

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-509152

(P2009-509152A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	2 G O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 4
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	4 CO 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-531717 (P2008-531717)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月25日 (2006. 9. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月26日 (2008. 5. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/066697
 (87) 国際公開番号 W02007/039507
 (87) 国際公開日 平成19年4月12日 (2007. 4. 12)
 (31) 優先権主張番号 05108816.9
 (32) 優先日 平成17年9月23日 (2005. 9. 23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 596113096
 ノボ・ノルディスク・エー/エス
 デンマーク国, バッグスヴァエルト ディ
 ーケー 2880, ノボ アレー
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 スピー, ピエター
 デンマーク国 ディーケー 3450 ア
 レレド, オルキデヴェイ 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オーフアンレセプターのリガンドに対して抗体を同定する方法

(57) 【要約】

オーファンレセプターのこれまで未知のリガンド又は他のオーファンリガンド、すなわち対-リガンドがまだ同定されていない他のリガンド又はレセプターに対する抗体を同定する方法を記載する。未知のリガンドに結合する抗体が入手可能になると、それらの単離及び特徴付けが顕著に容易になり、同定された抗体は、それ自体で、癌又は自己免疫疾患、又は他の疾病を患っている患者の治療に有用である。実施態様は、競合的スクリーニングによる治療用抗体の同定 (ITACS) と題した方法を提供する。また、抗体のFc部分とNKp30等のオーファンレセプターの可溶性部分を含む融合タンパク質も記載する。融合タンパク質は、典型的には可動性膜貫通リンカー (FTL)、すなわちオーファンレセプターの膜貫通ドメインの一部を含むリンカーを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オーファンNK細胞レセプターであるオーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、

(a) オーファンリガンドが結合する標的細胞の第一調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；

(b) 脊椎動物の脾臓の抗体産生細胞から、少なくとも一の被験抗体を調製し；

(c) 標的細胞の第二調製物への結合についてオーファンリガンドと競合する被験抗体を、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体として選択することを含む方法。

10

【請求項 2】

選択が、

オーファンリガンドの可溶性部分を含む参照薬剤の存在下及び不在下において、標的細胞の第二調製物に対する被験抗体の結合性を比較し、

結合性が、参照薬剤の不在下より参照薬剤の存在下での方が低い被験抗体を同定することを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

選択が、

被験抗体の存在下及び不在下において、標的細胞の第二調製物に対するオーファンリガンドの可溶性部分を含む参照薬剤の結合性を比較し、

結合性が、抗体の不在下より抗体の存在下での方が低い被験抗体を同定することを含む請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

参照薬剤が、完全長オーファンレセプター、オーファンリガンドの細胞外断片、又はオーファンリガンドの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質である請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

融合又はハイブリッドタンパク質が、場合によってはリンカーを介して、抗体Fcドメインに共有結合するオーファンリガンドの可溶性部分を含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

融合又はハイブリッドタンパク質が、オーファンリガンドの膜貫通部分の少なくとも一のアミノ酸残基を更に含有する請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

参照薬剤が、細胞膜又は固体担体に付着した完全長オーファンリガンドである請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 8】

参照薬剤が、固体担体に付着したオーファンリガンドの可溶性部分である請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも一の参照薬剤と抗体が検出可能な部分で標識されている請求項 2 から 8 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

検出可能な部分が、蛍光、発光又は放射性化合物である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体産生細胞がB細胞である請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

抗体産生細胞がハイブリドーマ細胞である請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】

標的細胞の第一及び第二調製物の各々が、無傷細胞及び細胞膜から別々に選択される請

50

求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

標的細胞の第一及び第二調製物が同じ細胞株からのものである請求項 1 から 1 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

脊椎動物がマウス又はラットである請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

オーファンリガンドがNK細胞活性化レセプターである請求項 1 から 1 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

NK細胞活性化レセプターが、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80、又はCD69である請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

NK細胞活性化レセプターがNKp30である請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

(c)において選択される抗体が、細胞表面結合リガンドへのオーファンリガンドの結合をブロックする請求項 1 から 1 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

オーファンリガンドへの細胞表面結合標的リガンドの結合をブロックする抗体又は抗体断片を同定する方法であって、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の方法に従い抗体を同定し、少なくとも20%まで、オーファンリガンドへの細胞表面結合標的リガンド間の結合を低減する抗体を選択することを含む方法。

【請求項 2 1】

(c)請求項 1 から 2 0 の何れか一項に記載の方法に従い抗体を同定し、

(d)抗体産生細胞から抗体を産生する

工程を含む、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を産生する方法。

【請求項 2 2】

(e)請求項 1 から 2 0 の何れか一項に記載の方法に従い抗体を同定し；

(f)抗体をコードする核酸を調製し；

(g)核酸で宿主細胞を形質転換させ；

(h)核酸が発現し抗体が産生されるように、宿主細胞を培養する

工程を含む、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を産生する方法。

【請求項 2 3】

宿主細胞培養体から抗体を回収することを更に含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

第二のリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって

(d)第二のリガンドが結合する標的細胞の第一調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；

(e)脊椎動物の脾臓の抗体産生細胞から被験抗体を調製し；

(f)標的細胞の第二調製物への結合について第二のリガンドと競合する抗体を、第二のリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体として選択することを含む方法。

【請求項 2 5】

第二のリガンドがCD83である請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体又は抗体断片を同定する方法であって、

(d)オーファンリガンドが結合する標的細胞の調製物を提供し；

10

20

30

40

50

(e) 標的細胞の調製物への結合についてオーファンリガンドと競合する抗体について、被験抗体又は抗体断片のライブラリーをスクリーニングし；

(f) オーファンリガンドと競合する抗体又は抗体断片を選択することを含む方法。

【請求項 27】

ライブラリーがファージ-ディスプレイライブラリーである請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

NK p 30、NK p 44、及びNK p 46 から選択されるNK細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、

(g) NK細胞レセプターが結合する細胞株を提供し；

(h) 上記細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で、少なくとも一の脊椎動物を免疫し；

(i) 少なくとも一の脊椎動物の脾臓からB細胞を単離し；

(j) 単離されたB細胞からハイブリドーマを調製し；

(k) 抗体Fcドメイン及びNK細胞レセプターの可溶性部分を含む融合タンパク質の(i)存在下及び(ii)不在下において、細胞株の細胞に対する各ハイブリドーマからの抗体の結合性を評価し；

(l) (i)における結合性が(ii)における結合性よりも低い抗体を選択することを含む方法。

【請求項 29】

NK p 30、NK p 44、及びNK p 46 から選択されるNK細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、

(g) NK細胞レセプターが結合する細胞株を提供し；

(h) 細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で、少なくとも一の脊椎動物を免疫し；

(i) 少なくとも一の脊椎動物の脾臓からB細胞を単離し；

(j) 単離されたB細胞からハイブリドーマを調製し；

(k) 各ハイブリドーマからの抗体の(i)存在下及び(ii)不在下において、細胞株の細胞への、抗体Fcドメイン及びNK細胞レセプターの可溶性部分を含む融合タンパク質の結合性を評価し；

(l) (i)における結合性が(ii)における結合性よりも低いハイブリドーマからの抗体を選択することを含む方法。

【請求項 30】

NK細胞レセプターがNK p 30である請求項 28又は29に記載の方法。

【請求項 31】

融合タンパク質が配列番号4、5及び6の何れかの配列を含む請求項 30に記載の方法。

【請求項 32】

NK p 30Lに結合する薬剤を同定する方法であって、

(d) 複数の被験薬剤を提供し；

(e) NK p 30の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含む可溶性NK p 30-Fc融合タンパク質の(i)存在下及び(ii)不在下における、NK p 30Lを発現する細胞株への各被験薬剤の結合性を評価し；

(f) (i)における結合性が(ii)における結合性より低い被験薬剤を選択することを含む方法。

【請求項 33】

NK p 30Lに結合する薬剤を同定する方法であって、

(a) 複数の被験薬剤を提供し；

(b) 各被験薬剤の存在下における、NK p 30Lを発現する細胞株への、NK p 30の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含む可溶性NK p 30-Fc融合タンパク質の結合性を評価し；

10

20

30

40

50

(c) 被験薬剤の存在下における結合性が被験薬剤の不在下における結合性より低い被験薬剤を選択することを含む方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 から 3 3 の何れか一項に記載の方法に従い同定された抗体、抗体断片又は薬剤。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の抗体の断片又は誘導体。

【請求項 3 6】

NK細胞レセプターの膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含むリンカーを介して抗体Fcドメインに共有結合するNKp30、NKp44及びNKp46から選択されるNK細胞レセプターの可溶性リガンド結合断片を含む融合タンパク質。

10

【請求項 3 7】

NK細胞レセプターがNKp30であり、融合タンパク質が配列番号1の少なくともアミノ酸残基20 - 138を含む請求項36に記載の融合タンパク質。

【請求項 3 8】

リンカーが、配列番号1の少なくともアミノ酸残基140 - 141を含む請求項36又は37に記載の融合タンパク質。

【請求項 3 9】

可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号1の141、142、143、144、145、146、147、148及び149から選択される残基に相当する請求項36から38の何れか一項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 4 0】

可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号1の残基149に相当する請求項36から39の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 1】

可溶性リガンド結合断片のN末端残基が、配列番号1の残基20に相当する請求項36から40の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 2】

可溶性リガンド結合断片のN末端残基が、配列番号1の残基20に相当し、可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号1の残基149に相当する請求項36から41の何れか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 4 3】

配列番号4及び5の何れかを含む請求項37に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 4】

配列番号4及び5の何れかからなる請求項37に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 5】

NK細胞レセプターがNKp44であり、融合タンパク質が配列番号2の少なくともアミノ酸残基193 - 195を含む請求項36に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 6】

可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号2の195、196、197、198、199、200、201、202又は203から選択される残基に相当する請求項45に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 4 7】

NK細胞レセプターがNKp46であり、融合タンパク質が配列番号3の少なくともアミノ酸残基256 - 258を含む請求項36に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 8】

可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号3の258、259、260、261、262、263、264、265及び266から選択される残基に相当する請求項47に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 49】

細胞のNK細胞媒介性死滅を阻害する方法であって、請求項34又は35に記載の抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は請求項36から48の何れか一項に記載の融合タンパク質を、細胞表面結合リガンドを発現する細胞と接触させることを含む方法。

【請求項 50】

癌又はウイルス性疾患を治療する方法であって、請求項34又は35に記載の抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は請求項36から49の何れか一項に記載の融合タンパク質の有効量を患者に投与することを含み、抗体、抗体断片、抗体誘導体又は融合タンパク質が、細胞傷害性部分にコンジュゲートしているか、又はADCC又はCDC反応を誘因可能である方法。

【請求項 51】

細胞傷害性部分が毒素又は放射性化合物である請求項50に記載の方法。

【請求項 52】

自己免疫疾患を治療する方法であって、請求項34又は35に記載の抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は請求項36から49の何れか一項に記載の融合タンパク質の有効量を患者に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、例えばオーファンレセプターのような、オーファンリガンドに対する細胞表面結合リガンド、及びそのような細胞表面結合リガンドに対する抗体又は他の薬剤の同定、並びに様々な病状及び疾患の治療方法におけるそれらの使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

ナチュラルキラー(NK)細胞は、腫瘍及びウイルス感染の免疫監視に主要な役割を担っている。NK細胞は、標的細胞と遭遇すると、レセプターの活性化を介してデフォルトにより活性化され、潜在的標的細胞を殺すか残すかの選択は、NK細胞抑制レセプターによりコントロールされると長い間信じられていた。しかしながら、近年の研究では、NK細胞は、阻害シグナル伝達がない場合でさえ、病変又は異常細胞のみを殺し、健常細胞は殺さないことが示唆されている。このことは、NKレセプターを活性化させるリガンドが、異常な、病変し、ストレスを受け又は感染した標的細胞により主として発現されうること示唆している。例えば、活性化NK細胞レセプターNKGD2に対するリガンドであるMICA及びMICBの発現は、殆どの正常組織では生じないが、ウイルス及び細菌感染により誘導され得、多くの上皮由来の腫瘍により発現される。

【0003】

NKp30、BMOG、1C7、HGNC:14189、LY117及び天然の細胞毒性誘因レセプター3としても知られているナチュラルキラー細胞p30関連タンパク質は、標的細胞のNK媒介性死滅の決定における重要な因子として機能する主要なNK細胞活性化レセプターの一つである。NK細胞誘因の原因となる他の主要なレセプターには、NKp44及びNKp46(Moretta及びMoretta(EMBO J 2004; 23:255-9))が含まれる。NKp30、NKp44及びNKp46は、幾つかのタイプの腫瘍細胞、例えば白血病、リンパ腫、メラノーマ、肺腺癌、神経芽細胞腫及び神経膠芽腫、及び/又は肝細胞癌のNK細胞媒介性死滅に関与しており、多くの場合、このような死滅は、これらのレセプターの一又は複数に対する抗体によって阻害され又は減じられうることが示されている(例えば、Castriconiら, Cancer Res. 2004; 64(24):9180-4; Pendeら, Blood. 2005 105(5):2066-73, Pendeら, J Exp Med. 1999 Nov 15; 190(10):1505-16を参照。Morettaら, Annual Review of Immunology Vol. 19:197-223に概説)。

【0004】

NKp30、NKp44及びNKp46に対する各リガンド(ここではNKp30L、

10

20

30

40

50

NK p 4 4 L、及びNK p 4 6 Lとそれぞれ称する)は、これらのレセプターの活性化が役割を果たしている癌及び他の疾患の治療のための代替の有用な治療標的でありうる。ウイルスタンパク質、例えば赤血球凝集素は、NK p 4 4 及びNK p 4 6 に対するリガンドとなることに関連付けられているが(Mandelboimら, Nature, Vol.409(6823)pp.1055-1060 (2001), Arnonら European journal of immunology, Vol.31(9)pp.2680-2689(2001))、ストレス関連又は癌関連NK p 3 0 L、NK p 4 4 L 及びNK p 4 6 Lを含む、天然に発現されたNK p 3 0 L、NK p 4 4 L 及びNK p 4 6 Lは今日まで同定されていない。NK細胞活性化を低減させる薬剤の能力に頼った機能的スクリーニング及び生物学的アッセイで、NK p 3 0、NK p 4 4、NK p 4 6、及びウイルス感染(Vieillard)に関連したNK p 4 4 -リガンドとされるものに対する抗体が同定されたが、このようなアッセイは、通常は、高スループットスクリーニングには適していない。NK p 3 0、NK p 4 4 又はNK p 4 6 レセプターと免疫グロブリンFcドメインとの間の融合タンパク質(例えば、国際公開第9923867号、国際公開第200208287号、国際公開第2004053054号、国際公開第2005000086号、国際公開第2005051973号、及びR&D Systems Inc., Catalog No. 1849-NK)は、それぞれNK p 3 0 L、NK p 4 4 L 及びNK p 4 6 Lに結合可能である。しかしながら、可溶性レセプターはしばしば比較的低親和性で細胞表面リガンドに結合し、治療用途へのそれらの有用性を制限するため、そのような融合タンパク質を調製することは挑戦でありうる。

10

【0005】

よって、NK細胞レセプターを活性化させる細胞表面結合リガンド及び他のオーファンリガンドに対する治療法は、多くのそのような細胞表面結合リガンドの同定が未だなされていない事実によってこれまで妨害されている。例えば、伝統的な抗体産生が、典型的には、既知の特徴付けられた抗原を用いて実験動物を免疫することに頼っているため、オーファンレセプターのリガンドに結合するモノクローナル抗体を同定することは困難である。抗原それ自体の不在下において、代替法は、例えば抗原として固定化細胞を使用する、ヒトB細胞のインビトロ免疫化に基づきうる(例えば、米国特許第6541225号及び欧州特許第0218158号)。しかしながら、そのような方法は、多量のヒトB細胞個体群にアクセスする必要がある、ある範囲の細胞性抗原に対する抗体が生じることになる。

20

【0006】

従って、オーファンNK細胞レセプターに対する細胞結合リガンド及びリガンド対の他のオーファンメンバー、並びにそのような細胞結合性リガンドに対する抗体と他の標的薬剤を同定するための簡便な方法が当該分野において必要とされている。本発明は、当該分野におけるこれらの必要性及び他の必要性を解決するものである。

30

【0007】

(発明の概要)

本発明は、オーファンレセプターの未知のリガンド又は他のオーファンリガンド、すなわち対-リガンド(counter-ligand)が未だ同定されていない他のリガンド又はレセプターでありうる抗原に対する抗体を産生し同定する方法を提供する。一側面では、このような方法は、標的細胞(例えばオーファンリガンドが結合する細胞)の調製物で動物を免疫し、標的細胞への結合についてオーファンリガンドと競合する動物産生抗体を同定することを含む。競合的スクリーニングによる治療用抗体の同定(Identification of Therapeutic Antibodies by Competitive Screening)(ITACS)と標記されたこのような方法の例示的实施態様を図1に示す。

40

【0008】

本発明はまた例えばNK p 3 0のようなレセプターの可溶性部分と、IgG抗体のFc部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質を提供する。一側面では、融合又はハイブリッドタンパク質は、可動性膜貫通リンカー(FTL)の一部、すなわちオーファンレセプターの膜貫通ドメインの一部を含むリンカーを含む。

本発明のこれら及び他の側面、特徴及び実施態様を、以下に更に詳細に記載する。

50

【 0 0 0 9 】

(定義)

「リガンド対」は、検出可能で選択的に互いに結合可能な少なくとも2つのリガンドを含む物質である。リガンド対の結合を検出するための多くの方法が当該分野で知られており、しばしば一つのリガンドを固体表面、細胞又はビーズに結合させ、リガンド対の一又は複数のメンバーを検出可能な部分で標識することに基づく。リガンド対の例示的かつ非限定的例には、タンパク質-タンパク質、レセプター-リガンド、レセプター-ホルモン、及び抗体-抗原リガンド対が含まれる。

リガンド対の「オフアンリガンド」は、少なくとも一つの方のリガンドが同定されていないリガンド対の既知のメンバーである。ここに記載される一つの例示的かつ非限定的タイプのオフアンリガンドはオフアンレセプターである。

「標的リガンド」は、オフアンレセプターに結合する未同定のリガンドである。

【 0 0 1 0 】

ここで使用される場合、「レセプター」とは、リガンド対の細胞-結合メンバーのことであり、レセプターにリガンドが結合することにより、細胞に対する一又は複数の検出可能な効果をもたらし得る。疑念を避けるために、細胞表面結合リガンドはレセプターとしても機能し得る。よって、特定のリガンド対に対して、メンバーの双方又は一方がレセプターであってもよいし、何れもレセプターではない場合もあり得る。「可溶性レセプター」は、溶液中で存在可能であり、しばしばレセプターの少なくとも細胞外部分を含むレセプターの一部である。ここに記載される例示的レセプターには、NK細胞活性化及び抑制レセプターが含まれる。

【 0 0 1 1 】

「細胞表面結合リガンド」とは、リガンド対の細胞表面結合メンバーのことであり、リガンド対の結合が細胞外で生じ得る。

【 0 0 1 2 】

ここで使用される場合、「抗体」なる用語は、モノクローナル又はポリクローナル抗体の少なくとも抗原結合部分を含む抗原結合タンパク質を意味し、限定されるものではないが、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G (Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3 及び Ig G 4 アイソタイプ) 及び Ig M タイプの完全長抗体、並びに、例えば Fab、F(ab)₂、F(ab')₂、Fd、scFv、及び dsFv 断片を含む、当該分野で知られている抗体断片が含まれる。抗体は、限定されるものではないが、マウス及びヒトを含む任意の由来のものとすることができ、限定されるものではないが、キメラ、ヒト化又は単鎖抗体を含む、親抗体又は抗体類の修飾型であってもよい。前後関係で矛盾しない限り、「抗体」及び「Ig G」なる用語は、ここで相互に交換可能に使用される。

【 0 0 1 3 】

ここで使用される場合、「抗体断片」は全長抗体の一部を含み、抗原に結合可能なものである。典型的には、抗体断片は、抗体の少なくともCDR領域を含んでいる。例示的な抗体断片には、限定されるものではないが、Fab、F(ab)₂、F(ab')₂、Fd、scFv、及び dsFv 断片が含まれる。

【 0 0 1 4 】

ここで使用される場合、「抗体誘導体」は、通常は抗体の一部ではない化学的化合物又は非抗体ペプチドとコンジュゲートもしくは他の結合をした抗体又は抗体断片である。例示的な抗体誘導体は、細胞傷害剤又は放射性核種にコンジュゲートした抗体又は抗体断片である。

【 0 0 1 5 】

オフアンレセプターの細胞表面結合リガンド間の結合を「ブロック」する抗体は、典型的には用量依存的様式で、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、又は少なくとも約50%、可溶性レセプター又はリガンド(又は、例えばその可溶性断片又はFcコンストラクト)の結合を低減する抗体である。抗体がこのようなブロックを可能であるかどうかを測定するためのアッセイ例を実施例4に提供する。

10

20

30

40

50

【0016】

「ペプチド」、「タンパク質」及び「ポリペプチド」等の用語は、ここでは他のものをサポートしており、別の定義がなされないか前後関係から矛盾しない限り、一般的には相互可能に使用されると理解される。更に、ここで使用される「ペプチド」及び「タンパク質」等の用語は、一般的には、(例えばアミノ酸の数、タンパク質分子中の結合鎖の数、全体的な大きさ等)任意の適切な大きさ及び組成の任意の適切なペプチドを意味すると理解される。更に、ここに記載される本発明の方法及び組成物のペプチドは、別の定義がなされないか前後関係から矛盾しない限り、自然に生じない及び/又は非Lアミノ酸残基を含みうる。

【0017】

「ハイブリッド」タンパク質は、ペプチド結合以外の少なくとも一の結合(例えば、ピオチン/アビジンを介した親和相互作用又は化学的カップリング)を介して連結した2つのポリペプチドセグメントを含むタンパク質である。

「融合」タンパク質は、例えば組換えプロセスにより産生した、ペプチド結合により連結した2つのポリペプチドセグメントを含むタンパク質である。

【0018】

本発明において、「治療」又は「治療する」とは、前後関係で矛盾しない限り、疾患もしくは疾病の一又は複数の徴候、又は臨床的に関連した症状を、予防し、軽減し、管理し、治癒し又は低減することを言う。例えば、疾患もしくは疾病の徴候又は臨床的に関連した病状がないと確認されている患者の「治療」は予防的治療であるが、疾患もしくは疾病の徴候又は臨床的に関連した病状が確認されている患者の「治療」は、一般的には予防的治療を構成しない。

【0019】

「治療的有効量」とは、宿主において所望される治療結果を達成するために、適切な用量及び適切な期間で送達させた場合の有効な量を意味する。例えば、癌治療に関し、治療的有効量は、癌進行の一又は複数の局面を低減し、所定期間(例えば最初の癌治療後18 - 60ヶ月)以上の生存可能性を高め、癌細胞に関連した増殖速度を低減し、及び/又は腫瘍増殖の再発可能性を低減させることのできる量でありうる。治療的有効量は、個体の疾患の状態、年齢、性別、及び体重、及び個体に所望される反応を誘発させる治療剤の能力等の要因に従って変わりうる。また治療的有効量は、治療的に有益な効果が治療剤部分のあらゆる毒性又は有害な影響を上回るものである。

【0020】

「予防的有効量」とは、所望される予防的結果(例えば、予防レジメンを受けていない同様の患者と比較して、疾病の発病可能性の低減、疾病の強さ又は広がり、切迫した疾病の生存可能性の向上、疾患状態の発病の遅延化、切迫した病状の速度の低減)を達成するのに必要な期間、用量での有効な量を意味する。典型的には、予防的用量は、疾患の前又は初期の段階に患者に使用されるため、予防的有効量は治療的有効量よりも少ない。

【0021】

「有効量」なる表現が「治療的」又は「予防的」等の修飾詞なしで使用される場合、該表現は、少なくとも最小の予防的有効量又は治療的有効量と同程度で、効能用途に適切な量を意味することを意図している。「有効量」なる用語は、別の定義がなされないか前後関係から明らかな矛盾がない限り、「予防的有効量」と「治療的有効量」の双方を含む。

【0022】

(発明の記載)

この発明は、オーファンNK細胞レセプターの未同定の細胞表面結合「標的」リガンド、及び他のオーファンリガンドに対する抗体を産生し同定するための簡便で効果的な方法、及び既知のコンストラクトよりも優れた特性を有する、可溶性リガンド、例えばレセプターと、IgG Fc-ドメインとの間のコンストラクトの発見に部分的に基づく。ここで、方法は、競合的スクリーニングによる治療用抗体の同定(Identification of Therapeut

10

20

30

40

50

ic Antibodies by Competitive Screening)(I T A C S)に示されており、特にオーファンレセプターに対する未知のリガンドに対する抗体を同定するために適用可能である。しかしながら、他の側面では、同じ方法工程が、既知の細胞表面結合リガンドに対する抗体を同定するために使用される(レセプターがオーファンではない場合)。

【 0 0 2 3 】

一側面では、 I T A C S 法は、

(i) 例えば、オーファンレセプターが結合する細胞株(「標的細胞」)を試験することにより、その細胞表面上で未知の標的リガンドを発現する細胞株を同定し；

(i i) (i) において同定された細胞株(又はその膜調製物)を使用し、脊椎動物、通常は例えばマウス又はラット等の実験動物を免疫し；

(i i i) 脊椎動物から、例えばハイブリドーマのような抗体産生細胞を調製し；

(i v) (i) で同定された細胞株への結合についてオーファンレセプターと競合する抗体産生細胞から抗体をスクリーニングする

工程を含む。

同定された抗体は、標的リガンドに結合し、標的リガンドとオーファンレセプターとの間の相互作用をブロックする能力により特徴付けられる。

【 0 0 2 4 】

本方法は、有利には、例えば F m a t スキャナー(PE Biosystems, CA)、又は F A C S アレイ(Beckton Dickinson, CA)、又は他の製造者からの類似のタイプの分析器を使用し、高スループットフォーマットで適用することができる。オーファンレセプターに対する細胞結合リガンド又は他のオーファンリガンドに対する抗体を同定することに関連してしばしば記載されているが、 I T A C S は、一般的には、リガンド対の細胞結合メンバーに結合する薬剤を製造し選択するための全ての細胞外リガンド-リガンド相互作用に適用可能である。しかしながら、オーファン N K 細胞レセプター N K p 3 0、 N K p 4 4、 C D 6 9 及び N K p 4 6、及び樹状細胞上のオーファン C D 8 3 分子は、特に I T A C S による使用に対して考慮される。実際、実施例 5 及び実施例 8 に記載されているように、 I T A C S は N K p 3 0 L に対して特異的な抗体を同定した。

【 0 0 2 5 】

例えば、オーファンレセプターのリガンド結合ドメインと抗体の F c -ドメインを少なくとも含む融合又はハイブリッドタンパク質の使用は、本発明の特定の態様である。例えば、このような融合又はハイブリッドタンパク質は、工程(i)及び/又は(i v)に使用され得、例えば F c ドメインに対する二次抗体による、標的リガンド発現細胞(「標的細胞」)へのオーファンレセプターの結合の検出を容易にする。

【 0 0 2 6 】

ここに記載される新規のオーファンリガンド-F c コンストラクトは、未知のリガンドを標的とする治療薬自体として、また I T A C S に使用される試薬としての双方に使用することができる。特定の態様では、新規のオーファンリガンド-F c コンストラクトは、オーファンリガンドの可溶性のリガンド結合部分に隣接する膜貫通領域の一部を含む。この膜貫通誘導部分は、ここでは可動性膜貫通誘導リンカー(F T L)と称される。図 4 に示されるように、このようにしてデザインされた N K p 3 0 - F c 融合タンパク質(s o l N K p 3 0 - F T L - F c)は、従来の N K p 3 0 - F c コンストラクトと比較して、改善されたリガンド結合特性を有していた。よって、本発明は、膜貫通領域の上流が切断された従来のコンストラクトとは対照的に、 N K p 3 0 と、膜貫通領域に通常見出される配列を取り込んでいる他のレセプターの融合又はハイブリッドタンパク質を提供する。

【 0 0 2 7 】

ここに記載されているように、 I T A C S により同定されている抗体又は他の薬剤、又はオーファンリガンドのリガンドに結合する融合又はハイブリッドタンパク質は、リガンド-オーファンリガンド結合対に関連した病状を治療するために治療的に使用することができる。このような病状には、限定されるものではないが、癌、自己免疫疾患、及びウイルス感染が含まれる。また「枯渴」抗体(すなわち、 A D C C 又は C D C 反応を誘因可能

10

20

30

40

50

な抗体又は他の薬剤)を選択すると、癌及びウイルス感染の治療に適した治療剤を生じうるが、「非枯渴」抗体は、関節リウマチ、多発性硬化症、及びI型糖尿病等の自己免疫疾患の治療に適している場合がある。一側面では、オーファンNK細胞活性化レセプター(例えば、NKp30、NKp44又はNKp46)のリガンドを標的とする抗体、融合タンパク質、又は他の薬剤の場合では、このような抗体、融合タンパク質、又は他の薬剤は、標的細胞のNK細胞により媒介される溶解を低減又は阻害するそれらの能力により特徴付けられる。ここに記載の同定された抗体又は抗体断片、又は融合もしくはハイブリッドタンパク質の他の用途には、リガンド発現を検出するための診断用途、並びに未知のリガンドを単離し特徴付ける方法が含まれる。

【0028】

よって、本発明は、例えばオーファンレセプター、特にNKp30(配列番号1)、NKp44(配列番号2)、NKp46(配列番号3);NKp80(配列番号13)、CD83(配列番号14);及びCD69(配列番号15)等、オーファンリガンドに細胞結合リガンドを結合させる薬剤を同定するための新規方法を提供する。また本発明は、このようなりガンドに結合する新規抗体及び融合タンパク質、及び癌及び他の疾患又は疾病を治療するための治療剤としてのこれらの使用を提供する。

【0029】

一側面では、本発明は、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)オーファンリガンドが結合する細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し;(b)脊椎動物の脾臓から抗体産生細胞を調製し;及び(c)抗体産生細胞から抗体を選択することを含み、その抗体は細胞又は細胞膜への結合についてオーファンリガンドと競合する。

【0030】

他の側面では、本発明は、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を産生する抗体産生細胞を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)オーファンリガンドが結合する細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し;(b)実験動物の脾臓から抗体産生細胞を調製し;及び(c)細胞又は細胞膜への結合についてオーファンリガンドと競合する抗体を産生する抗体産生細胞を選択することを含む。

【0031】

上記方法の何れかの特定の実施態様では、選択は、(i)完全長オーファンリガンド、オーファンリガンドの可溶性部分、及びオーファンリガンドの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質からなる群から選択される参照タンパク質の存在下及び不在下における細胞株の細胞に対する、抗体産生細胞からの抗体の結合性を比較し、及び(ii)結合性が、参照タンパク質の不在下より参照タンパク質の存在下の方が低い任意の抗体を同定することを含む。別の実施態様では、選択は、(i)抗体産生細胞からの抗体の存在下及び不在下における細胞株の細胞に対する、完全長オーファンリガンド、オーファンリガンドの可溶性部分、及びオーファンリガンドの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質からなる群から選択される基準タンパク質の結合性を比較し、及び(ii)結合性が、抗体の不在下より抗体の存在下の方が低い任意の抗体を同定することを含む。これらの実施態様における融合又はハイブリッドタンパク質は、場合によってはリンカーを介して、抗体Fcドメインに結合又は共有結合しているオーファンリガンドの可溶性部分を含んでいてもよい。またあるいは別に、融合又はハイブリッドタンパク質は、オーファンリガンドの膜貫通部分の少なくとも一のアミノ酸残基を更に含んでいてもよい。完全長オーファンリガンド又はオーファンリガンドの可溶性部分は、細胞膜又は固体支持体に付着していてもよい。特定の実施態様では、少なくとも一の参照タンパク質及び抗体は、検出可能な部分で標識されている。例えば、検出可能な部分は、蛍光、発光又は放射性化合物でありうる。

【0032】

場合によっては、(a)の細胞又は細胞膜は、(c)の細胞又は細胞膜と同じ細胞株からのものである。

10

20

30

40

50

これらの方法における抗体産生細胞は、例えばB細胞又はハイブリドーマ細胞でありうる。抗体は、例えばマウス又はヒト抗体でありうる。実験動物は、例えばマウス又はラットでありうる。

【0033】

上述の方法の何れにおいても、オーファンリガンドはオーファンレセプターであってもよい。考慮されるオーファンレセプターの一つのタイプは、NK細胞活性化レセプター等の、NK細胞の表面で発現するレセプターである。この実施態様では、オーファンレセプターは、例えばNK p 30、NK p 44、NK p 46、NK p 80、及びCD 69から選択することができる。他の側面では、オーファンリガンドはCD 83である。

【0034】

上述の方法の何れにおいても、(c)で選択される抗体は、細胞表面結合リガンドへの、オーファンリガンドの結合をブロックし得る。従って、本発明は、オーファンリガンドへの細胞表面結合リガンドの結合をブロックする抗体又は抗体断片を同定する方法を提供するものであり、該方法は、上述した方法の何れかの工程(a)から(c)を含む。

【0035】

他の側面では、本発明はオーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体又は抗体断片を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)オーファンリガンドが結合する細胞株を提供し；(b)細胞への結合についてオーファンリガンドと競合する抗体に対し、抗体又は抗体断片のライブラリーをスクリーニングし；及び(c)オーファンリガンドと競合する任意の抗体又は抗体断片を選択することを含む。ライブラリーは、例えばファージ-ディスプレイライブラリーでありうる。

【0036】

他の側面では、本発明はNK p 30、NK p 44、及びNK p 46から選択されるNK細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)NK細胞レセプターが結合する細胞株を提供し；(b)細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；(c)少なくとも一の脊椎動物の脾臓からB細胞を単離し；(d)単離されたB細胞からハイブリドーマを調製し；(e)抗体FcドメインとNK細胞レセプターの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質の(i)存在下及び(ii)不在下における、細胞株の細胞への、各ハイブリドーマからの抗体の結合性を評価し；及び(f)(i)における結合性が(ii)における結合性より低い任意の抗体を選択することを含む。

【0037】

また本発明は、NK p 30、NK p 44、及びNK p 46から選択されるNK細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)NK細胞レセプターが結合する細胞株を提供し；(b)細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；(c)少なくとも一の脊椎動物の脾臓からB細胞を単離し；(d)単離されたB細胞からハイブリドーマを調製し；(e)各ハイブリドーマからの抗体の存在下における、細胞株の細胞への、抗体FcドメインとNK細胞レセプターの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質の結合性を評価し；及び(f)結合性が、任意のハイブリドーマの不在下よりハイブリドーマの存在下の方が低いハイブリドーマからの任意の抗体を選択することを含む。一実施態様では、NK細胞レセプターはNK p 30である。他の実施態様では、融合タンパク質は配列番号4、5及び6の何れかの配列を含む。

【0038】

他の側面では、本発明はNK p 30 Lに結合する薬剤を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)複数の被験薬剤を提供し；(b)NK p 30の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含む可溶性NK p 30-Fc融合又はハイブリッドタンパク質の(i)存在下及び(ii)不在下における、NK p 30 Lを発現する細胞株への、各被験薬剤の結合性を評価し；及び(c)(i)における結合性が(ii)における結合性より低い任意の被験薬剤をNK p 30 Lに結合する薬剤として選択することを含む。

10

20

30

40

50

【0039】

他の側面では、本発明は、NKp30Lに結合する薬剤を同定する方法を提供するものであり、該方法は、(a)複数の被験薬剤を提供し；(b)各被験薬剤の存在下における、NKp30Lを発現する細胞株への、NKp30の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含有する可溶性NKp30-Fc融合又はハイブリッドタンパク質の結合性を評価し；及び(c)結合性が、任意の被験薬剤の不在下における場合よりも被験薬剤の存在下の方が低い任意の被験薬剤をNKp30Lに結合する薬剤として選択することを含む。

【0040】

他の側面では、本発明は、上述した請求項の何れかの方法に従って同定された抗体、抗体断片、又は薬剤を提供するものである。他の側面では、本発明は、抗体の断片又は誘導体を提供するものである。

10

【0041】

他の側面では、本発明は、NK細胞レセプターの膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含むリンカーを介して抗体Fcドメインに共有結合する、NKp30、NKp44、及びNKp46から選択されるNK細胞レセプターの可溶性断片を含む融合又はハイブリッドタンパク質を提供する。一実施態様では、NK細胞レセプターはNKp30であり、融合又はハイブリッドタンパク質は、配列番号1の少なくともアミノ酸残基139-140を含む。この実施態様の一つの側面では、融合タンパク質は、配列番号1の少なくともアミノ酸残基20-138を含む。この実施態様の他の側面では、NKp30-Fc融合タンパク質は、配列番号4及び5の何れかを含む。この実施態様の他の側面では、NKp30-Fc融合タンパク質は、配列番号4及び5の何れかからなる。他の実施態様では、NK細胞レセプターはNKp44であり、融合又はハイブリッドタンパク質は、配列番号2の少なくともアミノ酸残基193-203を含む。他の実施態様では、NK細胞レセプターはNKp46であり、融合又はハイブリッドタンパク質は、配列番号3の少なくともアミノ酸残基256-266を含む。

20

【0042】

また本発明は、このようにして同定された抗体、融合タンパク質、又はこのような融合タンパク質を調製するのに使用される可溶性断片をコードする核酸、並びにこのような核酸を含む発現ベクター、このようなベクターで形質転換された宿主細胞、及び抗体、融合タンパク質、又は可溶性断片の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによる、このような抗体、融合タンパク質、又は可溶性断片の製造方法を提供する。

30

【0043】

他の側面では、本発明は、NK細胞により媒介される細胞の死滅を阻害する方法を提供するものであり、該方法は、上述した方法により同定された抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は薬剤、もしくは上述した融合又はハイブリッドタンパク質を、NKp30L、NKp44L又はNKp46Lを発現する細胞と接触させることを含み、ここで抗体、抗体断片、抗体誘導体、薬剤、もしくは誘導又はハイブリッドタンパク質は、NKp30L、NKp44L又はNKp46Lに結合している。

【0044】

他の側面では、本発明は、上述した方法により同定された抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は薬剤、もしくは上述した融合又はハイブリッドタンパク質の、癌又はウイルス性疾患を治療する医薬を調製するための使用を提供するものであり、ここで抗体、抗体断片、抗体誘導体、薬剤、もしくは融合又はハイブリッドタンパク質は、細胞傷害性部分にコンジュゲートしているか、又はADCC又はCDCを活性化させる。

40

【0045】

他の側面では、本発明は、上述した方法により同定された抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は薬剤、もしくは上述した融合又はハイブリッドタンパク質の、自己免疫疾患を治療する医薬を調製するための使用を提供するものである。

【0046】

他の側面では、本発明は、癌又はウイルス性疾患を治療するための方法を提供するもの

50

であり、該方法は、上述した方法により同定された抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は薬剤、もしくは上述した融合又はハイブリッドタンパク質を、被験者に投与することを含み、ここで抗体、抗体断片、抗体誘導体、薬剤、もしくは融合又はハイブリッドタンパク質は、細胞傷害性部分にコンジュゲートしているか、又はA D C C又はC D Cを活性化させる。細胞傷害性部分は、例えば毒素又は放射性化合物でありうる。

【0047】

他の側面では、本発明は、自己免疫疾患を治療するための方法を提供するものであり、該方法は、上述した方法により同定された抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は薬剤、もしくは上述した融合又はハイブリッドタンパク質を、被験者に投与することを含む。

【0048】

次のアミノ酸配列は、添付の配列表に記載されているものである：

配列番号1：NK p 30のアミノ酸配列(N C B I受入番号NP 6 6 7 3 4 1)。

配列番号2：NK p 44のアミノ酸配列。

配列番号3：NK p 46のアミノ酸配列。

配列番号4：ヒトIg G 1 F cと、可動性膜貫通リンカーを用いて作製されたs o l N K p 3 0 - F T L - h F cのアミノ酸配列。

配列番号5：マウスIg G 1 F cと、可動性膜貫通リンカーを用いて作製されたs o l N K p 3 0 - F T L - m F cのアミノ酸配列。

配列番号6：配列番号1 - 3の配列と比較して、N末端に余分なロイシンを有し、マウスIg G 1 F cを有するs o l N K p 3 0 (1 L) - F T L - m F cのアミノ酸配列。

配列番号7：可動性膜貫通リンカーを有さず、代わりに短いリンカー(I E G R W M Q)を用いて作製された、マウスIg G 1 F cを有するs o l N K p 3 0 - m F cのアミノ酸配列。

配列番号8：可動性膜貫通リンカーを有さず、N末端に余分なロイシンを有して作製された、マウスIg G 1 F cを有する、s o l N K p 3 0 (1 L) - m F cのアミノ酸配列。

配列番号8は、余分なロイシンを有していること以外は、配列番号7と同一である。

配列番号9：NK p 30部分とヒトIg G 1 F c部分との間に2アミノ酸長のリンカーとN末端A L Wを有して作製された、可溶性NK p 30 - h F cタンパク質のアミノ酸配列。

配列番号10：NK p 30部分とマウスIg G 1 F c部分との間に2アミノ酸長のリンカーとN末端A L Wを有して作製された、可溶性NK p 30 - m F cタンパク質のアミノ酸配列。

配列番号11：R & Dシステムズインク(Systems Inc)から入手可能な可溶性NK p 30 - F cタンパク質のNK p 30部分のアミノ酸配列(カタログ番号1849-NK)。

配列番号12：国際公開第2004053054号に記載の可溶性NK p 30 - F cタンパク質のアミノ酸配列。

配列番号13：NK p 80のアミノ酸配列。

配列番号14：C D 8 3のアミノ酸配列。

配列番号15：C D 6 9のアミノ酸配列。

【0049】

オーファンリガンド

本発明は、レセプターに対するこれまで未同定のリガンド、又は他のリガンド対のメンバーを同定するための新規な方法に関する。このようなレセプター又は他のリガンド対のメンバーは、ここでは「オーファンリガンド」と称され、リガンド対の他方のメンバーが未同定であることを示す。一側面では、任意のこのようなりガンド対の未知の標的リガンドは細胞結合性である。他の側面では、オーファンリガンドは、自然では可溶性の形態で存在している。他の側面では、オーファンリガンドはオーファン細胞結合レセプターである。他の側面では、オーファンリガンドはオーファンNK細胞レセプターである。他の側面では、オーファンリガンドは、またあるいは別に、例えば樹状細胞のような、免疫系の他の細胞に発現する。表1には、本発明に記載の方法での適用に適したオーファンリガ

10

20

30

40

50

ドの例が、完全長オーファンリガンドの mRNA 及び / 又はタンパク質配列の NCBI 受入番号と、オーファンリガンドを発現する細胞型(群)の例と共に列挙されている。

【 0 0 5 0 】

【表 1】

表1

オーファンリガンド	NCBI 受入番号(配列番号)	細胞
NKp30	NP_667341 (整列番号1)	NK 細胞
NKp44	NP_004819 (整列番号2)	NK 細胞
NKp46	NP_004820 (整列番号3)	NK 細胞
NKp80	CAC29425 (整列番号13)	NK 細胞
CD83	Z11697 (整列番号14)	樹状細胞
CD69	NP_001772 (整列番号15)	NK 細胞

10

【 0 0 5 1 】

20

可溶性オーファンリガンド

本発明で使用される可溶性オーファンリガンドは、典型的には、少なくともオーファンリガンドの細胞外部分の断片、又は少なくとも分泌されたオーファンリガンドの断片を含み、該断片はオーファンリガンドの標的リガンドを発現する細胞に特異的に結合することが示されている。しかしながら、以下に記載するように、可溶性オーファンリガンドは細胞結合オーファンリガンドの膜貫通領域からの一又は複数のアミノ酸を更に含有していてもよい。あるいは、可溶性のオーファンリガンドは、典型的には如何なる細胞膜にも結合していない可溶性の形態でインビボで存在しうる。

【 0 0 5 2 】

特定の細胞膜結合オーファンリガンドの可溶性断片は、科学文献から知ることができるし、あるいは T M H M M (ワールドワイドウェブ(www)アドレス cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 等の公に入手可能なコンピュータベースアルゴリズムを使用し、例えばタンパク質のアミノ酸配列を分析することから同定することもできるし、あるいは実施例に記載されているように、異なった断片のリガンド結合能力を試験することにより決定することもできる。また、NKp44、NKp46、NKp30、及びCD83の可溶性断片(及び/又はこのような可溶性断片を含むFc融合又はハイブリッドタンパク質)の例は、例えば国際公開第2005051973号、国際公開第2005000086号、国際公開第0208287号、国際公開第2004053054号、米国特許第2003219436号、及びKunzendorfら(J Clin Invest 1996; 97: 1204-10)に記載されており、その全てが、出典明示によりその全体についてここに援用される。またオーファンリガンドは、既に溶解した状態で天然に存在している場合もある。このような可溶性リガンドには、サイトカイン等の分泌タンパク質が含まれる。

30

40

【 0 0 5 3 】

オーファンリガンドの可溶性断片は、例えば、プロテアーゼ又は他の化学的方法(Allen, Sequencing of proteins and peptides, 1989, Elsevier Science Publishers B.V.)による精製タンパク質のコントロールされた分解、可溶性型をコードするDNAの組換え発現、又は化学合成のような、アミノ酸配列をつくり出す任意の既知の方法により作製することができる。組換え発現は、選択された可溶性断片をコードするDNA配列を含むベクターを用いて、宿主細胞(例えば細菌細胞、特に大腸菌、又は哺乳動物細胞、例えばCHO細胞)を形質転換することにより達成することができる。ここに記載される組換え発現

50

又は他の分子生物学的応用において使用される一般的技術は、当該分野で既知である(例えば、Sambrookら, loc. cit., Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates及びWiley Interscience, N.Y.(1989)を参照)。化学合成は、所望のペプチドを作製するため、液相中において正しい順で、アミノ酸残基又はペプチド断片を互いにカップリングさせることにより、一般的に実施される。他の一般的な方策は、配列の最後のアミノ酸のC末端がカップリングされた固相(樹脂)を用いて出発して、アミノ酸を互いにカップリングさせるものであり、最後から2番目のアミノ酸のC末端が、最後のアミノ酸のN末端にカップリングされると、最終的に、構築されたペプチドが固相から放出される(いわゆる固相技術)。

【0054】

他の側面では、可溶性オーファンリガンド又はオーファンレセプターは、二価のリンカー分子を使用し、2つの可溶性断片モノマーのC末端又はN末端を共有的にカップリングさせることにより産生される二量体の形態であってもよい。適切なカップリング剤又は架橋剤には、適切なスペーサーにより離間した2つの異なる反応基を有するヘテロ二官能性(例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)、又はホモ二官能性(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)のものが含まれる。このようなリンカーは、Pierce Chemical Co., Rockford, Illから入手可能である。また可溶性オーファンリガンドは、まず、可溶性レセプターモノマーをビオチン化し、続いてストレプトアビジンと共にこれらをインキュベートすることにより生成される四量体であってもよい。

【0055】

また、可溶性レセプターは、可溶性オーファンリガンド-IgG-Fc融合又はハイブリッドタンパク質、又はこのような可溶性オーファンリガンド-IgG-Fc融合又はハイブリッドタンパク質の二量体の形態であってもよい。レセプターの可溶性断片又は可溶性タンパク質、例えばサイトカインを使用する、Fc融合タンパク質の例は、当該分野に記載されている。後者の例は、IL-2-Fc融合タンパク質(Kunzendorfら, J Clin Invest 1996; 97:1204-10)である。

【0056】

しかしながら、このような可溶性レセプター-Fc融合及びハイブリッドタンパク質が、昔から当該分野で知られていたが、多くの場合、それらは、それらのリガンドに対する結合親和力がかなり低いことが示されており、結果として、それらのリガンドを発現する細胞への結合を検出することは困難である。ここに記載したように、結合親和性は、レセプターとIgG-Fc部分との間に短いポリペプチドを含ませることにより改善することができる。この短いポリペプチドは、オーファンリガンドの可溶性断片に可動性又は適切な立体構造が付与されるように選択される任意の適切なペプチドでありうる。一側面では、この短いポリペプチドは、NKp30等の、可溶性レセプターの膜貫通領域のN末端部分から誘導されている。これらの膜貫通リンカーは、ここでは可動性膜貫通リンカー(FTL)と命名される。他の可溶性レセプター、例えば限定するものではないが、NKp44、NKp46、及びCD83は、IgG-Fc融合タンパク質として発現することもできるし、FTL配列が挿入されてIgG-Fcハイブリッドタンパク質として調製されることも可能であり、結果として、レセプターのリガンドを発現する細胞への結合がさかになる。一側面では、FTLは、膜貫通領域からの1~15の連続したアミノ酸を含むか又はこれらからなる。他の側面では、FTLは、膜貫通領域からの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、又はそれ以上の連続したアミノ酸を含むか又はこれらからなる。他の側面では、FTLは、膜貫通領域からの1~10のアミノ酸を含むか又はこれらからなる。他の側面では、FTLは、膜貫通領域からの5~10のアミノ酸を含むか又はこれらからなる。他の側面では、オーファンレセプターの細胞外断片における殆どのC末端アミノ酸は、レセプターの膜貫通部分の殆どのN末端アミノ酸に直接隣接している。

【0057】

例えば、NKp30の場合、FTLは、配列番号1の残基139-149を含むか又は

10

20

30

40

50

これらからなり、細胞外領域の殆どのC末端アミノ酸は、配列番号1の残基138である。別の実施態様では、FTLは、残基139-148；139-147；139-146；139-145；139-144；139-143；139-142；及び/又は139-141を含むか又はこれらからなることができる。また、細胞外領域の殆どのC末端アミノ酸は、配列番号1の残基139であり、FTLは配列番号1の残基140-149を含むか又はこれらからなることができる。別の実施態様では、FTLは、残基140-148；140-147；140-146；140-145；140-144；140-143；140-142；及び/又は140-141を含むか又はこれらからなることができる。

【0058】

付加的な又は別の側面では、NKp30-Fc融合又はハイブリッドタンパク質のオーファンリガンド部分の殆どのN末端アミノ酸は、配列番号1の残基20であり、トリプトファン残基(Trp、又はW)である。実施例3及び5に記載されているように、このようなNKp30-Fc融合タンパク質は、例えば配列番号1の残基19(ロイシン、Leu、又はL)を含むものよりも良好なりガンド結合能力を有する。

【0059】

一実施態様では、solNKp30-FTL-hFc又は-mFcと称されるここで記載の最適化NKp30-Fcタンパク質は、古典的なデザインのFc-融合タンパク質と比較して、上述の側面の双方において修飾されている。第1に、これらのコンストラクトは可動性膜貫通リンカー(FTL)を含んでいる。第2に、シグナル配列を除去した後の、成熟タンパク質の予想されるN末端は、N末端がWV(Trp-Val-)で始まるように、コンピュータアルゴリズムにより予測された部位の2残基下流である。よって、NKp30-Fc融合又はハイブリッドタンパク質の例では、NKp30-部分は、配列番号1の残基20-149、20-148、10-147、20-146、20-145、20-144、20-143、20-142、又は20-141を含むか又はこれらからなる。

【0060】

NKp44の場合、FTLは配列番号2の残基193(Val)~203(Ala)を含むか又はこれらからなるものでありうる。別の側面では、FTLは、残基193-202；193-201；193-200；193-199；193-198；193-197；193-196；及び193-195を含むか又はこれらからなる。

【0061】

NKp46の場合、FTLは配列番号3の残基256(Leu)~266(Leu)を含むか又はこれらからなるものであってよい。別の側面では、FTLは残基256-265；256-264；256-263；256-262；256-261；256-260；256-259；及び256-258を含むか又はこれらからなる。

【0062】

よって、本発明は、可溶性レセプター断片のIgG融合又はハイブリッドタンパク質を提供するものであり、該融合又はハイブリッドタンパク質は、細胞外領域と膜貫通領域の双方の部分を包含し、膜貫通領域の如何なる部分も含まない断片と比較して、改善された結合特性を有している可溶性レセプター断片を含む。これらは、実施例1-5に記載されているものと同様の方法で結合活性を試験することができる。また実施例1には、NKp30タンパク質の可溶性部分とヒト又はマウスFcドメインを含む特定の融合タンパク質が記載されている。

【0063】

一側面では、融合又はハイブリッドタンパク質は、オーファンリガンドとFc-部分との間に、付加的なアミノ酸残基を含む。オーファンリガンド-部分とFc-部分との間の可動性を増加させ、余分なスペースを提供する任意の適切なアミノ酸を使用することができるが、例示的なアミノ酸には、実施例1に記載のコンストラクトに使用される、比較的小さく、あまり帯電していないもの、例えばアラニン(A)、及びグリシン(G)が含まれる。リガンド-Fc融合タンパク質を作製し試験するための他の代表的な方法は、国際公開第

10

20

30

40

50

2005051973号、国際公開第2005000086号、国際公開第0208287号、国際公開第2004053054号、米国特許第2003219436号、及びKuzendorfら(J Clin Invest 1996; 97: 1204-10)に見出すことができる。

【0064】

可溶性レセプター-Fc融合又はハイブリッドタンパク質を作製するための種々の方法が、当該分野で利用されている。例えば、場合によってはFTLを含んでいるオーファンレセプターの可溶性部分は、例えば(1)化学的な架橋；(2)ペプチド等の部分を付加することによる、可溶性レセプターセグメント及び/又は免疫グロブリンポリペプチドセグメントへの親和会合、ついで付加部分を介したセグメントへの結合による、ハイブリッドタンパク質の形成；及び(3)可溶性レセプターセグメントと免疫グロブリンポリペプチドセグメントとの架橋による、融合タンパク質等の、ポリペプチドリンカーを介したポリペプチド単鎖の形成、によりFCポリペプチドに結合させることができる。

10

【0065】

第1の結合カテゴリーにおいて、2つのポリペプチド鎖を化学的にカップリング(架橋)させるために、様々な一般的方法の任意のものを使用することができる。共有結合は、存在する側鎖を直接縮合(例えば、システイン残基の間にジスルフィド結合を形成)させることにより、又は外部の架橋分子を導入することにより達成可能である。多くの二価又は多価の薬剤が、ポリペプチドのカップリングに有用である。

【0066】

一般的に、使用される架橋剤は、イプシロン-アミノ基又はチオール基と反応する二官能性剤である。これらの架橋剤は、2つのカテゴリー：ホモ-及びヘテロ-二官能性剤に分類することができる。ホモ二官能性剤は、例えば遊離のチオール(ジスルフィド結合の還元時に生成)と反応可能で、例えば5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DNBTB)、及びo-フェニレンジマレイミド(O-PDM)を含み、これはこのような遊離のチオールを有する2つのポリペプチドの間にチオエーテル結合を形成可能である。ヘテロ二官能性試薬は、第2のポリペプチドと反応可能なポリペプチド上に反応基を導入することができる。例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)は、遊離のチオール基を導入するために、第1級アミノ基と反応させることができる。他の化学的架橋剤には、例えばカルボジイミド類、ジイソシアネート類、ジアゾベンゼン類、ヘキサメチレンジアミン類、ジマレイミド、グルタルアルデヒド、4-スクシンイミジル-オキソカルボニル-a-メチル a (2-ピリジルチオ)トルエン(SMPT)及びN-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)が含まれる。このような薬剤とポリペプチドを架橋させるための手順は、当該分野でよく知られている。例えば、Pierce Immuno Technology Catalog & Handbook(1991)E8-E39; Karpovskyら, J. Exp. Med. 1984; 160: 1686以下; Liuら. Proc. Natl. Acad. Sci. 1985; 82: 8648以下; 及び米国特許第4676980号を参照。

20

30

【0067】

架橋剤の2つの反応基の間のスペーサーアームは、種々の長さ及び化学的組成を有してよい。より長いスペーサーにより、コンジュゲートされたポリペプチドのより良好な可動性が可能になり、また架橋中の特定の成分(例えばベンゼン基)により、種々の態様の作用に対する化学的結合の耐性を増加させ、又は反応基に対する安定性が増す(例えば、還元試薬に対するジスルフィド結合の耐性)。ペプチドスペーサー、例えばFTL、又はペプチドリンカー、又は以下に記載されるリンカーペプチドの使用も考えられる。

40

【0068】

第2のカテゴリーの結合法では、従来からの方法が、可溶性レセプター部分及び/又はFcポリペプチドに任意の種々の部分(例えばペプチド)を付加するために使用することができ、よって、付加された部分を介して結合可能な、ハイブリッド又は融合タンパク質が作製される。

【0069】

一実施態様では、ビオチン及びアビジン(ストレプトアビジン)等の部分は、可溶性レセ

50

プター部分及び/又は免疫グロブリンポリペプチドに結合しているか、又は複合体化しており、これらの部分は相互作用をして2つのサブユニットを結合させる。

【0070】

他の実施態様では、付加された部分は双方ともペプチドであり、ここでは「二量体化促進ペプチド」と称することができる。使用可能な多種多様なこのようなペプチドリンカーとしては、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)融合タンパク質、又はその二量体化モチーフ；PDZ二量体化ドメイン；FK-506BP(結合タンパク質)又はその二量体化モチーフ；p53の天然又は人工のヘリックス-ターン-ヘリックス二量体化ドメイン；及びプロテインA又はその二量体化ドメイン、ドメインBを挙げるができる。一実施態様では、追加されるペプチドはロイシンジッパーの成分である。ロイシンジッパー部分は、多くの場合、ヒト転写因子c-jun及びc-fosから取られる。

10

【0071】

二量体化促進ペプチドは、2つのサブユニットが、例えば立体傷害により、それぞれ他方の活性に干渉することを防止するため、また適切なタンパク質折り畳みが可能になるように、十分な度合いの可動性を提供すべきである。よって、その長さ、アミノ酸組成、及び/又は立体構造を変えることにより、例えばさらなる他の「二次リンカー部分」又は「ヒンジ部分」を付加することにより、二量体化促進ペプチドを修飾することが望ましい場合がある。多くの種類の二次リンカー部分には、例えば小さく、好ましくは中性、更に極性又は無極性のアミノ酸、例えばグリシン、セリン、スレオニン又はアラニンで、種々の長さ及び組合せのもの；ポリリジン等が含まれる。また複数のリンカー及び/又は二次リンカー部分を使用することができる。可動性ヒンジ領域、例えばヒトIgGのヒンジ領域、もしくは所定の間隔を開けてセリン又はスレオニンが挿入されたポリグリシン反復を使用することがしばしば望ましい。

20

【0072】

二量体化促進ペプチドの長さ及び組成は、可溶性レセプターの所望の特性、例えばリガンドに対するその結合能力が最適化されるように、当業者により容易に選択可能である。

【0073】

例えば、上述した化学的カップリング(必要であれば、適切なアミノ酸基の二量体化後)；ビオチン/アビジン相互作用を介した付着；当該分野で認められている方法による共有結合(例えば、適切な酵素の使用)；組換え方法；又はそれらの組合せ等、当業者にとって明白な様々な方法で、ペプチドを、可溶性レセプター部分と免疫グロブリンポリペプチドに付加することができる。

30

【0074】

第3の結合カテゴリーでは、可溶性レセプター部分及び/又は免疫グロブリンポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して共有結合している。このカテゴリーでは、フレームを合わせて2つのセグメントのそれぞれの可溶性部分を結合させ、単鎖ポリペプチド分子を形成させるために、組換え技術が使用される。好ましくは、レセプター部分は、任意の長さ又はアミノ酸組成、最も好ましくは可動性ループ構造のリンカーペプチドにより互いに離間せしめられており、2つのレセプター分子は、互いに適切な距離で、最適な相互作用にとって適切なアラインメントで位置することができる。典型的なリンカーペプチドには、小さく、好ましくは中性、更に極性又は無極性のアミノ酸、例えばグリシン、セリン、スレオニン又はアラニンで、種々の長さ及び組合せのもの；ポリリジン等が含まれる。ペプチドリンカーは少なくとも一のアミノ酸を有することができ、500又はそれ以上のアミノ酸を有していてもよい。好ましくは、リンカーは約100未満のアミノ酸、より好ましくは約2~30、最も好ましくは約3~10のアミノ酸である。可動性リンカードメイン、例えばヒトIgGのヒンジ領域、又は所定の間隔を開けてセリン又はスレオニンが挿入されたポリグリシン反復が、単独で、又は他の部分との組合せとして使用可能である。

40

【0075】

可溶性レセプター-Fc融合タンパク質を産生するために使用可能な組換え方法は一般的なものである。更に、ここに記載されたアッセイは、場合によってはFTLを含むオー

50

ファンレセプターの最適な断片がコンストラクトに使用されるように、リンカーペプチドを選択し、パラメーターを最適化するために使用することができる。

【0076】

当該分野で既知の可溶性レセプターのここで記載された又は別の構成は、標準的な方法に従って調製することができ、ITACS-スクリーン又は治療剤としての使用に適したものである。

【0077】

可溶性レセプターはITACS-スクリーンに使用され得、そこで、それらの結合性は、可溶性オーファンリガンドに結合する二次蛍光色素-コンジュゲート二次Abを使用し、明らかにされる。あるいは、蛍光色素(例えばAPC)は、可溶性オーファンリガンド自体に直接結合して、二次抗体の必要性をなくする可能性もある。例えば、可溶性オーファンリガンドは、一又は複数の蛍光の検出を容易にする薬剤(すなわち、検出剤、タグ、又は標識部分)、例えばフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、塩化5-ジメチルアミン-1-ナフトレンスルホニル、ランタニドリン光体等にコンジュゲートするか、あるいは他の安定結合が可能である。適切な蛍光標識の付加的な例には、¹²⁵I Eu 標識、イソチオシアネート標識、フィコエリトリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識、o-フタルデヒド(phthaldehyde)標識、フルオレスカミン(fluorescamine)標識等が含まれる。化学発光標識の例には、ルミナル(luminal)標識、イソルミナル標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、シュウ酸エステル標識、ルシフェリン標識、ルシフェラーゼ標識、エクオリン標識等が含まれる。

10

20

【0078】

また可溶性オーファンリガンドは、検出に有用な酵素又は酵素基質、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等で標識することができる。またオーファンリガンドは、ビオチン化されていてもよく、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接的測定を介して検出することもできる。他の標識技術には、二次レセプターにより認識される予め決められたポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ等)を用いた標識が含まれる。酵素コンジュゲート候補の更なる例には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼが含まれる。

30

【0079】

細胞株の同定

オーファンリガンドの標的リガンドを発現する細胞株は、例えば、上述したようにして調製される、前記オーファンリガンドの可溶性型で染色された細胞の、例えばフローサイトメトリー分析により同定することができる。例えば各種細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)等の寄託機関から得ることができ、細胞株は、可溶性オーファンリガンドに対する結合能力でスクリーニングされる。このような方法において、腫瘍細胞は、氷上、暗所で、例えば30分、2%のFCSを含む組織培養培地において、固定量の蛍光標識された可溶性オーファンリガンドと共にインキュベートすることができる。洗浄後、可溶性オーファンリガンドの結合性を、フローサイトメトリーで分析する。あるいは、腫瘍細胞は、ヒト又はマウスFc-ドメインを含む蛍光標識されていない可溶性オーファンリガンド-Fc融合タンパク質と共にインキュベートされ、その後、フローサイトメトリー分析の前に、融合タンパク質のFc-部分を標的にする蛍光標識二次抗体と共にインキュベートされる。双方のアッセイにおいて、細胞に対する可溶性オーファンリガンドの結合性は、二次抗体単独か、又は非結合蛍光標識Fc-融合タンパク質の何れかとの結合性と比較して、個々の細胞に結合した平均-蛍光を分析することにより

40

50

測定することができる。特異性を確認するために、同様のアッセイを、オーファンリガンドの結合を阻害することが知られているオーファンリガンドに対して、過剰モルの抗体とプレインキュベートした可溶性オーファンリガンドを用いて実施することができる。可溶性オーファンリガンドに結合可能であるが、その結合がオーファンリガンドの抗体と競合することができる細胞株を、標的リガンドを発現する細胞株として選択する。

【0080】

別の例示的アッセイでは、可溶性レセプター-Fc融合タンパク質(例えば、NKp30-hFc)は、細胞表面に発現されるリガンド(例えばNKp30L)に対する腫瘍細胞株をスクリーニングするためにフローサイトメトリー(例えばFACS)で使用される。このため、固定量の腫瘍細胞(例えばK562等)を、蛍光部分(例えばFITC、PE、APC等)にコンジュゲートした種々の濃度の可溶性レセプター-Fc融合タンパク質と共に、氷上でインキュベートする。インキュベート後、未結合の可溶性レセプター-Fc融合タンパク質を、PBSで細胞を洗浄することにより除去し、腫瘍細胞への、可溶性レセプター-Fc融合タンパク質の結合を、フローサイトメトリー(FACS)により分析する。

10

【0081】

別の標識及び検出技術(例えば、放射性同位体、アビジン-ビオチン系、又は酵素検出法)に基づく類似した技術を、類似の原理に従い、使用することができる。

【0082】

スクリーニングのための薬剤の調製

オーファンリガンドへの標的リガンドの結合をスクリーニングするための薬剤収集物には、限定されるものではないが、ハイブリドーマ収集物により発現される抗体、ファージディスプレイライブラリー又は類似のもの、及びコンビナトリアルライブラリーが含まれる。これらの薬剤収集物の幾つかを以下に記載する。

20

【0083】

適切な細胞株又は細胞株(類)がひとたび同定されると、これらを、細胞株に対する抗体を産生させるために使用することができ、それらの中には、未同定のリガンドに対する抗体がある。様々な抗体生産及び精製技術が当該分野において既知であり、例えばHarlow及びLane: ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, 以下参照; Harlow及びLane: USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1999)); 米国特許第4376110号; 及びAusubelら編, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Green e Publishing Assoc.及びWiley Interscience, N.Y., (1987, 1992)に記載されているものが含まれる。例えば、モノクローナル抗体は、Kohlerら, Nature, 256:495(1975)に記載されているハイブリドーマ法により、又は他のよく知られているその後に関与された方法(例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press, 1986))により生成することができる。このような方法においては、動物を細胞株から選択された細胞、又は細胞株から選択された細胞からの膜調製物(すなわち、標準的な方法に従い調製された溶解細胞)で免疫し、動物の脾臓からB細胞を単離し、ハイブリドーマが調製される。ハイブリドーマは、任意の適切な種類のエロマイ、ヘテロミエロマイ(heteromyeloma)、又はリンパ芽球様(phoblastoid)細胞を用い、化学的融合、電気的融合、又は任意の他の適切な技術により調製することができる。マウスモノクローナル抗体は、マウスを免疫することにより得ることができる。またモノクローナル抗体は、他の免疫された非ヒト哺乳動物、例えばラット、イヌ、霊長類等の抗体発現細胞、形質細胞腫、又は他のその等価なもの、及び任意の適切な種類の抗体発現細胞から誘導されたハイブリドーマから得ることもできる。

30

40

【0084】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座位及び天然免疫グロブリン遺伝子欠失を含むヒト化トランスジェニック動物(例えば、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ等)、例えばXenoMouse^{T M}(Abgenix-Fremont, CA, USA)(例えばGreenら. Nature Genetics 7:13-21(1994); Mendezら Nature Genetics 15:146-156(1997); Green及びJakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998); 欧州特許第0463151B1号; 国際公開第94/0

50

2602号、国際公開第96/34096号；国際公開第98/24893号、国際公開第99/45031号、国際公開第99/53049号、及び国際公開第00/037504号；及び米国特許第5916771号、同第5939598号、同第5985615号、同第5998209号、同第5994619号、同第6075181号、同第6091001号、同第6114598号及び同第6130364号を参照)、又は最小座位(minilocus)のヒトIg-コード化遺伝子を含むトランスジェニック脊椎動物において、産生可能である。これらのトランスジェニックマウス又は他の脊椎動物からの脾臓細胞は、よく知られている技術に従い、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生成するのに使用することができる。

【0085】

免疫された動物からの抗体の調製には、免疫された動物からB細胞、脾臓細胞又はリンパ球を得、これらの細胞を使用して抗体を発現するハイブリドーマを生成し、また免疫した動物の血清から直接抗体を得ることが含まれる。例えば非ヒト動物からの脾臓細胞の単離は、当該分野でよく知られており、例えば麻酔された非ヒト動物から脾臓を取り出し、小片に切断し、単個細胞浮遊液を作製するために、適切なバッファーにおいて、細胞ストレーナーのナイロンメッシュを通して、脾臓から脾臓細胞を搾り取ることを含む。細胞を洗浄し、遠心分離にかけ、任意の赤血球を溶解させるバッファーに再懸濁させる。再度、溶液を遠心分離し、ペレット中に残ったリンパ球を新たなバッファーに最後に再懸濁させる。

【0086】

ひとたび単離し、単細胞懸濁液に存在させると、抗体産生細胞を不死化細胞株に融合させる。これは、典型的にはマウスミエローマ細胞株であるが、ハイブリドーマの作製に有用な多くの他の不死化細胞株が当該分野で知られている。好ましいマウスミエローマ細胞株には、限定されるものではないが、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U.S.A.から入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、X63Ag8653、及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, Rockville, Md. U.S.A.から入手可能なSP-2細胞から誘導されたものが含まれる。融合はポリエチレングリコール等を使用して達成される。ついで、得られたハイブリドーマを、融合していない親ミエローマ細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含む選択培地において増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠失しているならば、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有しており(HAT培地)、ここでの物質はHGPRT欠損細胞の増殖を防止するものである。

【0087】

ハイブリドーマは、マクロファージの支持細胞層において増殖させうる。マクロファージは、好ましくは脾臓細胞の単離に使用された非ヒト動物の同腹子からのもので、典型的には、ハイブリドーマを蒔く前の数日間、不完全フロイントアジュバントで予備刺激される。融合方法は、例えば(Goding, 「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」, pp.59-103(Academic Press, 1986))に記載されており、その開示は、出典明示によりここに援用される。

【0088】

細胞を、コロニー形成及び抗体産生に十分な時間、選択培地にて増殖させる。通常は7~14日である。ついで、ハイブリドーマを、DMEM又はRPMI-1640等の適切な培地中において、多量に増殖させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで増殖させることもできる。

【0089】

所望のモノクローナル抗体を産生させるために十分に増殖させた後、モノクローナル抗体を含む増殖培地(又は腹水)を細胞から分離させる。ついで培地を、以下の記載のITACS手順に直接使用するか、又は既知の方法に従い精製されうる。精製は、典型的には、ゲル電気泳動、透析、プロテインA又はプロテインG-セファロース、又はアガロース又

10

20

30

40

50

はセファロースビーズ等の固体支持体に結合した抗マウスIgを使用するクロマトグラフィー(全ては、例えばAntibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publication No.18-1037-46, Edition AC,に記載されており、その開示は、出典明示によりここに援用される)により達成可能である。結合した抗体を、典型的には、抗体含有フラクションの即時中和を伴い、低pHのバッファー(pH3.0又はそれ未満のグリシン又はアセタートバッファー)を使用することにより、プロテインA/プロテインGカラムから溶出させる。これらのフラクションをプールしておき、必要に応じて、透析し、濃縮する。

【0090】

典型的な方法では、マウスを、上述したように同定された未知の細胞表面リガンドを発現する細胞株からその膜調製物又は細胞で免疫する。マウスを、例えば10万~1千万細胞、 2×10^6 細胞、1-100 μ gの膜抽出物、又は20 μ gの膜抽出物を用いて、腹腔内的に免疫し、典型的には、所定の間隔(例えば隔週、1週間等)をおいて繰り返す。膜抽出物を用いた免疫は、フロイント完全アジュバントを用いて実施することができるが、細胞を用いた免疫化は、PBS単独で注射され得る。マウスは、全体で1ないし5回又は3回の免疫が可能で、最後の免疫の約10日後に眼内出血を起こし、細胞に対して反応する抗体について、血清を分析する。ついで、モノクローナル抗体を産生させるために選択されたマウスを、PBSに10 μ gの膜抽出物が入ったものでインビボで追加免疫してよいが、細胞で免疫されたマウスは、mAb産生の前に、通常は追加免疫しない。追加免疫3日後、脾臓を摘出し、ハイブリドーマ作製に使用する。例えば脾臓細胞は、PEG又は電気融合技術により、FOX-NYミエローマ細胞に融合させてもよい。産生されたハイブリドーマ細胞を24、48又は96ウェル組織培養プレートに播種し、抗体を含む細胞培養培地又はハイブリドーマを、以下に記載するITACSに従いアッセイする。選択されたクローンを、安定したハイブリドーマを確立するためのサブクローニング及びスクリーニングの更なるラウンドにかけてもよい。

【0091】

また、形質転換された不死化B細胞(ヒトB細胞を含む)は、ヒト抗体を含む抗体を産生するのにも使用することができる。このような細胞は、標準的な技術、例えばエプスタイン・バー・ウイルス、又はトランスフォーミング遺伝子を用いた形質転換により生成可能である(例えば、「Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity」,Zurawaki, V. Rら, MONOCLONAL ANTIBODIES, Kenneth R. Hら, Plenum Press, N.Y. 1980, pp19-33(テキスト全体を援用)を参照)。

【0092】

また、ITACSスクリーニングに有用なヒト抗体又は他の種由来の抗体は、限定するものではないが、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、及び他の関連技術を含むディスプレイ型技術を通じ、当該分野でよく知られている方法を使用して生成することもでき、得られた分子は更なる成熟化方法、例えば親和成熟にかけることができ、このような技術もよく知られている(例えば(Hoogenboomら, J. Mol. Biol. 227: 381(1991)(ファージディスプレイ); Vaughanら, Nature Biotech 14: 309(1996)(ファージディスプレイ); Hanes及びPlucthau PNAS USA 94:4937-4942(1997)(リボソームディスプレイ), Parmley及びSmith Gene 73:305-318(1988)(ファージディスプレイ), Scott TIBS 17:241-245(1992), Cwirlaら. PNAS USA 87:6378-6382(1990), Russeら. Nucl. Acids Research 21:1081-1085(1993), Hoogenboomら. Immunol. Reviews 130:43-68(1992), Chiswell及びMcCafferty TIBTECH 10:80-84(1992), 及び米国特許第5733743号を参照)。ディスプレイ技術がヒトではない抗体の製造に利用されれば、このような抗体は、例えばよく知られている方法に従い、ヒト化することができる。

【0093】

またITACSスクリーニングに有用な抗体及び抗体断片の収集は、組換え抗体コンビナトリアルライブラリー、例えばヒトリンパ球から誘導されたmRNAから調製される、ヒトVL及びVHcDNAを用いて作製可能な、scFvファージディスプレイライブラリーから回収することもできる。このようなライブラリーを調製しスクリーニングするた

10

20

30

40

50

めの方法は、当該分野で知られている。ファージディスプレイライブラリーを作製するための商業的に入手可能なキットは多数存在する。また、抗体ディスプレイライブラリーを作製するのに使用可能な他の方法及び試薬も存在する(例えば、米国特許第5223409号: PCT出願国際公開第92/18619号、国際公開第91/17271号、国際公開第92/20791号、国際公開第92/15679号、国際公開第93/01288号、国際公開第92/01047号、及び国際公開第92/09690号; Fuchsら(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hayら(1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huseら(1989) *Science* 246:1275-1281; McCaffertyら, *Nature* (1990) 348:552-554; 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) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garradら(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboomら(1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; 及びBarbasら(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982を参照)。抗体ライブラリー及びこれらの作製及び使用方法は、例えば国際公開第92/01047号、McCaffertyら, *Nature* (1990) 348:552-554; 米国特許第5969108号; 同第5872215号; 同第5871907号; 同第5858657号; 及びGriffithsら, (1993) *EMBO J* 12:725-734に記載されている。

【0094】

抗体以外の他の薬剤もまた、ITACSに類似したアプローチを使用し、オーファンリガンドのリガンドに結合する能力についてスクリーニング可能であり、ここでは、オーファンリガンドの可溶性形態の融合プロテインとの競合が使用される。このような薬剤は、例えばコンビナトリアル化学ライブラリーに見出すことができる。コンビナトリアル化学ライブラリーは、化学合成又は生物学的合成により、試薬等、多数の化学的「構成要素」を組合せることにより生じる多様な化学的化合物を集めたものである。例えば、線形のコンビナトリアル化学ライブラリー、例えばポリペプチドライブラリーは、与えられた化合物長(すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数)について、全ての可能な方法で、化学的構築ブロック(アミノ酸)のセットを組合せることにより形成される。化学的構築ブロックのこのようなコンビナトリアル混合を介して、数百万の化学的化合物を合成することができる。

【0095】

コンビナトリアル化学ライブラリーの調製及びスクリーニングは、当業者によく知られている。このようなコンビナトリアル化学ライブラリーには、限定されるものではないが、ペプチドライブラリー(例えば米国特許第5010175号、Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493(1991)及びHoughtonら, *Nature* 354:84-88(1991)を参照)が含まれる。多様な化学ライブラリーを作製するための他の化学を使用することもできる。このような化学には、限定されるものではないが、ペプチド(例えば、PCT出願国際公開第91/19735号)、コード化ペプチド(例えば、PCT出願国際公開第93/20242号)、ランダムバイオ-オリゴマー(例えば、PCT出願国際公開第92/00091号)、ベンゾジアゼピン(例えば、米国特許第5288514号)、diversomers、例えばヒダントイン、ベンゾジアゼピン類及びジペプチド類(Hobbsら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913(1993))、ビニル性ポリペプチド類(Hagiharaら, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568(1992))、グルコース骨格を有する非ペプチド状ペプチド模倣剤(Hirschmannら, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218(1992))、小分子化合物ライブラリーの類似有機合成(Chenら, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661(1994))、オリゴカルバマー類(Choら, *Science* 261:1303(1993))、及び/又はペプチジルホスホナート(Campbellら, *J. Org. Chem.* 59:658(1994))、核酸ライブラリー(Ausubel, Berger及びSambrook, 全て上掲を参照)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5539083号を参照)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughnら, *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314(1996)及びPCT/U596/10287を参照)、糖質ライブラリー(例えば、Liangら, *Science*, 274:1520-1522(1996)及び米国特許第5593853号を参照)、有機小分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン類、Baum *C&EN*, January18, 33頁(1993); イソプレノイド類、米国特許

第 5 5 6 9 5 8 8 号 ; チアゾリジノン類及びメタチアザノン類、米国特許第 5 5 4 9 9 7 4 号 ; ピロリジン類、米国特許第 5 5 2 5 7 3 5 号及び同第 5 5 1 9 1 3 4 号 ; モルホリノ化合物、例えば米国特許第 5 5 0 6 3 3 7 号 ; ベンゾジアゼピン類、米国特許第 5 2 8 8 5 1 4 号等)が含まれる。

【 0 0 9 6 】

コンビナトリアルライブラリーを調製するためのデバイスは、商業的に入手可能である(例えば、357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Massを参照)。更に、多くのコンビナトリアルライブラリーは、それ自体、商業的に入手可能である(例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, Mo., 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md.等を参照)。

10

【 0 0 9 7 】

I T A C S

I T A C S 手順は、例えば他のリガンドの標的リガンド、特にオーファンレセプターに結合する薬剤を同定するための簡便な方法である。該方法は、特にオーファンレセプターに対するリガンドを同定するのに有用であるが、同じ原理を、レセプターではない及び/又はオーファンではないリガンド対の他のメンバーにも適用することができる。

【 0 0 9 8 】

次のセクションは、I T A C S の異なった工程の幾つかの非限定的特徴を記載する。特定のリガンド-リガンド対に応じて、またスクリーニングされた薬剤収集物又はライブラリーに応じて、I T A C S 手順は、ケースバイケースで最適性能となるように修正することが可能であり、ここに記載の特定の例示的な方法工程には限定されないものと理解される。

20

【 0 0 9 9 】

例示的な I T A C S 手順を、図 1 にて概説する。同定された薬剤は、標的リガンドへの、オーファンリガンドの可溶性部分の結合を干渉し、低減し、及び/又はブロックする能力により同定され特徴付けられる。

【 0 1 0 0 】

上述したように、一側面では、スクリーニングされる薬剤収集物は、可溶性オーファンリガンド又はレセプターが結合する細胞株上の様々なエピトープに対する抗体を産生する、ハイブリドーマ、B細胞又は他の抗体産生細胞の収集物である(図 1 の工程 1 から 3)。続く I T A C S 工程(図 1 の工程 4)では、抗体産生細胞からの抗体を、オーファンリガンドがオーファンリガンドの可溶性部分の存在下において結合する細胞と共にインキュベートする。この工程では、細胞への結合について可溶性レセプターと競合する抗体が同定される。この文脈で、「競合する」とは、抗体の不在下での細胞への可溶性レセプターの結合と比較し、抗体の存在が、細胞への可溶性レセプターの結合を低減することを意味する。例えば、オーファンレセプターと競合すると同定された抗体は、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、又は少なくとも約 90%、可溶性レセプターの結合を低減させうる。特定の側面では、抗体は、少なくとも 25%のオーファンレセプターの結合を低減させる。可溶性レセプターは、ここで他に記載されたようにして結合を検出するように、標識されうる。あるいは、可溶性レセプターは I g G F c ドメインの融合又はハイブリッドタンパク質の形態であってもよく、これを、ついで、F c 部分に対する二次抗体を使用してタグ化した後、二次抗体を検出することもできる。

30

40

【 0 1 0 1 】

別の又は付加的な側面では、I T A C S 工程は、可溶性レセプターの不在下における細胞への抗体の結合と比較して、可溶性レセプターの存在により、細胞への抗体の結合が低減している抗体をスクリーニングすることを含みうる。可溶性レセプターと競合すると同

50

定された抗体は、この側面では、その細胞に対する結合性が、可溶性レセプターの存在下においては、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90%低減させる抗体であると同定されうる。他の側面では、抗体は、少なくとも25%、オーファンレセプターの結合を低減する。抗体は、ここで他に記載されたようにして、結合を検出するために適切に標識されるか、又は二次抗体を使用して検出されうる(例えば、ヒト抗体の収集物をスクリーニングするならば、それらの細胞-結合は、マウス-抗ヒト抗体を使用して検出することができる)。

【0102】

競合工程の様々な実験用設定を使用することができる。典型的には、競合工程は、抗体、可溶性レセプター、及び可溶性レセプターに結合する細胞の存在下、試験バイアル、例えばウェル中で実施される。オーファンリガンドが結合する細胞は、正常な細胞表面相互作用のメカニズム又は他の手段を介して、ウェル又はビーズの底部等、試験バイアルの固体表面に付着可能である。懸濁液又は細胞膜調製物中の細胞は、インキュベート後、未結合の標識結合剤から細胞を分離するための適切な方法に関連してまた使用することができる。様々な側面では、抗体は、抗体産生細胞、抗体産生細胞の培養上清、又は抗体の精製された調製物を、試験バイアルに添加することを介して調製することができる。次に、試薬を、適切な時間、適切な温度でインキュベートし、可溶性レセプター及び(適切であるならば)抗体を細胞に結合させる。ついで、細胞に結合した可溶性レセプター又は抗体の量を評価する前に、場合によっては一又は複数回、細胞を洗浄する。次に、細胞に結合した可溶性レセプター及び/又は抗体の量を、抗体/レセプターの不在下、細胞に結合した可溶性レセプター/抗体の量、又は他の適切なコントロール値と比較する。アッセイに応じて、可溶性レセプター又は抗体の非特異的に結合は、細胞に結合しない類似の化合物を使用することにより、又は可溶性レセプターに対する抗体により、標的リガンドへのその結合を防止することにより、補正する。

【0103】

例示的なアッセイでは、ハイブリドーマの上清を、これらの上清と共に細胞をプレインキュベートし、ついで、可溶性オーファン-リガンドを添加することにより、抗リガンド m A b s の存在性についてスクリーニングする。可溶性オーファンリガンドの結合を低減させるハイブリドーマ上清は「陽性クローン」と命名される。染色された細胞の分析は、例えば F A C S アッセイを使用するフローサイトメトリー又は F m a t (PE Biosystems, CA) により実施することができる。

【0104】

他の例示的なアッセイにおいて、NKp30Lを標的とする抗体は、抗体が s o l N K p 3 0 - h F c の NK p 3 0 L 発現腫瘍細胞株(例えば K 5 6 2)への結合を阻害する能力についてスクリーニングされる競合アッセイにおいては、フローサイトメトリー(例えば F A C S、F A C S アレイ)又は F m a t により同定される。このため、NKp30L発現腫瘍細胞(例えば K 5 6 2)で免疫されたマウスから誘導されたモノクローナル B 細胞誘導ハイブリドーマからの組織培養上清は、氷上で30~60分、固定量の NK p 3 0 L - 発現腫瘍細胞(例えば、104 K 5 6 2 又は H E K 2 9 3 細胞)と共にインキュベートされる。続いて、固定量の蛍光標識された s o l N K p 3 0 - h F c を、各インキュベート用混合物(例えば、0.1 μ g / m l の A P C - s o l N K p 3 0 - h F c)に添加し、ついで、氷上で、更に30-60分インキュベートする。インキュベート後、細胞を洗浄して、未結合のタンパク質を除去し、細胞への s o l N K p 3 0 - h F c の結合性を、フローサイトメトリー又は F m a t により分析する。双方のアッセイにおいて、細胞への s o l N K p 3 0 - h F c の結合性は、各細胞の平均蛍光を分析することにより測定される。該アッセイでは、抗体は、ハイブリドーマからの組織培養上清と共にプレインキュベートされていない腫瘍細胞への、s o l N K p 3 0 F c の結合と比較して、これらアッセイにおいて腫瘍細胞への s o l N K p 3 0 - h F c の結合を低減し又は防止した場合に、NKp30L結合抗体であると決定される。

10

20

30

40

50

【0105】

オーファンリガンドのリガンドに結合し、よってリガンド-リガンド相互作用抗体をブロックする抗体（又は、ファージディスプレイ及びコンビナトリアルライブラリーの場合は、抗体断片又は小分子）がひとたび同定されると、多量の抗体、抗体断片、又は小分子を、所望するならば、既知の技術に従い、産生し、精製し又は修飾することができる。例えば、抗体又は抗体断片をコードする核酸配列は、一般的な方法に従い、宿主細胞において、抗体又は断片の組換え生産を可能にするために回収される。抗体、抗体断片、又は小分子は、例えば癌又は自己免疫疾患等、リガンド-オーファンレセプターに関連した病状の治療における効能について試験することができる。

【0106】

上のセクションに記載されたように、F m a t装置は、コンビナトリアルライブラリーから薬剤又は抗体をスクリーニングするかどうかにかかわらず、I T A C Sスクリーニング競合工程に適している。F m a t、つまり蛍光微量アッセイ技術の略語は、洗浄工程がなく、マルチウェルプレートにおいて高スループットスクリーニングアッセイが実施されるように設計されたスキャナーを使用し、レセプター-リガンド相互作用の定量測定に使用することができる(Mellentin- Michelottiら, Anal Biochem. 1999;272:182-190)。I T A C Sでの使用に適合化され得る種々のF m a tアッセイフォーマットは、文献(例えば、Mellentin-Michelottiら, 上掲; Swartzmanら, Anal Biochem. 1999;271:143-151; Leeら, J Biomolecular Screening 2003;81-88)に記載されている。I T A C Sでの使用に適合した他の高スループットスクリーニング技術には、限定されるものではないが、B i a c o r e (例えば、細胞溶菌液又は細胞膜を使用)、細胞ベースのE L I S A (例えば、無傷の細胞又は細胞膜を使用)、及び当該分野で既知の様々な抗体マイクロアレイフォーマット(Glokler及びAngenendt, J Chromatograph B. 2003;797:229-240を参照、及びB i a c o r e技術(例えば、Zhukovら, J Biomol Techniques 2004;15:112-119を参照)が含まれる。更に、例えばF A C Sアレイ(Beckton Dickinson, CA)又は類似のものを用いる、フローサイトメトリーが、特に中-又は高-スループットフォーマットにおいて使用されうる。

【0107】

類似の競合アッセイを、ファージ-ディスプレイライブラリー及びコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。例えば、細胞又は組織切片を、E L I S Aプレートに固定し、ファージ-ディスプレイライブラリーのパニングに使用することができる。可溶性レセプター-F cタンパク質との競合を示すE L I S Aにおけるファージ結合は、オーファン-リガンドに対して特異的である。

【0108】

一又は複数の抗体が同定されると、抗体をコードする核酸は、ハイブリドーマ又は他の抗体産生細胞から回収することができ、抗体が、当該分野における一般的な方法に従い、組換え技術により産生される。

【0109】

抗体断片及び誘導体

同定された抗体又は抗体断片は、例えば別の抗体又は断片、抗体断片を産生するために、及び/又は他の化合物を用いて抗体又は抗体断片を誘導体化するために、修飾することができる。次のセクションでは、実施可能な様々な修飾を例証する。

【0110】

所望される場合、抗体産生細胞により得られた抗体のクラスは、既知の方法により「スイッチ」されうる。例えば、最初はI g M分子として生成された抗体は、I g G抗体にスイッチされたクラスであってもよい。また、クラススイッチ技術は、例えばI g G 1からI g G 2へ等、一つのI gサブクラスから他のものに転換させるために使用されてもよい。よって、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用途に対して、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g D、I g A、I g E、又はI g M抗体にアイソタイプをスイッチすることによって変化され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

例えば、オーファンリガンドのリガンドを発現する細胞の数を低減させることが所望される(例えば、リガンドが癌細胞上で過剰発現している)治療用途においては、抗体又は抗体誘導体は、抗体依存性細胞傷害性(A D C C)又は細胞依存性細胞傷害性(C D C)を活性化させるFc部分を有することが可能である。

【 0 1 1 2 】

キメラ抗体は、当該分野でよく知られている組換えプロセスにより産生されうる(例えば、Cabillyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277(1984); Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984); Boulianneら, Nature 312:643-646(1984); 欧州特許出願第125023号; Neubergerら, Nature 314:268-270(1985); 欧州特許出願第171496号; 欧州特許出願第173494号; 国際公開第86/01533号; 欧州特許出願第184187号; Sahaganら, J. Immunol. 137:1066-1074(1986); Robinsonら, 国際特許出願PCT/US86/02269号(1987年5月7日公開); Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443(1987); Sunら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218(1987); 及びBetterら, Science 240:1041-1043 (1988)を参照)。例えば、同定されたマウスモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体からの定常ドメインを有する抗体にキメラ化させることができる。

【 0 1 1 3 】

ヒト化モノクローナル抗体又はマウス抗体又は他の非ヒト種からの抗体を作製することもできる。「ヒト化」抗体は、ヒトにおける免疫反応を回避又は無効にするために、重鎖及び軽鎖のフレームワーク及び定常ドメインにおける所定のアミノ酸を突然変異させた、非ヒト種から誘導された抗体である。典型的なヒト化抗体の特徴及び産生に関する更なる詳細については、例えばJonesら, Nature 321:522-525(1986); Riechmannら, Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、非ヒト種の様々なドメインにヒト抗体からの定常ドメインを融合させることによりまた産生されうる。ヒト化抗体の作製に使用可能な方法の例は、例えば米国特許第6054297号、同第5886152号、及び同第5877293号に見出すことができる。ヒト化は、特にWinter及び共同研究者(例えば、Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536(1988))の方法に従って、齧歯動物の相補性決定領域(「CDR」)又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより、実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体では、ヒト可変ドメインのCDR部分が、非ヒト種の対応する配列に置換されている。いわゆる「ベストフィット法」によれば、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(このような方法及び関連する原理の記載については、例えばSimsら, J. Immunol., 151:2296(1993)、及びChothiaら, J. Mol. Biol., 196:901(1987)を参照)。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる(例えば、Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992)、及びPrestaら, J. Immunol., 151:2623(1993)を参照)。

【 0 1 1 4 】

マウス抗体又は他の種からの抗体は、任意の適切な技術を使用し、ヒト化又は霊長類化させることができ、多くの適切な技術が当該分野で既によく知られている(例えば、Winter及びHarris Immunol Today 14:43-46(1993)及びWrightら, (Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168(1992)を参照)。関心ある抗体は、組換えDNA技術により操作されてもよく、対応するヒト配列で、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、及び/又はフレームワークドメインが置換される(例えば、国際公開第92/02190号及び米国特許第5530101号、同第5585089号、同第5693761号、同第5693792号、同第5714350号、及び同第5777085号を参照)。また、キメラ免疫グロブ

10

20

30

40

50

リン遺伝子を構築するために、I g c D N Aを使用することは、当該分野で知られている(例えば、Liuら P.N.A.S. 84:3439(1987)、及びJ.Immunol. 139:3521(1987)を参照)。m R N Aはハイブリドーマ又は他の抗体を産生する細胞から単離することができ、c D N Aを生成するのに使用される。関心あるc D N Aは、特定のプライマーを使用し、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により増幅させてもよい(米国特許第4 6 8 3 1 9 5号及び同第4 6 8 3 2 0 2号)。あるいは、ライブラリーを作製し、関心ある配列をスクリーニングして単離することもできる。ついで、抗体の可変領域をコードする核酸配列を、ヒト定常領域配列に融合させてもよい。ヒト定常領域(並びに可変領域)の配列は、Kabatら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242に見出され、より近年の関連したデータは、ワールドワイドウェブ(www)アドレス.bioche
 m.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html.にアクセスすることができる。抗体を設計
 するためのアイソタイプの選択は、典型的には、所望するエフェクター機能、例えば補体
 固定により、又は抗体依存性細胞傷害性における活性により、案内されうる。例示的なアイ
 ソタイプは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4である。ヒト軽鎖定常領域、
 カッパ又はラムダの何れかが使用されうる。次に、このような核酸によりコードされる
 ヒト化抗体が、一般的な方法により発現され得る。

10

【0115】

このような抗体様分子及び完全サイズの抗体に加えて、同定された抗体の「断片」を作製することもできる。オーファンリガンドのリガンドに特異的に結合する能力を保持/示す抗体「断片」は、任意の既知の技術、例えば限定されるものではないが、酵素切断、ペ
 プチド合成、及び組換えタンパク質生産技術により、一般的に得ることができる。抗体断
 片の例には、(i) F a b断片、V L、V H、C L及びC H 1ドメインから本質的になる一
 価断片；(i i) F (a b) 2及びF (a b') 2断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により
 結合した2つのF a b断片を含む二価断片；(i i i) V H及びC H 1ドメインから本質的
 になるF d断片；(i v) 抗体の単一アームのV L及びV Hドメインから本質的になるF v
 断片、(v) V Hドメインから本質的になるd A b断片(Wardら、(1989) Nature 341: 544-
 546)；及び(v i)一又は複数の単離されたC D R又は機能的パラトープが含まれる。付加
 的な抗体断片には、F a b'断片、d s F v分子、ダイアボディ等が含まれる。

20

【0116】

例示的な一側面では、本発明は、ここに記載される任意の重鎖C D Rを含む第1のポリ
 ペプチド鎖と、ここに記載される任意の軽鎖C D Rを含む第2のポリペプチド鎖を含む抗
 体断片を提供するものであり、2つのポリペプチド鎖は、一又は複数の鎖間ジスルフィド
 結合により共有結合している。より特定の側面では、本発明は、このような特徴を有する
 2つの鎖の抗体断片を提供するものであり、抗体断片は、F a b、F a b'、F a b'--S
 H、F v、及び/又はF (a b') 2断片から選択される。他の抗体「断片」には、「カッ
 パ体」(例えば、IIIら、Protein Eng 10: 949-57(1997))及び「janusins」(ここで他で更
 に記載)が含まれる。

30

【0117】

抗体は、従来からの技術を使用して断片化することができ、断片は、全抗体に対して上
 述したものと同じようにして有用性についてスクリーニングされる。例えば、F (a b')
 2断片は、ペプシンを用いて抗体を処理することにより産生することができる。得られた
 F (a b') 2断片は、ジスルフィド架橋を還元する処理がなされて、F a b'断片を生成す
 ることができる。F a b断片は、パピンを用いてI g G抗体を処理することにより得る
 ことができ；F (a b')断片は、I g G抗体のペプシン消化により得ることができる。ま
 たF (a b')断片は、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を介して、以下に記載する
 ようにしてF a b'を結合させることにより生成することができる。F a b'断片は、F (a
 b') 2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することにより得られる抗体断片である
 。F a b'断片は、ジチオスレイトール等の還元剤で、F (a b') 2断片を処理すること
 により得ることができる。また、抗体断片ペプチドは、組換え細胞において、そのようなペ
 プチドをコードする核酸を発現させることにより生成することができる(例えば、Evansら

40

50

, J. Immunol. Meth. 184:123-38(1995)). 例えば、F(a b') 2断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、C H 1ドメイン及びH鎖のヒンジ領域をコードするDNA配列、続いてそのような切断された抗体断片分子を生じせしめるための翻訳停止コドンを含むことができる。

【0118】

Fv断片の2つのドメイン、V L及びV Hは、別々の遺伝子によりコードされているが、それらは、例えば組換え方法を使用し、V L及びV H領域(典型的には、抗体のFv領域の重鎖及び軽鎖)が対となって一価分子(単鎖抗体又は単鎖Fv(s c Fv)分子 - 例えば、Birdら.(1988) Science 242:423-426; 及びHustonら.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)を形成する単鎖タンパク質鎖としてそれらを作製させる合成の典型的には可動性のリンカーにより、結合され得る。通常、可動性リンカーは、約10、12、15、又はそれ以上のアミノ酸残基長である。このような抗体の産生方法は、例えば米国特許第4946778号; THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg及びMoore編 Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994), Birdら.(1988) Science 242:423-426; Hustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及びMcCaffertyら, Nature (1990) 348:552-554に記載されている。単鎖抗体は、抗体の形成のために、一つのV H及びV Lのみが使用されるならば一価、2つのV H及びV Lが使用されるならば二価、又は2つ以上のV H及びV Lが使用されるならば多価でありうる。

10

【0119】

ダイアボディは、二価の二重特異性抗体であり、そのV H及びV Lドメインがポリペプチド単鎖上で発現しているが、典型的には、リンカーとして使用するにはあまりに短く、同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成させることはできず、よって、ドメインを、他の鎖の相補的ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を作製する(例えば、Holli ger, Pら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. Jら (1994) Structure 2:1121-1123を参照)。ダイアボディは、同一又は異なっている抗原結合特異性を有するs c Fvが二量体を形成し、従って、同一の抗原又は2つの異なる抗原に対する二価の抗原結合活性を有する分子である抗体断片とみなすことができる。ダイアボディーは、更に詳細には、例えば欧州特許第404097号及び国際公開第93/11161号に記載されている。

20

30

【0120】

d s Fv分子はポリペプチドを結合することにより得ることができ、V H及びV Lそれぞれのアミノ酸残基の一つが、システイン残基の間のジスルフィド結合を介して、システイン残基で置換されている。システイン残基で置換されたアミノ酸残基は、例えばReiterら(Protein Engineering, 7, 697(1994))の方法に従い、抗体の3次元構造推定に基づき、選択することができる。線形抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムF dセグメントを含む(このような抗体は二重特異性又は単一特異性とすることができる)。線形抗体は、例えばZapataら. Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)に、更に詳しく記載されている。

【0121】

「変異」抗体は、少なくともC D R、又は他のV H及び/又はV L配列への、一又は複数の適切なアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、又は配列末端への付加により、親抗体とは異なる抗体のことである(但し、このような変化により改善されないならば、かなりの量の親抗体のエピトープ結合特性が保持されている)。よって、例えば、抗体変異体又は抗体様ペプチド変異体においては、一又は複数のアミノ酸残基を、一又は複数のC D R等、親抗体の一又は複数の高度可変領域の内部又はこれに隣接して導入又は挿入することができる。例えば、抗体変異体は、約1 - 30の挿入されたアミノ酸残基を含有可能であるが、約2 - 10の挿入されたアミノ酸残基が、より典型的には適切である。抗体のアミノ酸配列変異は、例えば抗体コード化核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することにより(例えば、部位特異的突然変異誘発により)、化学的ペプチド合成により、又は任意の他の

40

50

適切な技術により得ることができる。このような変異体には、例えば同定された抗体のアミノ酸配列内部における残基の、欠失及び/又は挿入及び/又は置換によって相違する変異体が含まれる。また、フレームワーク領域又は定常ドメインにおける変異もなされてよく、親抗体に対する変異抗体の免疫原性が変化し、他の分子へ共有又は非共有結合するための部位が提供され、又は補体結合としての、このような特性が変化する。単一変異抗体のフレームワーク領域、定常ドメイン、及び/又は可変領域(又は、その任意の一又は複数のCDR)のそれぞれにおいて、抗体変異体における変異がなされてもよい。あるいは、抗体のフレームワーク領域、可変領域(又はその単一CDR)、又は定常ドメインの一つでのみ、変異がなされてもよい。例えば、Cunningham及びWells(1989), Science 244:1081-1085により記載されているような、アラニンスキャンニング突然変異生成技術、例えばCunningham及びWells(1989)、Science 244:1081-1085に記載されている技術を使用し、変異体VL、VH、又は特定のCDR配列に生じる置換又は欠失のための適切な残基を同定することができるが、また他の適切な突然変異技術を適用することもできる。また多くのアミノ酸置換を実施し、突然変異誘発の既知の方法を使用して試験し、例えばReidhaar-Olson及びSauer, Science 241:53-57(1988)、又はBowie及びSauer Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156(1989)に開示されているもののようにして、スクリーニングすることもできる。変異抗体を産生させるために使用可能な更なる技術には、定向進化及び例えば米国特許第20040009498号; Marksら, Methods Mol Biol. 2004; 248:327-43(2004); Azriel-Rosenfeldら, J Mol Biol. 2004 Jan 2; 335(1): 177-92; Parkら, Biochem Biophys Res Commun. 2000 Aug 28; 275(2): 553-7; Kangら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 15; 88(24): 11120-3; Zahndら, J Biol Chem. 2004 Apr 30; 279(18): 18870-7; Xuら, Chem Biol. 2002 Aug; 9(8): 933-42; Borderら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26; 97(20): 10701-5; Cramerら, Nat Med. 1996 Jan; 2(1): 100-2に記載され、更に一般的には国際特許出願第03/048185号に記載されている他の変異体産生技術が含まれる。

10

20

30

40

50

【0122】

特定のタイプの変異体抗体は二重特異性抗体である。これらは、ハイブリドーマの融合又はFab'断片の結合を含む様々な既知の方法により産生することができる(例えば、Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321(1990)、及びKostelnyら J. Immunol. 148: 1547-1553(1992)を参照)。伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいており、ここで2つの重鎖は異なる特異性を有している(例えば、Milstein及びCuello, Nature, 305: 537(1983)を参照)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を典型的には無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、典型的には、その内一種のみが所望の二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常はなされ、適切ではあるが、かなり煩雑で、生成収率は比較的低くなるおそれがある。同様の手順が国際公開第93/08829号、及びTraunckerら, EMBO J., 10:3655-3656(1991)に開示されている。異なったアプローチに従い、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、組換え又は合成方法により、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。可変ドメイン配列は、典型的には、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインに融合される。軽鎖の結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)も、典型的には、少なくとも一の融合タンパク質に存在している。この種のアプローチのより特定の例では、一つのアームに結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方のアームに(第2の結合特性を付与する)ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含む二重特異性抗体が産生される。このような非対称構造により、所望されない免疫グロブリン鎖の組合せから、所望される二重特異性化合物を容易に分離することができる(このようなアプローチは国際公開第94/04690号に記載されている)。二重特異性抗体の産生の関連方法の更なる記載については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

【 0 1 2 3 】

架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体は、本発明で提供される二重特異性抗体の他のタイプである。また、このような抗体の誘導体も、ある用途においては有利である。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンにカップリングし、他方はビオチンにカップリングさせることができる。このような抗体は、例えば、不要の細胞に対して免疫系細胞を標的化するため(例えば米国特許第4676980号を参照)に提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を用いて作製することができる。適切なペプチド架橋剤と技術は当該分野においてよく知られており、そのような薬剤及び技術の例は、例えば米国特許第4676980号に開示されている。

【 0 1 2 4 】

化学的架橋技術を使用して二重特異性抗体及び抗体様分子(例えば、2つの抗体断片から作製される二重特異性分子)を調製することができる。例えばBrennanら、*Science*, 229:81(1985)は、無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を生成する手順を記述している。ついで、これらの断片を、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。次に。生成されたF a b'断片をチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換してもよい。F a b'-TNB誘導体の一つを、次にメルカプトエチルアミンによる還元でF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成させることもできる。

【 0 1 2 5 】

また、大腸菌から回収されたF a b'-S H断片を化学的にカップリングして、二重特異性抗体を形成させることもできる。例えば、Shalabyら、*J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)には、関連する技術に従った、完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の生成について記載されている。

【 0 1 2 6 】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている(例えば、Kostelnyら、*J. Immunol.* 148(5):1547-1553(1992)を参照)。Hollingerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)により記述された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片分子を作成する別のメカニズムを提供した(例えば同様のダイアボディ関連技術の記載について、Altら、*FEBS Letters*, 454(1990)90-94を参照)。単鎖Fv(s F v)二量体の使用により二重特異性抗体断片分子を作製する他の方策もまた報告されている。例えば、Gruberら、*J. Immunol.* 152:5368(1994)を参照。あるいは、抗体は、「Janusins」として形成されてもよい(Trauneckerら、*EMBO J* 10:3655-3659(1991)及びTrauneckerら、*Int J Cancer Suppl* 7:51-52(1992))。多重特異性抗体の生産に関連した更なる方法は、例えばFangerら、*Immunol. Methods* 4:72-81(1994)に開示されている。

【 0 1 2 7 】

例示的な二重特異性抗体及び抗体様分子は、(i)一方はオーファンリガンドのリガンドに特異的に結合し、他方は第2の標的に特異的に結合し、互いにコンジュゲートしている2つの抗体、(ii)オーファンリガンドのリガンドに特異的な一つの鎖と、第2の分子に特異的な第2の鎖を有する単一抗体、及び(iii)オーファンリガンドのリガンドと第2の分子に対して特異性を有する単鎖抗体を含む。典型的には、第2の標的/第2の分子は、オーファンリガンドのリガンド以外の分子である。

【 0 1 2 8 】

ある側面では、抗体誘導体は、同定された抗体又は断片から調製される。このような誘導体は、例えば、放射性同位体又は他の細胞傷害性化合物を用いて直接誘導体化された抗体でありうる。このような場合、標識された単一特異性抗体を患者に注射し、そこで、ついで、標的抗原を発現する細胞に結合し殺すことができ、未結合の抗体は単に体からなくなる。また、「親和性亢進システム」(AES)(例えば、米国特許第5256395号;Barbetら(1999) *Cancer Biother Radiopharm* 14:153-166;その全ての開示が出典明示に

10

20

30

40

50

よりここに援用される)等の、間接的方策を使用することもできる。この特定のアプローチは、放射標識されたハプテンと、オファンリガンドのリガンドと放射性ハプテンの双方を認識する抗体の使用に關与している。この場合、まず抗体を患者に注射し、標的細胞に結合させ、ついで、未結合の抗体を血流から除去し、放射標識されたハプテンを投与する。ハプテンは、過剰増殖細胞上で抗体-抗原複合体に結合して、それらを殺し、未結合のハプテンは体からなくなる。

【0129】

毒素又は他の化合物は、多数の利用可能な方法の任意のものを使用し、直接的又は間接的に、抗体に結合させることができる。例えば、薬剤は、N-スクシニル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオナート(SPD P)等の架橋剤を使用し、ジスルフィド結合形成を介して、又は抗体のFc領域内の糖質部分を介して、還元された抗体成分のヒンジ領域に結合させることができる(例えば、Yuら(1994) Int. J. Cancer 56:244; Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (CRC Press 1991); Upeslakis ら, 「Modification of Antibodies by Chemical Methods」 Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch(編), 頁187-230(Wiley- Liss, Inc. 1995); Price, 「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」 Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritterら(編), 頁60-84(Cambridge University Press 1995), Cattellら(1989) Chemistry today 7:51-58, Delprinoら(1993) J. Pharm. Sci 82:699-704; Arpiccoら(1997) Bioconjugate Chemistry 8:3; Reisfeldら(1989) Antihody, Immunicon. Radiopharrn. 2:217を参照;それぞれの全ての開示は、出典明示によりここに援用される)。

10

20

【0130】

放射性同位体、毒性タンパク質、毒性小分子、例えば薬剤、毒素、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素阻害剤、治療用放射性核種、血管形成阻害剤、化学療法剤、ピンカルカロイド、アントラサイクリン、エピドフィロトキシン、タキサン、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、COX-2阻害剤、SN-38、抗有糸分裂剤、抗血管形成及びアポトーシス剤、特にドキシソルピシン、メトトレキセート、タキソール、CPT-11、カンプトテカン、ナイトロジェンマスタード、ゲムシタピン、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素、トリアゼン、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、白金配位錯体、緑膿菌外毒素、リシン、アプリン、5-フルオロウリジン、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン(gelonin)、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、及び緑膿菌内毒素及び他のものを含む、細胞傷害性又は細胞阻害効果を有する任意の種類の一部が、例えばオファンレセプターのリガンドを発現する特定の細胞を阻害し又は死滅可能な抗体誘導体を作製するのに使用可能である(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19編 (Mack Publishing Co. 1995); Goodman及びGilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastanら(1986) Cell 47:641; Goldenberg(1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; 米国特許第6077499号を参照;その全ての開示が出典明示によりここに援用される)。毒素は、動物、植物、真菌又は微生物由来のものであってよく、又は化学合成により、新たに作製することもできる。

30

40

【0131】

一側面では、抗体は放射性同位体、例えばI-131で誘導体化される。多くの適切な放射性同位体の任意のものを使用することができ、限定されるものではないが、インジウム-111、ルテチウム-171、ビスマス-212、ビスマス-213、アスタチン-211、銅-62、銅-64、銅-67、イットリウム-90、ヨード-125、ヨード-131、リン-32、リン-33、スカンジウム-47、銀-111、ガリウム-67、プラセオジミウム-142、サマリウム-153、テルビウム-161、ジスプロシウム-166、ホルミウム-166、レニウム-186、レニウム-188、レニウム-189、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225、鉄-59、セレン-75、ヒ素-77、ストロンチウ

50

ム-89、モリブデン-99、ロジウム-105、パラジウム-109、プラセオジウム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリジウム-194、金-198、金-199、及び鉛-211が含まれる。一般的に、放射性核種は、オージェエミッターで好ましくは20~6000KeVの範囲、更に好ましくは60~200KeVの範囲、ベータエミッターで100-2500KeV、アルファエミッターで4000-6000KeVの崩壊エネルギーを有する。また、アルファ粒子の生成を伴い、実質的に崩壊する放射性核種が好ましい。

【0132】

本方法に含めるための細胞傷害性部分の選択では、該部分が、生命維持のための正常な組織、例えば心臓、腎臓、脳、肝臓、骨髄、結腸、胸部、前立腺、甲状腺、胆嚢、肺、副腎、筋肉、神経線維、膵臓、皮膚、又はヒトの体内の他の生命維持のための器官又は組織から選択される一又は複数の組織に対し、有意なインビボ副作用を生じさせないことが所望される。ここで使用される場合、「有意な副作用」なる用語は、インビボで投与された場合、無視できるか又は臨床的に管理できる程度の、例えば化学療法中に通常生じ得るもののような副作用を生じる抗体、リガンド又は抗体コンジュゲートを意味する。

10

【0133】

機能アッセイ

標的リガンドに結合し、オーファンレセプターとのリガンドの結合に干渉するITACSにより同定された抗体、抗体断片又は小分子を、様々な機能アッセイにより、更に評価されうる。例えば、細胞へのsolNKp30-FTL-hFcの結合を防止する抗NKp30L mAbsは、NKp30を発現するNK細胞による死滅を低減させる能力について、試験することができる。更に、抗NKp30Lにより結合した標的細胞の死滅は、エフェクター細胞における活性化Fcレセプターへの結合を可能にするアイソタイプを有するある種の抗NKp30L mAbsの存在下にて増加されうる。機能アッセイは、ITACSスクリーニングで同定されたmAbsの機能効果を試験する多くの他の方法にて構成することができる。例えば、腫瘍細胞の死滅増加に至らしめ、また腫瘍の免疫治療に使用され得るmAbsの同定は、mAbに結合する細胞を標的として使用する死滅アッセイにおいて試験する機能に関与し得る。自己免疫、炎症性疾患の治療に使用されるmAbsの同定は、mAbにより結合した細胞の死滅の低減に至らしめるmAbsのスクリーニングを含みうる。特定の病状(例えば、特定の癌又は自己免疫疾患)の治療における薬剤の有効性を評価するために当該分野で知られているインビトロ及びインビボアッセイを含む、標準的な機能アッセイをまた本文脈において使用することができる。

20

30

【0134】

細胞表面結合リガンドの特徴付け

オーファンリガンドの標的リガンドに対する抗体又は抗体断片がひとたび同定されると、未知のリガンドを回収し、特徴付けるために、該抗体又は断片を使用することができる。例えば、リガンド発現細胞株を、洗浄液(例えば、トリトンX-100)に溶解させ、抗リガンドmAbsを用いたアフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降させてもよい。免疫沈降したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、質量スペクトル技術を使用する微小配列化により分析可能な個々のバンドを切除する。あるいは、ITACSにより同定された抗リガンドmAbsを、リガンドをコードするクローンcDNAの発現に使用しうる。

40

【0135】

製剤

本発明は、ITACSにより同定された抗体又は他の薬剤を含むオーファンリガンドのリガンドに結合する薬剤、又はここに記載された融合タンパク質を含有し、また一又は複数の製薬的に許容可能な担体を含有していてもよい医薬製剤を包含する。例示的な製剤を以下に記載する。

【0136】

本発明の他の目的は、抗体、抗体断片、抗体誘導体、又は小分子で、0.1mg/ml

50

～ 100 mg / ml の濃度で存在しているものを含有する医薬製剤を提供することであり、該製剤は 2.0 ～ 10.0 の pH を有する。製剤は、緩衝系、保存料(類)、等張化剤(類)、キレート剤(類)、安定剤及び界面活性剤を更に含有する。本発明の一実施態様では、医薬製剤は水性製剤、すなわち水分を含有する製剤である。このような製剤は典型的には溶液又は懸濁液である。本発明のさらなる実施態様では、医薬製剤は水溶液である。「水性製剤」なる用語は、少なくとも 50 % w / w の水分を含有している製剤として定義される。同様に、「水溶液」なる用語は、少なくとも 50 % w / w の水分を含有している溶液として定義され、「水性懸濁液」なる用語は、少なくとも 50 % w / w の水分を含有している懸濁液として定義される。

【0137】

上述したように、一側面では、薬剤は、ITACS により同定された抗体又は抗体断片、もしくはその断片又は誘導体である。この側面では、抗体、抗体断片又は抗体誘導体の治療的又は予防的な有効量の例示的、非限定的範囲は、約 0.1 - 100 mg / kg、例えば約 0.1 - 50 mg / kg、例えば約 0.1 - 20 mg / kg、特に約 1 - 10 mg / kg (例えば、約 0.5 mg / kg (例えば 0.3 mg / kg)、約 1 mg / kg、又は約 3 mg / kg) である。一般的に、このような量は、一日に一回又はそれ以下(例えば、1週間に 2 - 3 回、1週間に 1 回、又は 2 週間毎に 1 回)投与される。

【0138】

他の側面では、医薬製剤は凍結乾燥製剤であり、これに医師又は患者が使用前に溶剤及び/又は希釈液を添加する。他の実施態様では、医薬製剤は、何ら事前溶解させることのない使用準備が整った乾燥製剤(例えば、凍結乾燥又は噴霧乾燥されたもの)である。更なる側面では、本発明は水溶液を含有する医薬製剤に関し、該活性剤は 0.1 mg / ml 又はそれ以上の濃度で存在し、該製剤は約 2.0 ～ 約 10.0 の pH を有する。

【0139】

他の側面では、製剤の pH は、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 及び 10.0 からなる列挙から選択される。バッファーは、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、シトレート、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、及びトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、ピシン(bicine)、トリシン、リンゴ酸、スクシネート、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸又はそれらの混合物から選択されうる。これらの特定のバッファーがそれぞれ別の側面を構成する。

【0140】

製剤は、製薬的に許容可能な保存料を更に含有可能である。保存料は、例えばフェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、2-フェノキシエタノール、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、及びチオメロサール、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロロヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン(chlorphenesine)(3 p-クロルフェノキシプロパン-1,2-ジオール)又はそれらの混合物からなる群から選択されうる。更なる側面では、保存料は、0.1 mg / ml ～ 20 mg / ml ; 0.1 mg / ml ～ 5 mg / ml ; 5 mg / ml ～ 10 mg / ml ; 又は 10 mg / ml ～ 20 mg / ml の濃度で存在している。これらの特定の保存料の各々が、本発明の別の側面を構成する。製薬用組成物に保存料を使用することは、当業者によ

10

20

30

40

50

く知られている。簡便には、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995が参照される。

【 0 1 4 1 】

製剤は等張化剤を更に含有しうる。例えば、等張化剤は、塩(例えば塩化ナトリウム)、糖又は糖アルコール、アミノ酸(例えば、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニン)、アルジトール(例えばグリセロール(グリセリン)、1,2-プロパンジオール(プロピレングリコール)、1,3-プロパンジオール、1,3-ブタンジオール)ポリエチレングリコール(例えばPEG 400)、又はそれらの混合物からなる群から選択可能である。任意の糖、例えば単糖類、二糖類又は多糖類、又は水溶性グルカン類、例えばフルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、及びカルボキシメチルセルロース-Naを使用することができる。一実施態様では、糖添加剤はスクロースである。糖アルコールは、少なくとも一-OH基を有するC4-C8炭化水素と定義され、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール(galactitol)、ズルシトール、キシリトール、及びアラビトールを含む。一実施態様では、糖アルコール添加剤はマンニトールである。上述した糖又は糖アルコールは、個々に又は組合せて使用されてよい。使用される量は、糖又は糖アルコールが液状調製物に溶解し、本発明の方法を使用して得られた安定化効果に悪影響を与えない限りは、固定された限界値があるものではない。一実施態様では、糖又は糖アルコールの濃度は、約1mg/ml~約150mg/mlである。本発明の更なる実施態様では、等張化剤は1mg/ml~50mg/ml; 1mg/ml~7mg/ml; 8mg/ml~24mg/ml; 又は25mg/ml~50mg/mlの濃度で存在する。これらの特定の等張化剤の各一が本発明の別の実施態様を構成する。製薬用組成物に等張化剤を使用することは、当業者によく知られている。簡便には、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995が参照される。

10
20

【 0 1 4 2 】

また、製剤はキレート剤を更に含有しうる。キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸、及びアスパラギン酸の塩、及びそれらの混合物から選択されうる。特定の側面では、キレート剤は0.1mg/ml~5mg/ml; 0.1mg/ml~2mg/ml; 又は2mg/ml~5mg/mlの濃度で存在する。これらの特定のキレート剤の各一が本発明の別の実施態様を構成する。製薬用組成物にキレート剤を使用することは当業者によく知られている。簡便には、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995が参照される。

30

【 0 1 4 3 】

製剤は安定剤を更に含有しうる。製薬用組成物に安定剤を使用することは、当業者によく知られている。簡便には、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995が参照される。一側面では、本発明の組成物は安定した液状製薬用組成物であり、その治療的活性化合物は、液状医薬製剤の保存中に、凝集体の形成を示す可能性のあるポリペプチドを含む。「凝集体形成」とは、オリゴマーを形成するポリペプチド分子間の物理的相互作用を意図しており、これは、可溶性か、又は溶液から沈殿する大きな可視できる凝集体として残る。「保存中」とは、液状製薬用組成物又は調製されて直ぐの製剤が、被験者に直ぐ投与されるものではないことを意図している。むしろ、調製後に、液状の形態、凍結状態、液状形態に後で再構成される乾燥した形態、又は被験者への投与に適した他の形態で、包装又は保存されている。「乾燥した形態」とは、液状製薬用組成物又は製剤が、フリーズドライ(すなわち凍結乾燥; 例えばWilliams及びPolli(1984) J. Parental Sci. Technol. 38 : 48-59を参照)、噴霧乾燥(Masters(1991) Spray-Drying Handbook (第5版; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp.491-676; Broadheadら, (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18 : 1169-1206; 及びMumenthalerら, (1994) Pharm. Res. 11 : 12-20)、又は空気乾燥(Carpenter及びCrowe (1988) Cryobiology 25 : 459-470

40
50

；及びRoser (1991) Biopharm. 4 : 47-53)により乾燥されることを意図している。液状製薬用組成物の保存中におけるポリペプチドによる凝集体形成は、ポリペプチドの生物活性に悪影響を及ぼすおそれがあり、製薬用組成物の治療効果が損なわれる。更に凝集体形成は、例えばチューブ、膜、又はポリペプチド含有製薬用組成物が注入システムを使用して投与される場合はポンプの閉塞のような、他の問題を生じさせうる。

【0144】

本発明の製薬用組成物は、組成物の保存中、ポリペプチドによる凝集体形成を低減させるのに十分な量のアミノ酸塩基を更に含有しうる。「アミノ酸塩基」とは、アミノ酸又はアミノ酸の組合せを意図しており、任意の与えられたアミノ酸が、その遊離塩基の形態又はその塩の形態の何れかで存在している。アミノ酸の組合せを使用する場合、全てのアミノ酸が遊離塩基の形態で存在していてもよく、全てが塩の形態で存在していてもよく、又は幾つかが遊離塩基の形態で存在していてもよく、残りが塩の形態で存在していてもよい。一実施態様では、本発明の組成物の調製に使用されるアミノ酸は、帯電側鎖を担持しているもの、例えばアルギニン、リジン、アスパラギン酸、及びグルタミン酸である。特定のアミノ酸(例えば、メチオニン、ヒスチジン、イミダゾール、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニン及びそれらの混合物)の任意の立体異性体(すなわち、L、D、又はそれらの混合物)、又はこれらの立体異性体の組合せが、該特定のアミノ酸が遊離塩基の形態又は塩の形態の何れかで存在している限り、本発明の製薬用組成物中に存在していてもよい。一実施態様では、L-立体異性体を使用される。また本発明の組成物は、これらのアミノ酸の類似体と共に製剤化されてもよい。「アミノ酸類似体」とは、本発明の液状製薬用組成物の保存中に、ポリペプチドによる凝集体形成を低減させるという所望の効果をもたらす天然に生じるアミノ酸の誘導体を意図している。適切なアルギニン類似体は、例えばアミノグアニジン、オルニチン及びN-モノエチル-L-アルギニンを含み、適切なメチオニン類似体はエチオニン及びブチオニンを含み、適切なシステイン類似体はS-メチル-L-システインを含む。他のアミノ酸と同様、アミノ酸類似体は、遊離塩基の形態又は塩の形態の何れかで組成物中に導入される。本発明の更なる実施態様では、アミノ酸又はアミノ酸類似体は、タンパク質の凝集を防止し又は遅延化させるのに十分な濃度で使用される。

【0145】

他の側面では、メチオニン(又は他の硫黄含有アミノ酸又はアミノ酸類似体)は、治療剤として作用するポリペプチドが酸化を受けやすい少なくとも一のメチオニン残基を有するポリペプチドである場合、メチオニン残基のメチオニンスルホキシドへの酸化を阻害するために添加されうる。「阻害」とは、経時的なメチオニン酸化種の蓄積を最小にすることを意図している。メチオニン酸化を阻害すると、適切な分子形態でのポリペプチドの保持が更に高まる。メチオニン(L又はD)の任意の立体異性体又はそれらの任意の組合せを使用することができる。添加される量は、メチオニンスルホキシドの量が規制機関にとって許容可能であるような、メチオニン残基の酸化を阻害するのに十分な量とするべきである。典型的には、これは、組成物が約10%~約30%を越えるメチオニンスルホキシドを含まないことを意味する。一般的に、これは、メチオニン残基に添加されるメチオニンの比率が、約1:1~約1000:1、例えば10:1~約100:1の範囲になるようにメチオニンを添加することで、達成することができる。

【0146】

更なる側面では、本発明の製剤は高分子量ポリマー又は低分子量化合物の群から選択される安定剤を更に含有する。本発明の更なる実施態様では、安定剤は、ポリエチレングリコール(例えばPEG3350)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、カルボキシ-/ヒドロキシセルロース又はそれらの誘導体(例えばHPC、HPC-SL、HPC-L及びHPMC)、シクロデキストリン類、硫黄含有物質、例えばモノチオグリセロール、チオグリコール酸及び2-メチルチオエタノール、及び異なった塩(例えば塩化ナトリウム)から選択される。これらの特定の安定剤の各一が本発明の別の実施態様を構成する。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

製薬用組成物は、その中の治療的に活性なポリペプチドの安定性を更に高める、付加的な安定剤をまた含有しうる。本発明にとって特に関心のある安定剤は、限定されるものではないが、メチオニンの酸化に対してポリペプチドを保護する EDTA 及びメチオニン、及び凍結-解凍又は機械的剪断に関連する凝集からポリペプチドを保護する非イオン性界面活性剤を含む。

【 0 1 4 8 】

製剤は更に界面活性剤を含有しうる。本発明の更なる実施態様では、界面活性剤は、洗淨剤、エトキシ化ヒマシ油、ポリグリコール化グリセリド、アセチル化モノグリセリド、ソルビタンの脂肪酸エステル、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンのブロックポリマー(例えばポロキサマー、例えばプルロニック(Pluronic)(登録商標)F 6 8、ポロキサマー 1 8 8 及び 4 0 7、トリトン X-1 0 0)、ポリオキシエチレンソルビタンの脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン及びポリエチレンの誘導体、例えばアルキル化されアルコキシ化された誘導体(トゥイーン類(tweens)、例えばトゥイーン-2 0、トゥイーン-4 0、トゥイーン 8 0 及びブリジ(Brij)-3 5)、モノグリセリド類又はそのエトキシ化誘導体、ジグリセリド類又はそのポリオキシエチレン誘導体、アルコール、グリセロール、レシチン及びリン脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロール及びスフィンゴミエリン)、リン脂質の誘導体(例えばホスファチジン酸ジバルミトイル)及びリゾリン脂質(例えばパルミトイル-リゾホスファチジル-L-セリン、及びエタノールアミン、コリン、セリン又はスレオニンの 1-アシル-sn-グリセロ-3-ホスファートエステル)、及びリゾホスファチジル及びホスファチジルコリンのアルキル、アルコキシ(アルキルエステル)、アルコキシ(アルキルエーテル)-誘導体、例えばリゾホスファチジルコリンのラウロイル及びミリストイル誘導体、ジバルミトイルホスファチジルコリン及び極性頭部基の修飾体、コリン類、エタノールアミン類、ホスファチジン酸、セリン類、スレオニン類、グリセロール、イノシトール、及び正に帯電した D O D A C、D O T M A、D C P、B I S H O P、リゾホスファチジルセリン、及びリゾホスファチジルスレオニン、及びグリセロリン脂質(例えばセファリン類)、グリセロ糖脂質(例えばガラクトピラノシド)、スフィンゴ糖脂質(例えばセラミド類、ガングリオシド類)、ドデシルホスホコリン、鶏卵リゾレシチン、フシジン酸誘導体-(例えばタウロ-ジヒドロフジシン酸ナトリウム等)、長鎖脂肪酸及びそれらの C₆-C₁₂ 塩(例えばオレイン酸及びカプリル酸)、アシルカルニチン類及び誘導体、リジン、アルギニン又はヒスチジンの N-アシル化誘導体、又はリジン又はアルギニンの側鎖アシル化誘導体、リジン、アルギニン又はヒスチジンと中性又は酸性アミノ酸の任意の組合せを含有するジペプチドの N-アシル化誘導体、中性アミノ酸と 2 つの帯電したアミノ酸の任意の組合せを含有するトリペプチドの N-アシル化誘導体、D S S (ドキュセートナトリウム、C A S 登録番号[5 7 7-1 1-7])、ドキュセートカルシウム、C A S 登録番号[1 2 8-4 9-4])、ドキュセートカリウム、C A S 登録番号[7 4 9 1-0 9-0])、S D S (ドデシル硫酸ナトリウム又はラウリル硫酸ナトリウム)、カプリル酸ナトリウム、コール酸又はその誘導体、胆汁酸及びその塩、及びグリシン又はタウリンコンジュゲート、ウルソデオキシコール酸、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナート、アニオン性(アルキル-アリアル-スルホナート類)の一価の界面活性剤、双性イオン性界面活性剤(例えば、N-アルキル-N,N-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホナート、3-コールアミド-1-プロピルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホナート、カチオン性界面活性剤(第 4 級アンモニウム塩基)(例えばセチル-トリメチルアンモニウムプロミド、セチルピリジニウムクロリド)、非イオン性界面活性剤(例えば、ドデシル-D-グルコピラノシド)、ポロキサミン類(例えばテトロニクス(Tetronic's))で、エチレンジアミンにプロピレンオキシド及びエチレンオキシドを逐次付加することにより誘導された四官能性ブロックコポリマーから選択され、又は界面活性剤は、イミダゾリン誘導体又はそれらの

10

20

30

40

50

混合物の群から選択されてもよい。これらの特定の界面活性剤の各一が本発明の別の実施態様を構成する。製薬用組成物に界面活性剤を使用することは、当業者によく知られている。簡便には、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995が参照される。

【0149】

製剤は、プロテアーゼインヒビター、例えばEDTA(エチレンジアミン四酢酸)及びベンズアミジンHClを更に含有していてもよく、他の商業的に入手可能なプロテアーゼインヒビターを使用することもできる。プロテアーゼインヒビターを使用することは、自己触媒を阻害するため、プロテアーゼのチモーゲンを含有する製薬用組成物に特に有用である。

10

【0150】

他の成分が本発明のペプチド医薬製剤中に存在していてもよい。このような付加的な成分は、湿潤剤、乳化剤、酸化防止剤、増量剤、張力修正剤、キレート剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチン又はタンパク質)及び双性イオン(例えばアミノ酸、特にベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リジン及びヒスチジン)を含みうる。もちろん、このような付加的な成分は、本発明の医薬製剤の全体的な安定性に悪影響がないようにすべきである。

【0151】

本発明の一又は複数の化合物を含む製薬用組成物は、幾つかの部位、例えば局所的部位、特に皮膚及び粘膜部位、動脈、静脈、心臓への投与等、バイパス吸収がなされる部位、例えば皮膚、皮下、粘膜又は腹部への投与等、吸収に関連する部位において、このような治療が必要とされる患者に投与されうる。

20

【0152】

本発明の製薬用組成物は、幾つかの投与経路、例えば舌、舌下、頬、口、経口、胃、及び腸、鼻、肺を介して、例えば細気管支及び肺胞及び/又はそれらを組合せたもの、表皮、真皮、経皮、腔、直腸、眼球を介して、例えば結膜、尿管、及び非経口を介して、このような治療を必要としている患者に投与されうる。

【0153】

本発明の組成物は、幾つかの投与形態、例えば溶液、懸濁液、エマルション、マイクロエマルション、多相エマルション、フォーム、膏薬、ペースト、プラスター、軟膏、錠剤、被覆錠剤、リンス、カプセル、例えば硬質ゼラチンカプセル及び軟質ゼラチンカプセル、坐薬、直腸用カプセル、ドロップ、ゲル、スプレー、パウダー、エアゾール、吸入剤、点眼剤、眼球用軟膏、眼球用リンス、腔用ペッサリー、腔用リング、腔用軟膏、注入溶液、インサイツ形質転換溶液、例えばインサイツゲル化、インサイツセット用、インサイツ沈殿化、インサイツ結晶化のもの、注入液、及び移植片として投与されうる。

30

【0154】

本発明の組成物は、更に、化合物の安定性を更に高め、生物学的利用能を増加させ、溶解度を高め、副作用を低減させ、当業者によく知られている時間療法を達成し、患者のコンプライアンスを高め、又はそれらの任意の組合せのために、例えば共有的、疎水的及び静電的相互作用を介して、薬剤担体、薬剤送達系、及び進化した薬剤送達系において配合し、又は付加させてもよい。担体、薬剤送達系及び進化した薬剤送達系の例は、限定されるものではないが、ポリマー、例えばセルロース及び誘導體、多糖類、例えばデキストラン及び誘導體、デンプン及び誘導體、ポリ(ビニルアルコール)、アクリラート及びメタクリラートポリマー、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、及びそれらのブロックコ-ポリマー、ポリエチレングリコール、担体タンパク質、例えばアルブミン、ゲル、例えば熱ゲル化系、例えば当業者によく知られているブロックコポリマー系、ミセル、リボソーム、マイクロスフィア、ナノ粒子、液晶、及びそれらの分散液、L2相、及び脂質-水系における相挙動が当業者によく知られているそこでの分散液、ポリマー性ミセル、多相エマルション、自己乳化剤、自己-マイクロ乳化剤、シクロデキストリン及びそれらの誘導體、及びデンドリマーを含む。

40

50

【 0 1 5 5 】

本発明の組成物は、全て当業者によく知られたデバイスである、定量吸入器、乾燥パウダー吸入器、及び噴霧器等を使用し、化合物を肺に投与するための、固形、半固形、パウダー及び溶液の製剤に有用である。

【 0 1 5 6 】

本発明の組成物は、制御、徐放性、持続性、遅延性及び低速放出性の薬剤送達系の製剤に特に有用である。特に限定されるものではないが、組成物は、当業者によく知られている非経口用の制御放出性及び徐放性系(双方の系とも、投与の数が何倍も低下する)製剤に有用である。更に好ましいのは、皮下投与される制御放出性及び徐放性系のものである。本発明の範囲を限定することなく、有用な制御放出性及び組成物の例は、ヒドロゲル、油性ゲル、液晶、ポリマー性ミセル、マイクロスフィア、ナノ粒子である。

10

【 0 1 5 7 】

本発明の組成物に有用な制御放出性系の作製方法は、限定されるものではないが、結晶化、凝縮、共結晶化、沈殿、共沈殿、乳化、分散、高圧ホモジナイズ、カプセル化、噴霧乾燥、マイクロカプセル化、コアセルベーション、相分離、マイクロスフィアを製造するための溶媒蒸発、押出及び超臨界流体プロセスを含む。一般的には、Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise, D.L. 編. Marcel Dekker, New York, 2000)及びDrug and the Pharmaceutical Sciences vol.99: Protein Formulation and Delivery(MacNally, E.J. 編. Marcel Dekker, New York, 2000)を参照。

【 0 1 5 8 】

非経口投与は、シリンジ、場合によってはペン様シリンジにより、皮下、筋肉内、腹膜内又は静脈内注射によって実施されうる。あるいは、非経口投与は、注入ポンプにより実施することもできる。更なる選択肢は、鼻用又は肺用スプレーの形態で化合物を投与するための溶液又は懸濁液であってよい組成物にある。更なる選択肢としては、本発明の化合物を含む製薬用組成物を、例えば針のない注射、又はイオン導入パッチであってよいパッチによる経皮投与用、又は頬等の経粘膜投与用に適合させることもできる。

20

【 0 1 5 9 】

化合物は、肺薬剤送達系に適した任意の既知のタイプのデバイスを使用し、ビヒクル、例えば溶液、懸濁液又は乾燥パウダーとして、肺経路を介して投与することができる。これらの例には、限定されるものではないが、肺薬剤送達用の3種類のエアゾール発生の一般的タイプが含まれ、ジェット又は超音波噴霧器、定量吸入器、又は乾燥パウダー吸入器が含まれうる(Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4)(1997)395-453を参照)。

30

【 0 1 6 0 】

標準化された試験法に基づき、粒子の空気動学的直径(d_a)を、単位密度($1 \text{ g} / \text{cm}^3$)の参照基準球形粒子の幾何学的相当直径として定義する。最も単純な場合、球形粒子に対して、 d_a は:

【 数 1 】

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a}} d$$

40

に記載されるような密度比の平方根の関数として、参照直径(d)に関連している。

【 0 1 6 1 】

この関係は非球形粒子に対しては修正される(Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385を参照)。「M M A D」及び「M M E A D」なる用語は、詳しく記載されており、当該分野で知られている(Edwards DA, Ben-Jebria A, Lan

50

ger R、及び空気動学的粒子径分布の中央値の測定値を表す。Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385を参照)。空気動学的中央粒子径(M M A D)及び有効空気動学的中央粒子径(M M E A D)(mass median effective aerodynamic diameter)は、交換可能に使用され、統計パラメータであり、実際の形状、サイズ又は密度に無関係に、肺中に沈着するそれらの可能性に関連して、エアゾール粒子のサイズが経験的に記載されている(Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385を参照)。通常、M M A Dは、空気中における粒子の慣性挙動を測定する装置、衝突体を用いてなされる測定から算出される。

10

【0162】

更なる実施態様では、製剤は、 $10\ \mu\text{m}$ 、好ましくは $1 - 5\ \mu\text{m}$ 、最も好ましくは $1 - 3\ \mu\text{m}$ 未満のエアゾール粒子のM M A Dを達成するために、任意の既知のエアゾール化技術、例えばネブライゼーションによりエアゾール化することができる。好ましい粒子径は、肺の奥深くまで薬剤を送達せしめるのに最も効果的なサイズに基づいており、タンパク質が最適に吸収されるようになされる(例えば、Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385を参照)。化合物を含有する肺用製剤を肺の奥深くに付着させることは、吸入技術、例えば限定されるものではないが：低吸入速度(例えば $30\ \text{L}/\text{分}$)、呼吸停止及び作動のタイミングを修正して最適化されうる。

20

【0163】

「安定化された製剤」なる用語は、物理的安定性が増した、化学的安定性が増した、又は物理的及び化学的安定性が増した製剤を意味する。

ここで使用される場合、タンパク質製剤の「物理的安定性」なる用語は、タンパク質が熱-機械的ストレスに暴露され、及び/又は不安定な表面及び界面、例えば疎水性表面及び界面と相互作用する結果として、タンパク質が生物学的に不活性になり及び/又は不溶性の凝集体が形成されるというタンパク質の傾向を意味する。水性タンパク質製剤の物理的安定性は、適切な容器(例えばカートリッジ又はバイアル)に充填された製剤を、様々な時間、異なる温度で機械的/物理的ストレス(例えば攪拌)に暴露した後に、視覚検査及び/又は濁度測定することで評価される。製剤の視覚検査は、暗色背景で、鋭く集光されたライト下において実施される。製剤の濁度は、例えば $0 - 3$ のスケールで、濁りの程度をランク付けする視覚スコア(濁りのない製剤は視覚スコア 0 に相当し、日光下で視覚的に濁りのある製剤は視覚スコア 3 に相当する)により特徴付ける。製剤は、日光下で視覚的濁りを示す場合に、タンパク質会合に関して物理的に不安定であると分類される。また製剤の濁度は、当業者によく知られている簡単な濁度測定法により評価することもできる。また水性タンパク質製剤の物理的安定性は、タンパク質の構造状態のプロープ又は分光剤を使用して評価することもできる。プロープは、好ましくはタンパク質の非天然配座異性体に結合する小分子である。タンパク質構造の小分子分光プロープの一例はチオフラビンTである。チオフラビンTは、アミロイド原繊維の検出に広範囲に使用されている蛍光染料である。原繊維、おそらく他のタンパク質立体配置が存在すると、チオフラビンTが約 $450\ \text{nm}$ で新たな励起極大を引き起こし、原繊維タンパク質形態に結合した時に、約 $482\ \text{nm}$ で増強発光する。未結合のチオフラビンTは、本質的にはその波長で非蛍光性である。

30

40

【0164】

天然から非天然状態までのタンパク質構造における変化のプロープとして、他の小分子を使用することができる。例えば、タンパク質の暴露された疎水性パッチに優先的に結合する「疎水性パッチ」プロープである。疎水性パッチは、その天然状態にあるタンパク質の3次構造内に一般的に埋められているが、タンパク質の展開及び変性が始まると、暴露されるようになる。これらの小分子の例、分光プロープは、芳香族の疎水性染料、例えばアントラセン、アクリジン、フェナントロリン等である。他の分光プロープは金属-アミ

50

ノ酸錯体、例えば疎水性アミノ酸、例えばフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、及びバリン等のコバルト金属錯体である。

【0165】

ここで使用される場合、タンパク質製剤の「化学的安定性」なる用語は、天然のタンパク質構造と比較して、免疫原性の潜在的増加及び/又は生物学的有効性の潜在的低下を伴う、化学的な分解産物の形成に至るタンパク質構造における化学的共有変化を意味する。種々の化学的な分解産物は、天然タンパク質の性質及び種類、及びタンパク質が暴露される環境に応じて形成されうる。化学的分解の排除は、多くの場合、完全に回避することはできず、当業者によく知られているように、タンパク質製剤の保存及び使用中に、化学的な分解産物の量の増加が見られる。殆どのタンパク質は、脱アミド化する傾向にあり、グルタミル又はアスパラギン残基の側鎖アミド基が加水分解されて、遊離カルボン酸を形成する。他の分解経路は高分子量の形質転換産物の形成に関与しており、2又はそれ以上のタンパク質分子は、アミド転移及び/又はジスルフィド相互作用を介して互いに共有結合し、共有結合した二量体、オリゴマー及びポリマーの分解産物の形成に至る(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992)。(例えばメチオニン残基の)酸化も、化学的分解の他の変形例として挙げることができる。タンパク質製剤の化学的安定性は、異なる環境条件に暴露させた後、種々の時点での化学的な分解産物の量を測定することにより評価することができる(分解産物の形成は、多くの場合、例えば温度上昇により促進される)。個々の分解産物の各々の量は、多くの場合、様々なクロマトグラフィー技術(例えばSEC-HPLC及び/又はRP-HPLC)を使用し、分子サイズ及び/又は電荷に応じて、分解産物を分離することにより測定される。

10

20

【0166】

よって、上に概要を述べたように、「安定化された製剤」とは、物理的安定性が増加、化学的安定性が増加、又は物理的及び化学的安定性が増加した製剤を意味する。一般的に、製剤は、有効期限に到達するまで、使用及び保存中に(推奨される用途及び保存条件で)安定していなければならない。

【0167】

本発明の一実施態様では、該化合物を含有する医薬製剤は、6週間以上の使用と、3年以上の保存に対して安定している。本発明の他の実施態様では、該化合物を含有する医薬製剤は、4週間以上の使用と、3年以上の保存に対して安定している。本発明のさらなる実施態様では、該化合物を含有する医薬製剤は、4週間以上の使用と、2年以上の保存に対して安定している。本発明の更なる実施態様では、該化合物を含有する製剤組成物は、2週間以上の使用と、2年以上の保存に対して安定している。

30

【0168】

治療への応用

本発明に係る癌又は自己免疫疾患等の疾病の治療に有用な組成物は、オーファンリガンドにリガンドを結合させる薬剤を含有する。そのような薬剤は、ITACSにより同定された薬剤、又は本発明によって設計された融合タンパク質でありうる。

【0169】

また本発明の組成物は、癌又は自己免疫疾患の治療に有効な第二の薬剤と組合せて、オーファンリガンドのリガンドに結合する薬剤を含有しうる。このような組合せ物の投与を含む実施態様では、リガンドに結合する薬剤の用量は、それ自体で有効量を含み得、更なる薬剤(類)は、患者への治療的有用性を更に高めうる。あるいは、リガンドに結合する薬剤と第二の薬剤の組合せは、併せて症候群の予防及び治療に有効な量を含んでよい。更に、有効量は、例えば投与のタイミング及び回数、投与方式、製剤等を含む、特定の治療計画で定めることができると理解されるであろう。

40

【0170】

よって、ITACSにより同定される薬剤、並びに本発明により提供される融合タンパク質の任意のものを、多くの抗癌治療剤及び/又は予防剤及び治療法と組合せることがで

50

きる。このような薬剤の非限定的例には、カルバミン酸フルオロピリミジン、例えばカペシタビン；非ポリグルタミン酸化チミジル酸シクターゼインヒビター；ヌクレオシド類似体、例えばトクラデシン(tocladesine)；抗葉酸剤、例えばペメトレキセド二ナトリウム；タキサン類及びタキサン類似体；トポイソメラーゼインヒビター；ポリアミン類似体；mTORインヒビター(例えば、ラパマイシンエステル)；アルキル化剤(例えば、オキサリプラチン)；レシチンインヒビター；ビタミンD類似体(例えば、セオカルシトール(seocalcitol))；炭水化物プロセシングインヒビター；葉酸代謝拮抗アントゴニスト；チュミジラート(thumidylate)シクターゼインヒビター；他の代謝拮抗剤(例えば、ラルチトレキセド)；リボヌクレアーゼレダクターゼインヒビター；ジオキソラートヌクレオシド類似体；チミラートシクターゼインヒビター；ゴナドトロピン放出ホルモン(GRNH)ペプチド；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；化学変性テトラサイクリン(例えば、CMT-3；COL-3)；シトシンデアミナーゼ；チモペンチン；DTIC；カルムスチン；カルボプラチン；ピンブラスチン；テモゾロミド；ピンデシン；チモシン-；ヒストンデアセチラーゼインヒビター(例えば、フェニルブチラート)；DNA修復酵素(例えば、DNA修復酵素及び関連する組成物、例えばジメリシン(Dimericine)^{T M}(T4エンドヌクレアーゼV含有リポソーム))；ガストリンペプチド(及び関連する組成物、例えばガストリミュン(Gastrimmune)^{T M})；GMK及び関連する化合物/組成物(例えば、Knutson, Curr Opin Investig Drugs. 2002 Jan；3(1)：159-64、及びChapmanら, Clin Cancer Res. 2000 Dec；6(12)：4658-62を参照)；ベータ-カテニンブロッカー/インヒビター及び/又は前腫瘍又は腫瘍細胞核におけるベータ-カテニンの生成量を低下させる薬剤(例えば、米国特許第6677116号を参照)、E-カドヘリン発現を上方調節する薬剤(又はE-カドヘリン)；ナメクジ(ベータ-カテニン-関連)遺伝子発現を低減する薬剤；PAI-1をブロックし、阻害し又は拮抗するか、又はuPAレセプターとのウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)相互作用を調節する薬剤；スルビピン；DNA脱メチル化剤；「架橋」剤、例えば白金関連抗癌剤(シスプラチン、カルボプラチン等)；抗アポトーシスシグナル伝達をブロックする薬剤、例えばMAPK及びRasシグナル伝達経路を阻害する薬剤又はその成分(例えば、サイクリンDの生成及び/又は機能と干渉する薬剤)；増殖抑制剤、例えば代謝拮抗剤、例えばセペシタビン(Cepecitabine)/ゼローダ、シタラビン/Ara-C、クラドリピン/ロイスタチン、フルダライン(Fludaraine)/フルダラ、フルオロウラシル/5-FU、ゲムシタビン/ジェムザール、メルカプトプリン/6-MP、メトトレキサート/MTX、チオグアニン/6-TG、アロプリノール/ジロプリン(Zyloprim)等；アシル化剤、例えばブスルファン、シクロホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、セムスチン、カルボプラチン、シスプラチン、プロカルバジン、ダカルバジン、アルトレタミン(Altretamine)、ロムスチン、カルムスチン、クロラムブシル等；トポイソメラーゼインヒビター、例えばカンプトテシン、例えばトポテカン、イリノテカン；例えばポドフィロトキシン、例えばエトポシド/VP16、テニポシド/VP26等；微小管及び/又は紡錘体形成のインヒビター、例えばピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルピン、又はタキサン、例えばパクリタキセル、ドセタキセル、コンプレスタチン(ombrestatin)、エポシロンB等；RRR-アルファ-コハク酸トコフェリル；アントラサイクリン、例えばダウノルピシン/セルビジン(Cerubidine)及びドキシソルピシン；イダルピシン；マイトマイシン；プリカマイシン；レチノイン酸類似体、例えばトランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸等；レセプターチロシンキナーゼのインヒビター；ErbB1-EGFRのインヒビター、例えばイレッサ、アービタックス等；ErbB2/Her2のインヒビター、例えばハーセプチン等；c-kitのインヒビター、例えばグリーベック；VEGFレセプターのインヒビター、例えばZD6474、SU6668等；ErbB3、ErbB4、IGF-IR、インシュリンレセプター、PDGFRa、PDGFRベータ、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、c-met、Ron、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7等のインヒビター；癌関連酵素のインヒビター、例えばメタロプロテイナーゼインヒビター、例えばマリマスタット(marimastat)、ネオバス

10

20

30

40

50

タット(Neovastat)等；カテプシンB；カテプシンDデヒドロゲナーゼ活性のモジュレーター；グルタチオン-S-トランスフェラーゼ及び関連化合物、例えばグルタシルシステインシンセターゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼ；プロテアソームインヒビター(例えば、ボルテゾミブ)；チロシンキナーゼインヒビター；ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター；HSP90インヒビター(例えば、17-アリルアミノゲルダナマイシン)及び他の熱ショックタンパク質インヒビター；ミコフェノール酸モフェチル；ミコフェノール酸；アスパラギナーゼ；カルシニューリンインヒビター；TORインヒビター；ムルチキン(multikine)分子；エンケファリン(例えば、米国特許第6737397号)；SU11248(Pfizer)；BAY43-9006(Bayer及びOnyx)；「リンパ球ホーミング」メカニズムのインヒビター、例えばFTY720；タルセバ；イレッサ；グリベック；サリドマイド；及び接着分子インヒビター(例えば、抗LFA等)が含まれる。本発明の組合せ組成物及び組合せ投与方法に使用可能な付加的な抗腫瘍剤には、米国特許第6660309号、同6664377号、同6677328号、同6680342号、同6683059号及び同6680306号、並びに国際特許出願第2003070921号に記載されているものが含まれる。

10

【0171】

適切な場合、一又は複数のこのような薬剤を、またもしくは別に、同定された薬剤又は融合タンパク質とコンジュゲートさせることもできる。このようなコンジュゲートは本発明の別の特徴である。

【0172】

組合せ組成物及び組合せ送達方法は、またもしくは別に、抗アレルギー剤(例えば、小分子化合物、タンパク質、糖タンパク質、又は腫瘍及び癌抗原に対する耐性を破壊する抗体)を含む。

20

【0173】

特定の側面では、本発明は、ITACSにより同定された少なくとも一の薬剤又はここに記載された融合タンパク質と、少なくとも一の二次抗癌モノクローナル抗体を含む組合せ組成物を提供する。多くの適切な抗癌mAbsが当該分野で知られており、類似の適切な抗体は、癌関連標的に対して開発され得る。適切な二次抗癌mAbsの特定の例には、抗CD20mAbs(例えば、リツキシマブ及びHuMax-CD20)、抗Her2mAbs(例えば、トラスツズマブ)、抗CD52mAbs(例えば、アレムツズマブ及びキャパス(Capath)(登録商標)1H)、抗EGFRmAbs(例えば、セツキシマブ、HuMax-EGFr、及びABX-EGF)、ザミル(Zamyl)、ペルツズマブ(Pertuzumab)、抗A33抗体(米国特許第6652853号を参照)、抗癌胎児性タンパク質mAbs(米国特許第5688505号を参照)、抗PSMAmAbs(例えば、米国特許第6649163号、及びMilowskyら、J Clin Oncol. 2004 Jul 1; 22(13): 2522-31. Epub 2004 Jun 01)、抗TAG-72抗体(米国特許第6207815号を参照)、抗アミノリン脂質抗体(米国特許第6406693号を参照)、抗ニューロトロフィン抗体(米国特許第6548062号)、抗C3b(i)抗体(米国特許第6572856号を参照)、抗サイトケラチン(CK)mAbs、抗MN抗体(例えば、米国特許第6051226号を参照)、抗mts1mAbs(例えば、米国特許第6638504号を参照)、抗PSA抗体(例えば、Donnら、Andrologia. 1990; 22 Suppl 1: 44-55; Sinhaら、Anat Rec. 1996 Aug; 245(4): 652-61; 及びKatzenwadelら、Anticancer Res. 2000 May-Jun; 20(3A): 1551-5を参照)；CA125に対する抗体；インテグリンベータ1等のインテグリン類に対する抗体；VCAAMの抗体/インヒビター；抗アルファ-v/ベータ-3インテグリンmAbs；抗キノスタチン(kininostatin)mAbs；抗アスパルチル(アスパラギニル)ベータ-ヒドロキシラーゼ(HAAH)細胞内抗体(intrabodies)(例えば、米国特許第6783758号を参照)；抗CD3mAbs(例えば、米国特許第6706265号及び同6750325号を参照)及び抗CD3二重特異性抗体(例えば、抗CD3/Ep-CAM、抗CD3/her2、及び抗CD3/EGP-2抗体 - 例えはKroesenら、Cancer Immunol Immunother. 1997 Nov-Dec; 45(3-4): 203-6を参照)；及び抗VEFGmAbs(例えば、ベバシズマブ)が含まれる。他

30

40

50

の可能な適切な二次m A b分子には、アレムツズマブ、エドレコロマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、及びゲムツズマブオゾガマイシンが含まれる。一側面では、本発明は、一又は複数の抗体、典型的には、VEGF、bFGF及びアンジオポエチン-1等の、血管新生因子及び/又はそれらのレセプターを標的とするモノクローナル抗体；及び他の関連標的に対するモノクローナル抗体を含有する組合せ組成物及び組合せ治療を提供する(また一般的には、Reisfeldら, *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Mar ; 133(3) : 295-304 ; Mousaら, *Curr Pharm Des.* 2004 ; 10(1) : 1-9 ; Shibuya, *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003 Dec ; 122(6) : 498-503 ; Zhangら, *Mol Biotechnol.* 2003 Oct ; 25(2) : 185-200 ; Kiselevら, *Biochemistry (Mosc).* 2003 May ; 68(5) : 497-513 ; Shepherd, *Lung Cancer.* 2003 Aug ; 41 Suppl 1 : S63-72 ; O'Reilly, *Methods Mol Biol.* 2003 ; 223 : 599-634 ; Zhuら, *Curr Cancer Drug Targets.* 2002 Jun ; 2(2) : 135-56 ; 及び国際特許出願第2004/035537号を参照)。

10

【0174】

更なる側面では、本発明は、血管新生、新血管形成、及び/又は他の血管形成の一又は複数のインヒビター(このような薬剤はここでは抗血管新生剤、抗血管新生薬等の用語で称される)を含有する組合せ組成物及び方法を提供する。このような薬剤の非限定的例には、(個々に又は組合せとして)エンドスタチン及びアンギオスタチン(Marx (2003) *Science* 301, 452-454で概説)及びその誘導体/類似体；抗血管新生ヘパリン誘導体及び関連分子(例えば、ヘペリナーゼIII)；VEGF-Rキナーゼインヒビター及び他の抗血管新生チロシンキナーゼインヒビター(例えば、SU011248 - Rosenら, *Clinical Oncology* ; May 31-June 3, 2003, Chicago, IL, USA(要約765))；テモゾロミド；ネオバスタット^{T M}(Gingrasら, *Invest New Drugs.* 2004 Jan ; 22(1) : 17-26)；アンギオザイム(Angiozyme)^{T M}(Wengら, *Curr Oncol Rep.* 2001 Mar ; 3(2) : 141-6)；NK4(Matsumotoら, *Cancer Sci.* 2003 Apr ; 94(4) : 321-7)；マクロファージ遊走阻止因子(MIF)；シクロオキシゲナーゼ-2インヒビター；リスベラトロール(例えば、Salaら, *Drugs Exp Clin Res.* 2003 ; 29(5-6) : 263-9を参照)；PTK787/ZK2222584(例えば、Klem, *Clin Colorectal Cancer.* 2003 Nov ; 3(3) : 147-9、及びZipsら, *Anticancer Res.* 2003 Sep-Oct ; 23(5A) : 3869-76)；抗血管新生大豆イソフラボン(例えば、ゲニステイン - 例えばSarkar及びLi, *Cancer Invest.* 2003 ; 21(5) : 744-57を参照)；オルチプラズ(Oltipraz)；サリドマイド及びサリドマイド類似体(例えば、CC-5013 - 例えば, Tohnyら, *Clin Prostate Cancer.* 2004 Mar ; 2(4) : 241-3を参照)；他の内皮細胞インヒビター(例えば、スクアラミン及び2-メトキシエストラジオール)；フマギリン及びその類似体；ソマトスタチン類似体；ペントサンポリスルファート；テコガランナトリウム；マトリックス分解をブロックする分子(例えば、スラミン及びその類似体(例えば、Marchetti, *Int J Cancer.* 2003 Mar 20 ; 104(2) : 167-74, Meyersら, *J Surg Res.* 2000 Jun 15 ; 91(2) : 130-4, Kruger及びFigg, *Clin Cancer Res.* 2001 Jul ; 7(7) : 1867-72, 及びGradishar, *Oncology.* 2000 May ; 58(4) : 324-33)を参照)；ダルテパリン(Scheinowitzら, *Cardiovasc Drugs Ther.* 2002 Jul ; 16(4) : 303-9)；マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビター(例えばBMS-275291 - Rundhaug, *Clin Cancer Res.* 2003 Feb ; 9(2) : 551-4を参照；一般的にCoussensら *Science* 2002 ; 295 : 2387-2392を参照)；アンギオコール(angiocol)；抗PDGF mAbs及び他のPDGF(血小板由来増殖因子)インヒビター；及びPEDF(色素上皮由来増殖因子)が含まれる。

20

30

40

【0175】

他の側面では、本発明は、ホルモン調節剤、例えば抗アンドロゲン及び/又は抗エストロゲン治療剤又はレジメン(例えば、Trachtenberg, *Can J Urol.* 1997 Jun ; 4(2 Suppl 1) : 61-64 ; Ho, *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15 ; 91(3) : 491-503を参照)、タモキシフェン、プロゲステロン、黄体ホルモン放出ホルモン(又はその類似体又は他のLHRHアゴニスト)、又はアロマターゼインヒビター(例えば、Dreicerら, *Cancer Invest.* 1992 ; 10(1) : 27-41を参照)を用いた組合せ組成物及び組合せ投与方法が提供される。ステロイド類(多くの場合はデキサメタゾン)は、腫瘍増殖又は関連する浮腫(脳腫瘍)を阻害可能で、併

50

用に適切である。一又は複数の薬剤を、抗アンドロゲン、例えばフルタミンド(Flutamind e) /ユーレキシソ(Eulexin) ; プロゲステロン、例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン / プロベラ、酢酸メゲストロール / メガセ(Megace)等 ; 副腎皮質ステロイド、例えばヒドロコルチゾン、プレドニゾン等 ; 黄体形成ホルモン-放出ホルモン(LHRH)類似体、例えばブセレリン、ゴセレリン等 ; 及び / 又はホルモンインヒビター、例えばオクトレオチド / サンドスタチン等と組合せて又は同様に提供することができる。特定の側面では、薬剤は、エストロゲンレセプターモジュレータ(ERM)、例えばタモキシフェン、イドキシフェン(idoxifene)、フルベストラント、ドロロキシフェン(droloxifene)、トレミフェン、ラロキシフェン、ジエチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール / エスチニル(Estinyl)等、又はその任意のものの組合せである抗癌剤と組合せられる。組合せ組成物及び併用投与方法は、またもしくは別に、タモキシフェンを含有可能である。癌の免疫治療に関連する更なる技術は、例えばBercziら、「Combination Immunotherapy of Cancer」、NEUROIMMUNE BIOLOGY, Volume 1: New foundation of Biology, Berczi I, Gorczynski R, Editors, Elsevier, 2001 ; pp.417-432に提供されている。

10

【0176】

また本発明は、自己免疫疾患の治療のために、オーファンリガンドのリガンドに結合する薬剤と共同して、一又は複数の付加的な薬剤を組合せて投与することを含む。このような付加的な薬剤には、例えば自己免疫疾患の治療のために抗体又は他の薬剤が投与されている特定の治療目的に通常は有用な薬剤が含まれる。種々のサイトカインも、このような組合せアプローチに使用されうる。サイトカインの例には、IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、TGF-ベータ、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF-アルファ、TNF-ベータ、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、又はこれらの任意のサイトカインを阻害する化合物が含まれる。サイトカイン又はそれらのインヒビターは、臨床的症状、例えば患者の病状及びサイトカインの相対毒性と一致した、標準的な計画に従い投与される。

20

【0177】

腫瘍細胞又は形質転換細胞がこれまで未同定の細胞表面結合リガンドを発現しているあらゆる癌又は前癌状態は、本発明による治療に適している。例えば、未同定のリガンドを標的とする抗体は、宿主免疫反応を誘発し、又は細胞傷害剤を腫瘍細胞に送達させるために使用することができる。癌又は前癌状態とは、限定されるものではないが、肉腫、癌腫、メラノーマ、白血病、及びリンパ腫で、胸部、頭部及び頸部、卵巣、膀胱、肺、咽頭、喉頭、食道、胃、小腸、肝臓、脾臓、結腸、女性生殖器系、男性生殖器系、前立腺、腎臓、及び中枢神経系における細胞疾患を含んでよい任意の腫瘍性疾患でありうる。癌治療が考えられている抗体の種類には、例えばmAbが腫瘍細胞に結合し、それらの死を誘発させることを意図している癌の治療用のmAbの場合は、例えばIgG1アイソタイプの抗体が含まれる。このような抗体は、ADC又はCDCを介して、腫瘍細胞又は形質転換細胞に対する宿主免疫攻撃開始を促進可能である。例えば、NKp30L、NKp44L又はNKp46Lに対する抗体の場合、NKp30L、NKp44L又はNKp46Lを発現する腫瘍標的の除去を生じるため、好ましいmAbはIgG1アイソタイプである。

30

40

【0178】

感染細胞がこれまで未同定の細胞表面結合リガンドを発現しているあらゆるウイルス感染が、本発明による治療に適している。例えば、未同定のリガンドを標的とする抗体は、感染した細胞に対して、宿主免疫反応を誘発し、又はそこに細胞傷害剤を送達させるために使用することができる。このようなウイルス感染生物には、限定されるものではないが、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、1型単純ヘルペス(HSV-1)、2型単純ヘルペス(HSV-2)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイ

50

ルス、ロタウイルス、RSウイルス、パピローマウイルス、パピローマウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルポウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、及びヒト免疫不全ウイルス1型又は2型(HIV-1、HIV-2)が含まれる。

【0179】

幾つかの活性化NKレセプター、例えばNKGD2は、自己免疫疾患のプロパゲータであると見なされている。それらのリガンドは、炎症組織で高レベルで発現しており、よってNK細胞刺激の原因となっている。そのようなリガンドに結合し、よってそのような活性化レセプターの結合をブロックする抗体は、炎症の徴候及び症状を低減させる。このような場合、ブロックする非枯渇mAb、例えばIgG4又はIgG2が好ましい。これまでに未同定の細胞表面結合リガンドが疾患のメカニズムに關与している自己免疫疾患、すなわち宿主組織に対する宿主免疫応答の生成に關与する疾患又は病状は、本発明の治療に適している。例えば、NK細胞活性化レセプターの、宿主細胞上で発現している標的リガンドへの結合をブロックする抗体は、宿主細胞のNK細胞媒介性死滅を低減又は防止することができる。炎症性疾患を治療する抗体は、IgG4又はIgG2アイソタイプ(目的が、標的抗原を担持する細胞の除去を引き起こさないブロックするmAbにある場合)、又はIgG1(目的が抗原担持細胞を除去することにある場合)とすることができる。例示的な自己免疫疾患には、限定されるものではないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレープス病、ギラン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インシュリン依存性糖尿病、若年性関節炎、扁平苔癬、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発筋炎、皮膚筋炎、原発性ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ(RA)、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性エリテマトーデス(SLE)、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症が含まれる。

この発明のさらなる側面及び利点は、以下の実験セクションに開示されており、これは例証するものであって、この出願の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0180】

実施例1: solNKp30-FTL-Fcコンストラクトの調製

この実施例は、完全長NKp30配列(配列番号1)の残基20から149を含む融合タンパク質の調製について記載する。該コンストラクトのNKp30部分は、レセプターの細胞外断片に相当する、配列番号1の残基20-138;可動性膜貫通(FTL)領域を提供する、隣接膜貫通領域の残基139-149、並びにNKp30断片とFcドメインの間のアラニン(A)リンカーを含む。アラニンはクローニング法によって導入される。しかしながら、グリシン又は他の「無害な」小アミノ酸は、スペーサーとしても働くことができる。

【0181】

簡潔に述べると、cDNA合成のための全RNAテンプレートを、RNAイーザー・ミニ・キット(RNAeasy Mini Kit)(Qiagen#74104)及びデオキシリボヌクレアーゼI(Sigma#AMP-D1)のオンカラム消化を用いて、健常なドナーの末梢血単核球(PBMC)から精製した。BgIII又はNheIの何れかに対する人工制限部位を含むNKp30特異的プライマーを使用し、逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により、(リーダー配列を欠く)NKp30の成熟型をコードするNKp30cDNAを作製した。このために、本

10

20

30

40

50

質的に製造者のプロトコルに従って、ワンステップRT-PCRキット(OneStep RT-PCR kit)(Qiagen#210210))を使用した。調製したNKp30cDNAをBgIII及びNheIで処理し、ヒトIgG1のFc部分に対するゲノム配列とCD5リーダー配列をコードする配列の間でインフレームで、BamHI及びNheIで切断された記載の哺乳動物発現ベクターに連結した。選択マーカーとしてアンピシリン(ampicilin)を用いたTop10/P3化学的コンピテント細胞(Chemically Competent Cells)(Invitrogen #C5050-03)中においてライゲーション産物を増幅させた。プラスミド挿入物のヌクレオチド配列を、終結サイクリングシーケンシング(MWG, Ebersberg, Germany)により実証した。

【0182】

solNKp30-Fcタンパク質は、solNKp30-FcをコードするプラスミドDNAの一過性形質移入後に無血清培養されたCOS-7細胞中において産生させた。形質移入4日後、solNKp30-Fcを、プロテインAアガロースカラムを使用する、アフィニティークロマトグラフィーにより、組織培養培地から精製した。solNKp30-Fcを、50mMのNa-シトレートを用いてカラムから溶出させ、続いてPBSで透析した。hFc-タンパク質の純度を、ウエスタンブロットと、SDS-PAGE後のクーマシーブルー染色の双方により評価した。アミノ酸配列の完全性を、MALDI-MS、MALDI-MS/MSを用いて、抗hNKp30mAb(R&D Systems(カタログ番号#MAB1849)のクローン45)に対する特異的結合性をELISAで評価した。製造者のプロトコルに従い、DTT除去のために脱塩カラム(キットで提供された)を使用し、フィコリンクAPCコンジュゲーションキット(Phycolink APC Conjugation Kit)(Prozyme#PJ25K)を用いて、solNKp30-Fcをアロフィコシアニン(APC)にコンジュゲートさせ、精製の終わりにPBSで2回透析した。

【0183】

最終的なsolNKp30-FTL-hFcタンパク質のアミノ酸配列を図2(配列番号4)に示す。同様の方法により、NKp30の可溶性変異体を作製し、そこでは、ヒトIgG1FcをマウスIgG1Fc(配列番号5)と置換し；ロイシン残基がsolNKp30-FTL-mFc(配列番号6)のN末端に付加され；FTL配列はsolNKp30-mFc融合タンパク質(配列番号7)に含めず；あるいはロイシン残基が、FTL配列を含まないsolNKp30-mFc融合タンパク質(配列番号8)に付加された。これらのタンパク質は上述のものと同じ方法により作製した。

【0184】

実施例2：solNKp30を使用するNKp30L発現細胞の同定

この実施例は、NKp30Lを発現する細胞を同定するために、solNKp30-FTL-hFcを使用する細胞結合実験について記述する。

簡潔に述べると、NKp30L発現細胞株を、solNKp30-FTL-hFcに結合するそれらの能力により、フローサイトメトリー(FACS)により同定した。氷上で30分、2%のFCSを含む組織培養培地中において、固定量の蛍光標識solNKp30-FTL-hFc(例えば、 $10^{-2} \sim 10^2 \mu\text{g/ml}$ の範囲のAPC-solNKp30-FTL-hFc)と共に、様々な腫瘍細胞株をインキュベートした。細胞を洗浄し、細胞に対するsolNKp30-FTL-hFcの結合性を、フローサイトメトリーにより分析した。あるいは、腫瘍細胞を、蛍光標識されていないsolNKp30-FTL-hFcと共にインキュベートし、洗浄し、ヒトIgGFcに対して特異的な蛍光標識二次抗体と共にインキュベートし、洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。双方のアッセイにおいて、細胞に結合するsolNKp30-FTL-hFcを、二次抗体単独で、又は無関係な蛍光標識されたFc-融合タンパク質(当該の腫瘍細胞に結合しない)の何れかの結合性と比較し、個々の細胞に結合する平均蛍光度を分析することにより測定した。NKp30Lに対するsolNKp30-FTL-hFcの結合特異性を確認するために、同様のアッセイを、R&Dシステムズからの抗NKp30mAb(カタログ番号210845)を含む、NKp30に結合させることにより、NKp30を阻害することが知られているモル過剰の抗体と共にプレインキュベートされたsolNKp30-FTL-hFcを用いて

実施した。s o l N K p 3 0 - h F c に結合可能で、N K p 3 0 を阻害することが知られている抗体と競合可能な細胞はN K p 3 0 L 発現細胞と命名した。N K p 3 0 L -陽性と同定された細胞株を、K 5 6 2 と呼ばれるヒト赤白血病細胞株を含んでいた。K 5 6 2 は、元来は慢性骨髄性白血病を患っている患者から得られる、N K 媒介性死滅に敏感な赤白血病細胞株である。

図3に示すように、s o l N K p 3 0 - F T L - h F c は、K 5 6 2 細胞に対する特異的結合性を示した。また、s o l N K p 3 0 - F T L - F c タンパク質は、D a u d i、H E K 2 9 3 a、T H P - 1、C H O - 1、H e L a 及びC O S - 7 を含む更なる細胞株に結合した。

【0185】

実施例3：異なったs o l N K p 3 0 - F c コンストラクトの比較細胞結合

この実施例は、s o l N K p 3 0 - F T L - F c 及び商業的に入手可能な1849-NK コンストラクトの細胞結合能力を比較するために設計された実験について記述する。図6に示すように、1849-NK コンストラクトは、s o l N K p 3 0 - F T L - F c には不在のN末端ロイシンを有し、ヒトI g G 1 F c とN K p 3 0 の細胞外部分の間に異なった配列を有し；この領域において、1849-NKはFTLを欠いているが、代わりに異なった短いリンカー配列を含んでいる。

簡潔に述べると、s o l N K p 3 0 - F T L - F c 又は1849-NKタンパク質(20 µg/ml)を、氷上で45分、K 5 6 2 細胞と共にインキュベートした。細胞を洗浄し、氷上で30分、A P C -コンジュゲートF a b ' 2 ロバ抗ヒトF c (Jackson Immunoresearch h Cat#: 709-136-149)の1:50希釈液と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。

図4に示すように、1849-NK(図4Bのx軸)よりも更に強い蛍光(図4Aのx軸)であり、これは、1849-NKと比較して、s o l N K p 3 0 - F T L - F c による結合強度が改善されていることを表しているため、s o l N K p 3 0 - F T L - F c は1849-NKよりも改善された結合特性を有していると言える。

【0186】

実施例4：抗N K p 3 0 m A b と s o l N K p 3 0 - F T L - F c の競合

この実施例は、s o l N K p 3 0 - F T L - F c と抗N K p 3 0 m A b との間の細胞結合性競合実験について記述する。

簡潔に述べると、s o l N K p 3 0 - F c を、細胞懸濁液に添加する前に30分、R P M I 1 6 4 0、2%のF C S 中において、抗N K p 3 0 抗体c l 4 5 (R&D Systems)と共にインキュベートした。結合したs o l N K p 3 0 - F c の間接的免疫染色に使用された、A P C コンジュゲートロバ抗ヒトF c F a b 2 断片(Jacksons #709-136-149)を、45分後、またダルベッコリン酸塩緩衝生理食塩水(D - P B S)で1回洗浄した後に添加した。15分のインキュベーションとダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(D - P B S)での3回の洗浄後、細胞の蛍光強度をF A C S C A N T O (B D)で測定した。

図5に示すように、s o l N K p 3 0 - F T L - F c コンストラクトの結合性は、抗N K p 3 0 (c l 4 5) m A b の量を増加させると低減した(90、180及び450 µg/ml、それぞれ図5C、5D及び5E)。

【0187】

実施例5：N K p 3 0 - m F c (c) の産生

s o l N K p 3 0 - m F c (c) と命名された、より伝統的に設計されたN K p 3 0 - l g 融合タンパク質を、s o l N K p 3 0 - F T L - m F c への結合性を比較するために作製した。s o l N K p 3 0 - m F c (c) コンストラクトを、L W V (L e u - T r p - V a l -) で出発するN末端を有するが、F T L (配列番号8)を含まないように設計した。次のようにしてタンパク質を作製した：

【0188】

挿入配列をポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により増幅させた。要するに、5 ng の精製N K p 3 0 - h F c (A) プラスミドテンプレートを、0.6 µg の前方プライマーと混合

10

20

30

40

50

した

5'CACTGCAGCTAGCACTCTGGGTGTCCAGCCCCCTGAGATTC3' (配列番号 16)

(DNA 技術)、0.6 μM の逆プライマー

5'CCAGCAAGATCTGCATCCATCGGCCCTTCGATTGTACCAGCCCCCTAGCTGAGG3' (配列番号 17)

(DNA 技術) 及び Taq DNA ポリメラーゼ (BioLine #B10-21040) 並びに Taq DNA ポリメラーゼ バッファーで、製造者のプロトコルに従ったもの。PCR サーマサイクリング条件は 30 サイクルからなり、96 °C での変性に 15 秒、50 °C でのアニーリングに 30 秒、72 °C での DNA スtrand 伸長に 30 秒付与された。405 bp の予想単位複製配列が、アガロースゲル電気泳動により単離され、Spe I (NEB #R0133S) 及び Bgl II (NEB #R0144S) 制限エンドヌクレアーゼで消化された。370 bp の消化された断片をアガロースゲル電気泳動により単離し、solNKp30-FTL-mFc の発現に使用される同じプラスミドに連結させた。精製されたプラスミドは、solNKp30-FTL-hFc 及び -mFc について記載されたように、COS-7 細胞中に発現した。

10

20

30

40

50

【0189】

2つのNKp30-Fc 融合タンパク質のK562細胞に対する結合性を、フローサイトメトリーにより比較し(図7)、solNKp30-FTL-mFcの結合性が、solNKp30-mFc(c)コンストラクトよりも有意に良好であることが明らかになった。solNKp30-hFc(ALW)及びsolNKp30-mFc(ALW)を命名された他のNKp30-Fc変異体のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号9及び10に記載する。これらのコンストラクトにおいて、成熟タンパク質のN末端はアミノ酸ALWから出発している。K562細胞に対するそれぞれの結合性を、フローサイトメトリーにより、solNKp30-FTL-mFc及びsolNKp30-mFc(c)のものと比較したところ、solNKp30-mFc(c)と同程度の強度であるが、solNKp30-FTL-mFcよりは弱い強度で結合することが見出された。

【0190】

実施例6: ITACSによるNKp30Lに対して特異的なmAbsのITACSベースの同定

免疫及びハイブリドーマの産生

NKp30リガンドに対する抗体の産生のために、NKp30L陽性細胞(実施例2に記載したようにして同定されたか、又はこのような細胞の膜調製物を用いる)を用いて、マウスを免疫した。主として、K562細胞を使用した。幾つかの最初の実験には、HEK293及びLC721.221も含んでいた。マウスのRBF株を、 2×10^6 細胞又は20 μgの膜抽出物を用い、隔週で腹腔内的に免疫した。膜抽出物を用いた免疫をフロイント完全アジュバントを用いて実施したが、全細胞はPBS単独で注射された。一般的に、マウスは全体で3回免疫され、最後の免疫の10日後、マウスは眼内出血を起こし、NKp30L陽性細胞に対する抗体について血清を分析した。

【0191】

モノクローナル抗体の産生に対して選択されたマウスを、PBS中の10 μgの膜抽出物で追加免疫したが、細胞で免疫されたマウスは通常はmAb産生の前に追加免疫されない。追加免疫の3日後、脾臓を回収し、ハイブリドーマ作製に使用した。脾臓細胞を、標準的なPEG(Harlow及びLane: Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999)又は電気融合技術により、FOX-NYミエローマ細胞(Taggart and Samloff, Science 1983;219:1228-30)に融合させた。産生されたハイブリドーマ細胞を、96ウェル組織培養プレートに播種し、以下に記載するようにして、上清をスクリーニングして、NKp30Lに対する抗体の存在を調べた。選択されたクローンを、安定したハイブリドーマ細胞株を確立するためのサブクローニング及びスクリーニングのさらなるラウンドにかける。

【0192】

ITACSスクリーン

NKp30Lに結合した抗体を、フローサイトメトリー(FACSアレイ、Beckton Dic

kinson)又はF m a t (Applied Biosystems)で同定した。何れの場合も、スクリーニングアッセイは、s o l N K p 3 0 - F T L - h F c の、N K p 3 0 L 発現腫瘍細胞株(例えばK 5 6 2)への結合を防止する能力について抗体をスクリーニングする競合アッセイである。このため、ハイブリドーマ(上述したようにして産生)の組織培養上清を、9 6 -ウェルプレートにおいて、氷上で3 0分、固定量のN K p 3 0 L 発現腫瘍細胞(例えば、1 0⁴のK 5 6 2細胞)と共にインキュベートした。その後、固定量の蛍光標識s o l N K p 3 0 - h F c を各ウェル(0 . 1 μ g / m l のA P C -コンジュゲートs o l N K p 3 0 - F T L - h F c)に添加し、ついで、氷上で更に3 0分インキュベートした。インキュベート後、細胞を洗浄し、未結合のタンパク質を除去し、フローサイトメトリー又はF m a t で分析した。双方のアッセイにおいて、細胞に結合するs o l N K p 3 0 - F T L - h F c を、個々の細胞の平均蛍光度を分析することにより測定した。ハイブリドーマ上清とプレインキュベートされていない腫瘍細胞への、s o l N K p 3 0 - h F c の結合性と比較して、腫瘍細胞へのs o l N K p 3 0 - F T L - h F c の結合性が低減又は防止されている場合は、抗体は、N K p 3 0 L 結合抗体であると考えた。図8に、2つの抗N K p 3 0 L m A b の同定に至らしめるそのようなスクリーニングの代表的な結果を示す。ついで、N K p 3 0 L の性質及び同定は、これらの抗体により認識される抗原(群)を特徴付けすることにより決定することができる。

10

【0193】

例示的特徴

1 . オーフアンN K 細胞レセプターオーファンリガンドであるオーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、

20

(a) オーフアンリガンドが結合する標的細胞の第一調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；

(b) 脊椎動物の脾臓の抗体産生細胞から少なくとも一の被験抗体を調製し；

(c) 標的細胞の第二調製物への結合についてオーファンリガンドと競合する被験抗体を、オーファンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体として選択することを含む方法。

2 . 選択が、

オーファンリガンドの可溶性部分を含む参照薬剤の存在下及び不在下において、標的細胞の第二調製物に対する被験抗体の結合性を比較し、

30

結合性が、参照薬剤の不在下より参照薬剤の存在下での方が低い被験抗体を同定することを含む第1項の方法。

3 . 選択が、

被験抗体の存在下及び不在下において、標的細胞の第二調製物に対するオーファンリガンドの可溶性部分を含む参照薬剤の結合性を比較し、

結合性が、抗体の不在下より抗体の存在下での方が低い被験抗体を同定することを含む第1項の方法。

4 . 参照薬剤が、完全長オーファンレセプター、オーファンリガンドの細胞外断片、又はオーファンリガンドの可溶性部分を含む融合又はハイブリッドタンパク質である第2項又は第3項の方法。

40

5 . 融合又はハイブリッドタンパク質が、場合によってはリンカーを介して、抗体F c ドメインに共有結合するオーファンリガンドの可溶性部分を含む第4項の方法。

6 . 融合又はハイブリッドタンパク質が、オーファンリガンドの膜貫通部分の少なくとも一のアミノ酸残基を更に含有する第5項の方法。

7 . 参照薬剤が、細胞膜又は固体担体に付着した完全長オーファンリガンドである第2項又は第3項の方法。

8 . 参照薬剤が、固体担体に付着したオーファンリガンドの可溶性部分である第2項又は第3項の方法。

9 . 少なくとも一の参照薬剤と抗体が、検出可能な部分で標識されている第2項から第8項の方法。

50

- 10 . 検出可能な部分が、蛍光性、発光性又は放射性化合物である第9項の方法。
- 11 . 抗体産生細胞がB細胞である第1項から第10項の何れかの方法。
- 12 . 抗体産生細胞がハイブリドーマ細胞である第1項から第11項の何れかの方法。
- 13 . 標的細胞の第一及び第二調製物が、無傷細胞及び細胞膜から別々に選択される第1項から第12項の何れかの方法。
- 14 . 標的細胞の第一及び第二調製物が同じ細胞株からのものである第1項から第13項の何れかの方法。
- 15 . 脊椎動物がマウス又はラットである第1項から第14項の何れかの方法。
- 16 . オーフアンリガンドがNK細胞活性化レセプターである第1項から第15項の何れかの方法。 10
- 17 . NK細胞活性化レセプターが、NK p 30、NK p 44、NK p 46、NK p 80、又はCD69である第16項の方法。
- 18 . NK細胞活性化レセプターがNK p 30である第17項の方法。
- 19 . (c)において選択される抗体が、細胞表面結合リガンドへのオーフアンリガンドの結合をブロックする第1項から第18項の何れかの方法。
- 20 . オーフアンリガンドへの細胞表面結合標的リガンドの結合をブロックする抗体又は抗体断片を同定する方法であって、先の項の何れかの方法に従い抗体を同定し、用量依存の様式で、オーフアンリガンドへの細胞表面結合標的リガンド間の結合を低減する抗体を選択することを含む方法。
- 21 . (a)第1 - 20項の何れかの方法に従い抗体を同定し、 20
(b)抗体産生細胞から抗体を産生する、
工程を含む、オーフアンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体の産生方法。
- 22 . (a)第1 - 20項の何れかの方法に従い抗体を同定し；
(b)抗体をコードする核酸を調製し；
(c)核酸を用いて宿主細胞を形質転換させ；
(d)核酸が発現し抗体が産生されるように、前記宿主細胞を培養する
工程を含む、オーフアンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を産生する方法。
- 23 . 宿主細胞培養体から抗体を回収することを更に含む第22項の方法。 30
- 24 . 第二のリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、
(a)第二のリガンドが結合する標的細胞の第一調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；
(b)脊椎動物の脾臓の抗体産生細胞から被験抗体を調製し；
(c)標的細胞の第二調製物への結合について第二のリガンドと競合する抗体を、第二のリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体として選択することを含む方法。
- 25 . 第二のリガンドがCD83である第24項の方法。
- 26 . オーフアンリガンドの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体又は抗体断片を同定する方法であって、 40
(a)オーフアンリガンドが結合する標的細胞の調製物を提供し；
(b)標的細胞の調製物への結合についてオーフアンリガンドと競合する抗体について、被験抗体又は抗体断片のライブラリーをスクリーニングし；
(c)オーフアンリガンドと競合する抗体又は抗体断片を選択することを含む方法。
- 27 . ライブラリーがファージ-ディスプレイライブラリーである第21項の方法。
- 28 . NK p 30、NK p 44、及びNK p 46から選択されるNK細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、
(a)NK細胞レセプターが結合する細胞株を提供し； 50

(b) 細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；
 (c) 少なくとも一の脊椎動物の脾臓から B 細胞を単離し；
 (d) 単離された B 細胞からハイブリドーマを調製し；
 (e) 抗体 F c ドメイン及び NK 細胞レセプターの可溶性部分を含む融合タンパク質の (i) 存在下及び (i i) 不在下において、細胞株の細胞に対する各ハイブリドーマからの抗体の結合性を評価し；
 (f) (i) における結合性が (i i) における結合性よりも低い抗体を選択することを含む方法。

29. NK p 30、NK p 44、及び NK p 46 から選択される NK 細胞レセプターの細胞表面結合標的リガンドに結合する抗体を同定する方法であって、

(a) NK 細胞レセプターが結合する細胞株を提供し；
 (b) 細胞株の細胞又は細胞膜の調製物で少なくとも一の脊椎動物を免疫し；
 (c) 少なくとも一の脊椎動物の脾臓から B 細胞を単離し；
 (d) 単離された B 細胞からハイブリドーマを調製し；
 (e) 各ハイブリドーマからの抗体の (i) 存在下及び (i i) 不在下において、各細胞株の細胞への抗体 F c ドメイン及び NK 細胞レセプターの可溶性部分を含む融合タンパク質の結合性を評価し；

(f) (i) における結合性が (i i) における結合性よりも低いハイブリドーマからの抗体を選択することを含む方法。

30. NK 細胞レセプターが NK p 30 である、条項 28 及び 29 の何れかの方法。

31. 融合タンパク質が配列番号 4、5 及び 6 の任意の配列を含有する、条項 30 の方法。

32. NK p 30 L に結合する薬剤を同定する方法であって、

(a) 複数の被験薬剤を提供し；
 (b) NK p 30 の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含む可溶性 NK p 30 - F c 融合タンパク質の (i) 存在下及び (i i) 不在下における、NK p 30 L を発現する細胞株への各被験薬剤の結合性を評価し；
 (c) (i) における結合性が (i i) における結合性より低い被験薬剤を選択することを含む方法。

33. NK p 30 L に結合する薬剤を同定する方法であって、

(a) 複数の被験薬剤を提供し；
 (b) 各被験薬剤の存在下における、NK p 30 L を発現する細胞株への NK p 30 の膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含む可溶性 NK p 30 - F c 融合タンパク質の結合性を評価し；
 (c) 被験薬剤の存在下における結合性が被験薬剤の不在下における結合性より低い被験薬剤を選択することを含む方法。

34. 第 1 項から第 33 項の何れかの方法に従い同定された抗体、抗体断片又は薬剤。

35. 第 34 項の抗体の断片又は誘導体。

36. NK 細胞レセプターの膜貫通領域からの少なくとも一のアミノ酸残基を含むリンカーを介して抗体 F c ドメインに共有結合する NK p 30、NK p 44 及び NK p 46 から選択される NK 細胞レセプターの可溶性リガンド結合断片を含む融合タンパク質。

37. NK 細胞レセプターが NK p 30 であり、融合タンパク質が配列番号 1 の少なくともアミノ酸残基 20 - 138 を含む第 36 項の融合タンパク質。

38. リンカーが、配列番号 1 の少なくともアミノ酸残基 140 - 141 を含む第 36 項又は第 37 項の何れかの融合タンパク質。

39. 可溶性リガンド結合断片の C 末端残基が、配列番号 1 の 141、142、143、144、145、146、147、148 及び 149 から選択される残基に相当する第 36 項から第 38 項の何れかの融合タンパク質。

10

20

30

40

50

40．可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号1の残基149に相当する第36-39項の何れかの融合タンパク質。

41．可溶性リガンド結合断片のN末端残基が、配列番号1の残基20に相当する第36-40項の何れかの融合タンパク質。

42．可溶性リガンド結合断片のN末端残基が、配列番号1の残基20に相当し、可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号1の残基149に相当する第36-41項の何れかの融合タンパク質。

43．配列番号4及び5の何れかを含む第37項の融合タンパク質。

44．配列番号4及び5の何れかからなる第37項の融合タンパク質。

45．NK細胞レセプターがNKp44であり、融合タンパク質が配列番号2の少なくともアミノ酸残基193-195を含む第36項の融合タンパク質。

46．可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号2の195、196、197、198、199、200、201、202又は203から選択される残基に相当する第45項の融合タンパク質。

47．NK細胞レセプターがNKp46であり、融合タンパク質が配列番号3の少なくともアミノ酸残基256-258を含む第36項の融合タンパク質。

48．可溶性リガンド結合断片のC末端残基が、配列番号3の258、259、260、261、262、263、264、265及び266から選択される残基に相当する第47項の融合タンパク質。

49．細胞のNK細胞媒介性死滅を阻害する方法であって、第34-35項の何れかの抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は第36-49項の何れかの融合タンパク質を、細胞表面結合リガンドを発現する細胞と、接触させることを含む方法。

50．癌又はウイルス性疾患を治療する方法であって、第34-35項の何れかの抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は第36-49項の何れかの融合タンパク質の有効量を患者に投与することを含み、抗体、抗体断片、抗体誘導体又は融合タンパク質が、細胞傷害性部分にコンジュゲートしているか、又はADCC又はCDC反応を誘因可能である方法。

51．細胞傷害性部分が毒素又は放射性化合物である第50項の方法。

52．自己免疫疾患を治療する方法であって、第34-35項の何れかの抗体、抗体断片、抗体誘導体又は薬剤、又は第36-49項の何れかの融合タンパク質の有効量を患者に投与することを含む方法。

【0194】

ここに引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての文献は、各文献が、個々にかつ特に出典明示により援用され、その全体がここに記載されているかの如く、同程度に出典明示によりここに援用される。

全ての表題及び副題は、ここでは便宜的にのみ使用されており、決して本発明を限定するものとは解釈されてはいけない。

全ての可能なその変形態様における上述の要素のあらゆる組合せが、別の定義がここに示され、又は前後関係から明らかに矛盾していない限り、本発明に含まれる。

【0195】

本発明を記述する文脈で使用される「a」及び「an」及び「the」なる用語及び類似指示対象は、別の定義がここに示されるか又は前後関係から明らかに矛盾していない限り、単数形と複数形の双方をカバーすると解釈される。

ここでの値の範囲の記載は、ここで他の定義が示されない限りは、その範囲に入るそれぞれ別個の値に個々に言及することの省略法であることを単に意図しており、それぞれ別個の値は、ここで個々に記載されているかの如く明細書中に導入される。別の定義が提示されないならば、ここに提供される全ての正確な値は、対応する近似値を代表する(例えば、特定の因子又は測定に対して提供される全ての正確な例示的値は、適切な場合、「約」により修飾される対応する近似測定値をまた提供すると考えることができる)。

ここで記載される全ての方法は、別の定義がここに示されるか又は前後関係から明らか

10

20

30

40

50

に矛盾していない限り、任意の適切な順序で実施することができる。

【0196】

ここで提供される任意のかつ全ての例、又は例示的言語(例えば、「等」)は、単に、本発明をより説明することを意図したもので、別の定義が示されない限り、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。明細書中の如何なる言葉も、はっきりと言及されない限りは、任意の成分が本発明の実施に必須であることを示していると解釈すべきではない。

ここでの特許文献の引用及び援用は便宜上のものであって、このような特許文献の正当性、特許性及び/又は権利行使性についての見解を反映するものではない。

【0197】

別の定義が記載されるか又は前後関係から明らかに矛盾していない限り、要素又は要素類に関して、「含有する」、「有する」、「含む」又は「含んでいる」等の用語を使用する、本発明の任意の側面又は実施態様のここでの記載は、その特定の要素又は要素類「からなる」、「本質的になる」、又は「実質的に含む」本発明の類似した側面又は実施態様に対してサポートを提供することを意図したものである(例えば、特定の要素を含むものここに記載された組成物は、別の定義が記載されるか又は前後関係から明らかに矛盾していない限り、その要素からなる組成物をまた記述しているものと理解されなければならない)。

この発明は、適用される法律により許容される最大範囲まで、ここに提示された側面又は請求項に記載された主題事項の全ての修正物及び均等物を含む。

【図面の簡単な説明】

【0198】

【図1】図1は、例示的な競合的スクリーニングによる治療用抗体の同定(I T A C S)手順の概要を表す。

【図2】図2は、ヒトIgG1のFcドメインに結合した可動性膜貫通誘導リンカー(F T L)を含む新規の可溶性NKp30-Fc融合タンパク質を表す(配列番号4)。以後、融合タンパク質を、一般的にはsolNKp30-F T L-Fc、あるいは特定的にはsolNKp30-F T L-h Fc(配列番号4)又はsolNKp30-F T L-m Fc(配列番号5)と称し、Fc部分がヒト(h)又はマウス(m)由来である融合タンパク質を示す。また陰影を付けた配列は、付加的なアラニン(A)残基をまた含むNKp30-部分を示す。

【図3】図3は、solNKp30-F T L-FcのK562細胞への結合性に関するF A C Sデータを示す。(A)solNKp30-F T L-h Fcの不在下における、K562細胞への二次A P Cコンジュゲートロバ抗ヒトFc A bのバックグラウンド結合。(B)二次A P Cコンジュゲートロバ抗ヒトFcにより検出された、K562細胞に対するsolNKp30-F T L-h Fc(15 µg/ml)の結合性。

【図4】図4は、K562細胞への結合性における、R & Dシステムズ・インクから商業的に入手可能なsolNKp30-Fcタンパク質(カタログ番号1849-NK)とsolNKp30-F T L-FcとのF A C S比較を表し、K562細胞に対するsolNKp30-F T L-Fcの染色強度が改善され、結合強度の増加を反映していることが示されている。(A)K562細胞へのsolNKp30-F T L-h Fcの結合性。(B)K562細胞への1849-NKの結合性。A及びBの双方において、同一量の可溶性NKp30タンパク質を細胞に添加し、二次A P Cコンジュゲートロバ抗ヒトFcにより結合性を明らかにした。

【図5】図5は、solNKp30-F T L-Fcと抗ヒトNKp30m A b c145(R & Dシステムズ)との間の競合F A C S実験を表し、c145が、K562細胞への結合からsolNKp30-F T L-Fcを阻害していることを示している。(A)二次A P Cコンジュゲートロバ抗ヒトFcにより検出されたsolNKp30-F T L-h Fc(15 µg/ml)での染色;(B)45 µg/mlのc145の存在下におけるsolNKp30-F T L-h Fcでの染色。(C)90 µg/mlのc145の存在下におけるsolNKp30-F T L-h Fcでの染色。(D)180 µg/mlのc145の存在下におけるsolNKp30-F T L-h Fcでの染色。solNKp30-F T L-h Fcの結合は無関係な

10

20

30

40

50

コントロール mAb s とは競合しなかった。

【図6】図6は、国際公開第2004/053054号に記載された s o l N K p 3 0 - F c コンストラクト(下部、配列番号12)と、商業的に入手可能な s o l N K p 3 0 - F c コンストラクト 1 8 4 9 - N K 8 の N K p 3 0 部分(中央、配列番号11)を有する s o l N K p 3 0 - F T L - h F c (上部、配列番号4)のアミノ酸配列アラインメントを表す。 s o l N K p 3 0 - F T L - h F c 融合タンパク質の「W」残基((図中のアミノ酸番号で残基2))は、完全長 N K p 3 0 (配列番号1)の残基20に相当する。

【図7】図7は、K562細胞への s o l N K p 3 0 - F T L - m F c 及び N K p 3 0 - m F c (c)の結合の比較を示す。塗り潰したヒストグラム：I g G 1 コントロール m A b、破線： s o l N K p 3 0 - m F c (c)、実線： s o l N K p 3 0 - F T L - m F c ; 全て 2 0 μ g / m l 。

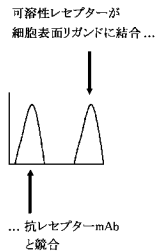
10

【図8】図8は、抗 N K p 3 0 L m A b を同定する、N K p 3 0 L に対する m A b s についての I T A C S スクリーニングの結果を示す。K562細胞を、K562細胞と続く s o l N K p 3 0 - F T L - h F c で免疫したマウスから作製されたハイブリドーマの上清と共に又はそれを伴わず、インキュベートした。後者の結合性を二次 A P C コンジュゲートロバ抗ヒト F c A b を使用して検出した。(A) A P C コンジュゲートロバ抗ヒト F c により検出される、ハイブリドーマ上清の不在下における K 5 6 2 細胞への s o l N K p 3 0 - F T L - h F c の結合性。(B) 陰性クローンと命名されたハイブリドーマ上清の存在下における K 5 6 2 細胞への s o l N K p 3 0 - F T L - h F c の結合性(パネルAでの染色と比較して、ハイブリドーマ上清により、 s o l N K p 3 0 - F T L - h F c の結合性が低減していないため)。(C) 陽性クローンと命名されたハイブリドーマ上清の存在下における K 5 6 2 細胞への s o l N K p 3 0 - F T L - h F c の結合性(このハイブリドーマ上清が s o l N K p 3 0 - F T L - h F c タンパク質の結合性を低減させたため)。

20

【図1】

工程1(任意):
リガンドを発現する標的細胞を同定するための細胞結合アッセイ



工程2:
標的細胞又は細胞膜を使用して免疫

工程3:
抗体分泌細胞を調製

工程4:
標的細胞への結合について可溶性レセプターと競合する抗体をスクリーニング

【図2】

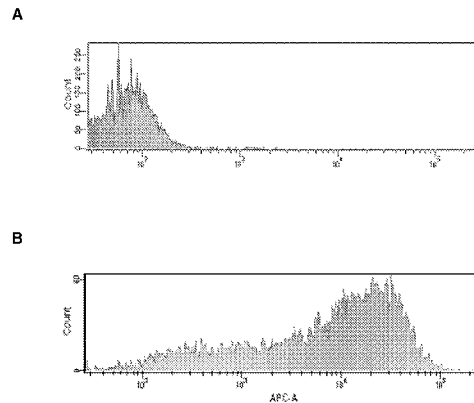
SoINkP30-FTL-hFc

```

1  WWSQPPPIRT  LEGSRFLPC  SFNASQGRLA  IGSVTFRDE  VVFGKEVRNG
51  TPEFRGLRPL  LASSRFLEDH  QAELEIRDVR  GHDAEIVVOR  NEVLGLGVGT
101  GNGTRLUVEK  EHPDLGAGLY  LLRAGFYAV  ADPEEPKSCD  KTHTCPPCPA
151  PELLGGPSVF  LPPPKRDTL  MISRTFEVTC  VVVVDSHEDP  EVRFNHWYDG
201  VEVHNAKTKF  REECYNSTYR  VVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKC  KVSNKALPAP
251  IEKTISKAKG  QPREPOVYLL  PFSRDELTKN  QVSLTCLVKG  FYPSDIAVEW
301  ESNGOPENNY  KTIPTVLDSD  GSFFLYSKLT  VDKSRWQGGJ  VFSQCSVMHEA
351  LENHYTKSL  SLSPCK

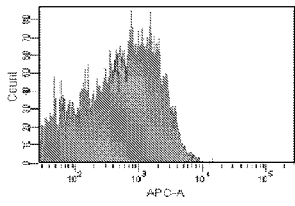
```

【図3】

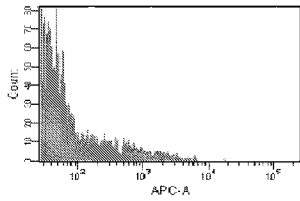


【 図 4 】

A

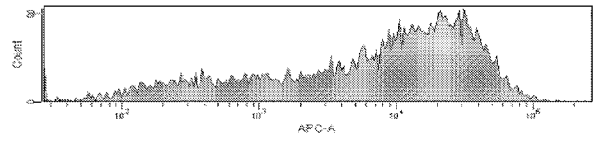


B

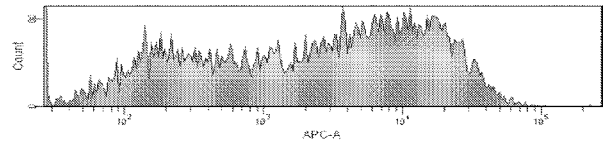


【 図 5 】

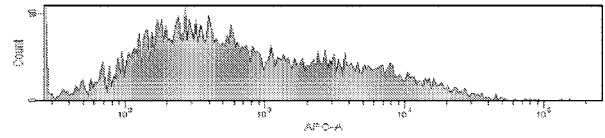
A



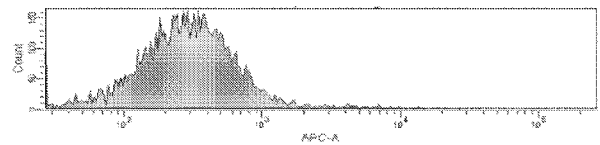
B



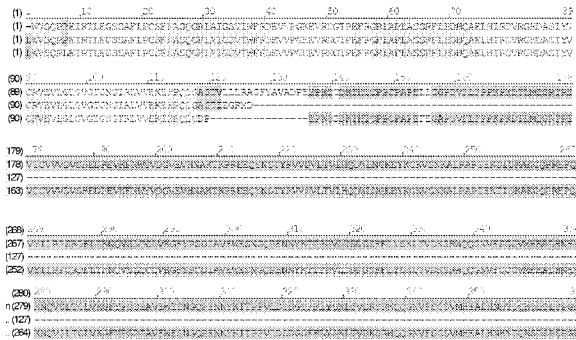
C



D

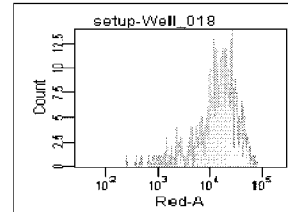


【 図 6 】

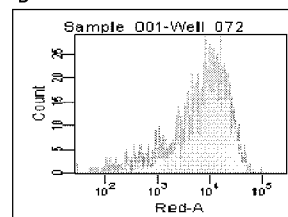


【 図 8 】

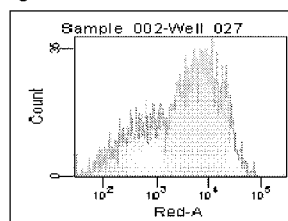
A



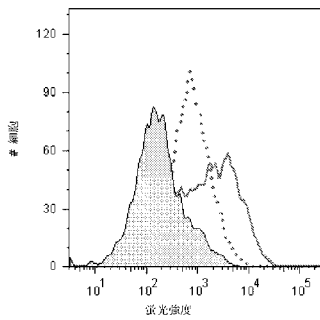
B



C



【 図 7 】



【配列表】

2009509152000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/566 C12N15/62		
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) G01N 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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PENDE D ET AL: "PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMFORD, NY, US, vol. 42, no. 4, February 2005 (2005-02), pages 463-469, XP004686640 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2007		Date of mailing of the international search report 11/06/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Palantlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Wimmer, Georg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066697

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CARLYLE JAMES R ET AL: "Missing self recognition of Ocl1/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors" FASEB JOURNAL, vol. 18, no. 4-5, 2004, pages Abst. 330.17 URL-http://ww, XP002416771 & FASEB MEETING ON EXPERIMENTAL BIOLOGY: TRANSLATING THE GENOME; WASHINGTON, DISTRICT OF COLUMBIA, USA; APRIL 17-21, 2004 ISSN: 0892-6638 the whole document</p>	1-31
A	<p>FERLAZZO GUIDO ET AL: "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 195, no. 3, 4 February 2002 (2002-02-04), pages 343-351, XP002416772 ISSN: 0022-1007 the whole document</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/066697**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:
2. Claims Nos.: 34, 35, 49-52
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:
1-31 (partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2006 /066697

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 34, 35, 49-52

The present claims 34, 35, 49-52 encompass compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, and undue experimentation would be required to screen all compounds known at the priority date. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that a meaningful search of the claims cannot be performed.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/EP2006/066697

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-31 (partially)

A method of identifying an antibody that binds to a cell surface-associated ligand of a second ligand, the method comprising immunizing a vertebrate animal with a preparation of target cells or cell membranes to which the second ligand binds, preparing antibodies from the vertebrate animal, and selecting an antibody that competes with the second ligand in binding to a cell surface-associated ligand of the second ligand, wherein the second ligand is the NKp30 receptor.

2. claims: 1-31 (partially)

As invention 1, wherein the second ligand is the NKp44 receptor.

3. claims: 1-31 (partially)

As invention 1, wherein the second ligand is the NKp46 receptor.

4. claims: 1-31 (partially)

As invention 1, wherein the second ligand is the NKp80 receptor.

5. claims: 1-31 (partially)

As invention 1, wherein the second ligand is CD69.

6. claims: 1-31 (partially)

As invention 1, wherein the second ligand is CD83.

7. claims: 32, 33, 36-48 (partially)

A fusion protein comprising a soluble ligand-binding fragment from NKp30 covalently linked to an antibody Fc domain via a linker comprising at least one amino acid residue from the transmembrane region of NKp30.

8. claims: 36-48 (partially)

International Application No. PCT/EP2006 /066697

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210As invention 7, with NKp44 instead of NKp30.

9. claims: 36-48 (partially)

As invention 7, with NKp46 instead of NKp30.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	4 H 0 4 5
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
		A 6 1 P	43/00	1 1 1
		C 1 2 N	15/00	A

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

(72)発明者 ワットマン, ピーター, アンドレアス, ニコライ, ルーメルト
デンマーク国 ディーケー - 2 9 6 0 ラングステッド キスト, ヴアレレド バネヴェイ 3
4

(72)発明者 タン, トーマス, チン, チェ
デンマーク国 ディーケー - 2 1 0 0 コペンハーゲン エー, 8 0 3, ネルレ アレ 7 5

Fターム(参考) 2G045 AA34 CB01 DA35 DA37 FB03
4B024 AA01 BA63 CA04 DA02 EA03 EA04 GA11 HA01
4B063 QA01 QQ08 QQ13 QQ79 QR48 QR77
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4C085 AA13 AA14 AA16 AA34 BB11 BB42 CC02 CC21 CC22 DD63
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA50 DA76 EA28 FA74

专利名称(译)	鉴定针对孤儿受体配体的抗体的方法		
公开(公告)号	JP2009509152A	公开(公告)日	2009-03-05
申请号	JP2008531717	申请日	2006-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
申请(专利权)人(译)	诺Norudeisuku-ER / ES		
[标]发明人	スピーピエター ワットマンピーターアンドレアスニコライルーメルト タントーマスチンチェ		
发明人	スピー, ピエター ワットマン, ピーター, アンドレアス, ニコライ, ルーメルト タン, トーマス, チン, チェ		
IPC分类号	G01N33/53 C12P21/08 C12P21/02 C12Q1/02 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/50 G01N33/15 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P31/12 A61P43/00 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5032 G01N33/505 G01N2333/70535 G01N2333/70596		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N C12P21/08 C12P21/02.C C12Q1/02 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P35/00 A61P37/02 A61P31/12 A61P43/00.111 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA35 2G045/DA37 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/BB42 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/DD63 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	2005108816 2005-09-23 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述用于鉴定针对先前未知的配体或其他孤儿配体的器官受体的抗体的方法，即尚未鉴定出配对配体的其他配体或受体。随着与未知配体结合的抗体变得可用，它们的分离和表征变得非常容易，并且鉴定的抗体本身可以被诊断患有癌症或自身免疫疾病或其他疾病。它对治疗患者有用。实施方案提供了通过竞争性筛选 (ITACS) 鉴定治疗性抗体的鉴定方法。还描述了融合蛋白，其包含抗体的Fc部分和孤儿受体的可溶部分，例如NKp30。融合蛋白通常包含柔性跨膜接头 (FTL)，包含孤儿受体的跨膜结构域的一部分的接头。

オーファンリガンド	NCBI 受入番号(配列番号)	細胞
NKp30	NP_667341 (整列番号1)	NK 細胞
NKp44	NP_004819 (整列番号2)	NK 細胞
NKp46	NP_004820 (整列番号3)	NK 細胞
NKp80	CAC29425 (整列番号13)	NK 細胞
CD83	Z11697 (整列番号14)	樹状細胞
CD69	NP_001772 (整列番号15)	NK 細胞