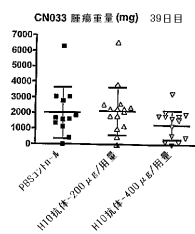


FIG. 3B

【 図 2 A 】

FIG. 2A.

ヒトエンドセリアーゼ-2 L のヌクレオチド配列 (配列番号1)
(また、GenBank® GI No:14348015; EMB No:AX149581.1; および 特許 WO0136604
からの配列 5 を参照のこと)

ATGSRAGGGACGCCAGGGAATGCATCTCCAGCAAGAACACCTTCAGCTGGAGCATCTCCAGCCCGG
CATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAG
TGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCT
CCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAG
CATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCC
TAGAGCACAACCTGGGGGCTGACCCATCCGATCATCTCCAGCTGGGACACCTCCAGCCCGGAGCATCTCCAGCC
ACAGGGAGAGCCAGGTCAGAGCTGCGCAAGTTCACCTTGGCGGGAGGSCAGAAAGCAGCTACCGCTCA
TCGGGTGGCTCCCTCCTCATTGCCCTGGTGGTTCGCTCATCTCCTTCCAGTTCGGCAGGGCCA
CACAGGATCAGGTCACAGGAGCAGGGAGAGCTGTCAGGACAGCTGCCAAGCAGCTGTCGCTGTGCGGGGTGGT
GACTGCAAGCTGAGAGTACAGAGCTGGGCTGGCTGAGGTTTGGCTGGGCAAGTCTCTCTTAAATCT
ACTCTGGGCTCCCTCCATCAGTGGCTCCCATCTGTAGCAGCACTGGAATGACTCTTACTCAGAGAAGAC
CTGCCAGAGCTGGGTTTGGAGAGCTCCACCGGACAAAGGAGTTCGCCACAGGGATTTGCCACAGCT
TCTCAATCTTGAATACAACTCCACCTCCAGGAAAGCTCCACAGTCTGAAAGCCCTTCCAGCGGT
ATATCTCCCTCCAGTTCACCACTCCAGGATGAGGGCCATGACCGGGGATCTGGAGGGGCGCTGGC
CTCGGATAGCAAGTGGCTTGGCAGTGCATCTCCGACCCAGCAGATCTTGGAGGAGCCCTG
ATTGACGGCCAGTGGCTCTCAGTGGCCAGCAGTCTCCAGTCCAGGAGGAGTCTGGAGGGGCT
GGAGGTTGTCGCGGAGCAGGAGCAGTCTGCTTCTGACCCCGGAGGAGTCTGGAGGGCT
AATGACCGCCAGTGGCTCTCAGTGGCCAGCAGTCTCCAGTCCAGGAGGAGTCTGGAGGGCT
GGAAGGTTAGCGGGCAGCAGCAGTCTGACCCAGTTCGCTGGGAGGAGCTCATTTCCGAGGATCATCT
CACAGCAATACAGGAGTGGAGGAGGAGTCTGACCTGAGGAGGAGTCTGGAGGGCT
GAGTCTCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
GGATCAGAGGCTTTGGCAGAGCAGGAGGAGCAGTGAAGACATCCCTTCCGCGGAGGTCAGAT
CAATCTCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
TGCCTGGGAGCTTCTGGGGGAGGAGCTCCGACAGGAGCAGCGGGGGCTCTTGTCTGATGAGC
AGAACACCGCTGGTACCTGGGAGGCTTCCAGGAGTGGGGGAGCAGGCTGGGCGGAGAAACAACCTGG
TGTGTACACCAAGTGCAGAGTCTCCCTCCGATTTACAGCAGATGGAGAGCGAGTCCGATTACATA
AAATCTTAA

【 図 2 B 】

FIG. 2B.

ヒトエンドセリアーゼ-2 L のアミノ酸配列 (配列番号2)
(また、GenBank® GI No:14348016; EMB No:CAC41221.1; および WO0136604
を参照のこと)

MERDSHGASPARTPSAGASPAQASPAQTTPGRASPAQASPAQASPAQTTPGRASPAQASPAQTTPGRAS
PGRASPAQASPARASPALASLSRSSSSRSASASVITSPTRVYLVRATFVGAVPIRSSPARSAFTRA
TRSPGSLPKFTWREGQKQLFLIGCVLLLIALLVLSLII LQFWQSHGTGIRYKQRESCKHVRCDGVV
DCKLKSDELGCVRFWDKSLKLIYSGSSHQWLPICSNMNDYSSEKTCQGLFESRHRHTEVAHRDFANS
FSLIRYNSTIQESLSRSECPQRYISLQCSHGLRMTGRIVGGLASDSKWPQVSLHFGTTHICGGTL
IDAQWVLAHACHFFVTRKVLGKWKYAGTNSLHQLPEASIAEIIINSNVTDEEDDYDIALMRLSKPLT
LSAIIHFACLPMHGQTFSLNETGWITGFKTRTDQKTSFPLREVNQLIDFKKNDYLVYDSYLTFRPM
CAGDLRGRDRSCQDSDGGPLVCEQNNRWYLAGVTSWGTGCGQRNKPVTYKVI EVLFWIYSKMESEVRFI
EKAWIYFRGQLLGRCSPRS I FLCKVAMDFENVYSABDFVIVFVIKHLKMGIRSSWPPFALFVFLVLI
FLLLLLSFLKMTSDSILITITFTAVTRMLPENYHSFPFLKIFRQNLTLIKEYKVIK

【配列表】

2007528721000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月14日(2006.4.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2007528721000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月27日(2007.7.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列および軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む単離されたタンパク質であって、ここで、

(1)該第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列および第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が、ヒトエンドセラアーゼ-2(ET2)に特異的に結合する抗原結合部位を形成し；かつ

(2)該タンパク質が以下の特徴：

(a)該タンパク質が300nM未満の阻害定数(Ki)でET2を阻害する；

(b)該HC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のLC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である1つ以上のCDRを含む；

(c)該LC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のHC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である1つ以上のCDRを含む；

(d)該LC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のLC可変ドメインと少なくとも85%同一である；

(e)該HC免疫グロブリン可変ドメイン配列が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9のHC可変ドメインと少なくとも85%同一である；および

(f)該タンパク質が、A10、G3、A6、A7、C8、H9、G10-R2、F3-R2、C6-R2、A4-R3、C1-R3、A2、B5、D2、D5、F8、H10、またはC9によって結合されるエピトープと重複するエピトープに結合する、のうちの1つ以上を有する、タンパク質。

【請求項2】

前記タンパク質が、ET2活性部位に結合する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】

前記タンパク質が、E T 2 酵素活性を阻害する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記タンパク質が、インビボで血管新生の部位に蓄積する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記タンパク質が、血管基底膜のタンパク質分解を阻害する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記タンパク質が、インビトロまたはインビボで血管新生を阻害する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記 H C 可変ドメイン配列および L C 可変ドメイン配列が、同じポリペプチド鎖の成分である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記 H C 可変ドメイン配列および L C 可変ドメイン配列が、異なるポリペプチド鎖の成分である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記タンパク質が、全長抗体である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記抗体がヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記タンパク質が、ヒト抗体フレームワーク領域を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記タンパク質が、F c ドメインを含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記 H C 可変ドメイン配列が配列番号 89 を含み、前記 L C 可変ドメイン配列が配列番号 90 を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記タンパク質が、S C I D マウスモデルにおいて腫瘍増殖を減少する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

E T 2 に特異的に結合するタンパク質を同定する方法であって、該方法は：

E T 2 抗原を提供する工程；

ディスプレイライブラリーを提供する工程；

E T 2 抗原に特異的に結合する、該ライブラリー中に存在するメンバーを同定する工程であって、ここで該ライブラリーの各メンバーは、その表面上に異種タンパク質成分を提示し、各メンバーは該異種タンパク質成分をコードする核酸を含み、該異種タンパク質成分は多様なタンパク質成分のセットのメンバーである、工程；および

該同定されたメンバーから核酸分子を単離する工程であって、ここで、該核酸分子が E T 2 抗原に特異的に結合するポリペプチドをコードする、工程を包含する、方法。

【請求項 17】

前記ライブラリーがファージライブラリーである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記同定されたファージが、E T 2 に結合する競合リガンドを使用して溶出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

サンプル中のエンドセリアーゼまたはエンドセリアーゼ活性を検出する方法であって、該

方法は、請求項 1 に記載のタンパク質とサンプルを接触させる工程、および標識を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 20】

E T 2 発現細胞の活性を調節するための、請求項 1 に記載のタンパク質を含む組成物。

【請求項 21】

前記 E T 2 発現細胞は、ヒト被験体におけるものである、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記タンパク質が、E T 2 発現細胞の基質への結合を妨害する、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記細胞が癌細胞である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 24】

タンパク質分解を調節するための組成物であって、該組成物は、基質のタンパク質分解を阻害するために十分な量で請求項 1 に記載のタンパク質を含む、組成物。

【請求項 25】

前記基質が、増殖促進因子 (pro-growth factor) または血管新生促進因子 (pro-angiogenic factor) である、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記タンパク質分解の調節が、血管新生および / または細胞増殖を減少する、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 27】

細胞を死滅させるかまたは細胞の増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、該細胞を死滅させるかまたは該細胞の増殖を阻害するために十分な量で、請求項 1 に記載のタンパク質を含む、組成物。

【請求項 28】

前記細胞が癌細胞である、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

被験体においてエンドセリナーゼを検出するための、請求項 1 に記載のタンパク質を含む組成物であって、該組成物は、検出可能な標識をさらに含む、組成物。

【請求項 30】

被験体においてエンドセリナーゼの活性を調節するための組成物であって、該組成物は、エンドセリナーゼ活性の減少の必要がある被験体において、E T 2 活性を調節するために有効な量で、請求項 1 に記載のタンパク質を含む、組成物。

【請求項 31】

前記被験体がヒトである、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記タンパク質が、別の処置、または抗癌剤および / もしくは抗血管新生剤から選択される薬剤と組み合わせて投与されるのに適している、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 33】

望ましくない血管新生によって特徴付けられる障害を有するかまたは該障害に対する素因を有する被験体において、該障害を処置または予防するための、請求項 1 に記載のタンパク質を含む組成物。

【請求項 34】

前記障害が、関節リウマチ、乾癬、糖尿病網膜症、翼状片の再発のような眼の障害、瘢痕エキシマレーザ手術および緑内障濾過手術、心臓血管障害、慢性炎症性障害、創傷修復、循環障害、クレスト症候群、皮膚科学的障害、および癌からなる群より選択される障害である、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配

列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、または配列番号 24 に対して少なくとも 80% 同一である配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 36】

請求項 1 に記載の第 1 の免疫グロブリンドメイン含有タンパク質および/または第 2 の免疫グロブリンドメイン含有タンパク質を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の核酸配列を含む、ベクター。

【請求項 38】

請求項 36 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US2004/026148
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/40 A61K39/395 C12N15/63 C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/36604 A (CORVAS INTERNATIONAL, INC; MADISON, EDWIN, L; ONG, EDGAR, O) 25 May 2001 (2001-05-25) cited in the application page 56, line 26 - page 64, line 23; example 2	1-38
X	WO 01/96538 A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; XIAO, YONGHONG; GEDRICH, RICHARD) 20 December 2001 (2001-12-20) page 25, line 27 - page 29, line 10; sequence 12	1-38
X	WO 01/36645 A (CURAGEN CORPORATION; QUINN, KERRY, E; SPYTEK, KIMBERLEY, ANN; MAJUMDER) 25 May 2001 (2001-05-25) claims 1,15-17	1-38
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 May 2005		18/05/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Favre, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US2004/026148

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/37504 A (PFIZER, INC; ABGENIX, INC; HANSON, DOUGLAS, CHARLES; NEVEU, MARK, JOSE) 29 June 2000 (2000-06-29) figure 1	35 1-34, 36-38
X A	WO 02/086085 A (BAYER CORPORATION; MORPHOSYS AG; PAN, CLARK; KNORR, ANDREAS, M; SCHAUE) 31 October 2002 (2002-10-31) claim 21	35 1-34, 36-38
A	WO 02/070648 A (AUROX, LLC; KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA; ROBL, JAMES, M; GOLDSBY, RICH) 12 September 2002 (2002-09-12) the whole document	1-38
A	EP 1 262 193 A (PFIZER PRODUCTS INC) 4 December 2002 (2002-12-04) the whole document	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/026148**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 20-34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No
 PCT/US2004/026148

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136604	A	25-05-2001	AU 1623901 A	30-05-2001
			CA 2387805 A1	25-05-2001
			EP 1230349 A2	14-08-2002
			JP 2003514524 T	22-04-2003
			NZ 518407 A	30-01-2004
			NZ 529387 A	29-04-2005
			WO 0136604 A2	25-05-2001
			ZA 200203366 A	28-07-2003
			AU 3326201 A	14-08-2001
			CA 2396774 A1	09-08-2001
			EP 1252300 A2	30-10-2002
			JP 2003521920 T	22-07-2003
			WO 0157194 A2	09-08-2001
			US 2003119168 A1	26-06-2003
WO 0196538	A	20-12-2001	AU 7636101 A	24-12-2001
			WO 0196538 A2	20-12-2001
			EP 1294903 A2	26-03-2003
			US 2004209327 A1	21-10-2004
			US 2002061850 A1	23-05-2002
WO 0136645	A	25-05-2001	AU 1777901 A	30-05-2001
			CA 2391908 A1	25-05-2001
			EP 1244793 A2	02-10-2002
			JP 2003533174 T	11-11-2003
			WO 0136645 A2	25-05-2001
			US 2003077697 A1	24-04-2003
WO 0037504	A	29-06-2000	AU 772676 B2	06-05-2004
			AU 2214900 A	12-07-2000
			BG 105722 A	29-03-2002
			BR 9916853 A	20-11-2001
			CA 2356215 A1	29-06-2000
			CN 1328571 A	26-12-2001
			CZ 20012349 A3	17-10-2001
			EE 200100336 A	16-12-2002
			EP 1141028 A2	10-10-2001
			HR 20010551 A1	31-08-2002
			HU 0104604 A2	28-03-2002
			ID 29991 A	25-10-2001
			JP 2002537226 T	05-11-2002
			JP 2005087215 A	07-04-2005
			MX PA01006422 A	04-06-2002
			NO 20013147 A	23-08-2001
			NZ 512553 A	27-02-2004
			PL 349266 A1	01-07-2002
			SK 9142001 A3	03-12-2001
			TR 200101831 T2	21-12-2001
			TR 200200735 T2	21-06-2002
			WO 0037504 A2	29-06-2000
			US 6682736 B1	27-01-2004
			US 2004228858 A1	18-11-2004
			US 2004228861 A1	18-11-2004
			ZA 200105742 A	12-12-2002
WO 02086085	A	31-10-2002	CA 2445168 A1	31-10-2002
			EP 1381631 A2	21-01-2004
			JP 2004529647 T	30-09-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/026148

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02086085 A		WO 02086085 A2	31-10-2002
		US 2004105862 A1	03-06-2004
WO 02070648 A	12-09-2002	CA 2428053 A1	12-09-2002
		CN 1486365 A	31-03-2004
		EP 1343880 A2	17-09-2003
		JP 2005504507 T	17-02-2005
		WO 02070648 A2	12-09-2002
		US 2003056237 A1	20-03-2003
		US 2004068760 A1	08-04-2004
		US 2003037347 A1	20-02-2003
EP 1262193 A	04-12-2002	AU 4242102 A	28-11-2002
		CA 2382443 A1	23-11-2002
		CN 1404876 A	26-03-2003
		CZ 20021760 A3	14-05-2003
		EP 1262193 A1	04-12-2002
		HU 0201737 A2	28-02-2003
		JP 2002371013 A	26-12-2002
		PL 354112 A1	02-12-2002
		SK 7242002 A3	01-07-2003
		US 2003086930 A1	08-05-2003
		ZA 200204020 A	21-11-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
	A 6 1 P	29/00	
	G 0 1 N	33/53	N

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ニクソン, アンドリュー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 6 9, クインシー, クオリ - ストリート 1 5 0, アパートメント 5 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA61 CA01 GA11
 4B063 QA05 QQ36 QQ95 QR16 QR57 QS26 QX01
 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA02 BA08 BA23 CA53 CA56 DA27 NA14 ZA332
 ZA362 ZA892 ZA902 ZB112 ZB152 ZB212 ZB262 ZC202 ZC352
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	内切酶-2配体		
公开(公告)号	JP2007528721A	公开(公告)日	2007-10-18
申请号	JP2006523367	申请日	2004-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
[标]发明人	マディソンエドウィンエル ニクソンアンドリュウ		
发明人	マディソン, エドウィン エル. ニクソン, アンドリュウ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/40 C12Q1/37 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P17/06 A61P3/10 A61P27/02 A61P27/06 A61P9/00 G01N33/53 A61K39 /395 C07H21/04 C12N5/06		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/06 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 C07K16/40 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/40 C12Q1/37 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K37/02 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P3/10 A61P27/02 A61P27 /06 A61P9/00 A61P29/00 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/GA11 4B063/QA05 4B063 /QQ36 4B063/QQ95 4B063/QR16 4B063/QR57 4B063/QS26 4B063/QX01 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /BA02 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA892 4C084/ZA902 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC202 4C084/ZC352 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/495005 2003-08-14 US 60/520164 2003-11-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开特别提供了与内皮素-2 (ET2) 结合的蛋白, 例如以高亲和力和选择性抑制ET2的免疫球蛋白。ET2结合蛋白可用于治疗各种疾病, 包括血管生成相关疾病。在一个实施方案中, 本发明的特征在于结合ET2的蛋白质配体 (在本文中也称为ET2配体或ET2-结合配体)。通常, 该配体不是天然存在的。在一个实施方案中, 蛋白质配体包含重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。例如, 配体是全长抗体的抗体或抗原结合片段 (在本文中也称为抗-ET2抗体)。

(P2007-52872)			
(43) 公表日 平成19年10月18日 (2007. 10. 1			
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	ZNA A	4B024
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40		4B063
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37		4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15		4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19		4H045
	審査請求 有 予備審査請求 有 (全 98 頁) 最終頁に付		
(21) 出願番号	特願2006-523367 (P2006-523367)	(71) 出願人	504326804
(22) 出願日	平成16年8月12日 (2004. 8. 12)		ダイアックス コーポレイション
(23) 出願国	米国 (US)		アメリカ合衆国, 02139, マサチューセツツ州, ケンブリッジ, テクノロジー
(24) 国際出願番号	PCT/US2004/026148		スクエア 300番地
(25) 国際公開番号	W02005/019270	(74) 代理人	100078282
(26) 国際公開日	平成17年3月3日 (2005. 3. 3)		弁理士 山本 秀策
(27) 優先権主張番号	60/495, 005		100062409
(28) 優先日	平成15年8月14日 (2003. 8. 14)		弁理士 安村 高明
(29) 優先権主張国	米国 (US)		100113413
(30) 優先権主張番号	60/520, 164		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先日	平成15年11月14日 (2003. 11. 14)		マディソン, エドウィン エル.
(32) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94
			16, サン フランシスコ, クイン,
			ラ ストリート 745
			最終頁に続く