

(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2009-526552

(P2009-526552A)

(43) 公表日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 A	4B064
C12N 5/06 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 5/00 E	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/21	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-555446 (P2008-555446)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月12日 (2007.2.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月10日 (2008.10.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/061988  
 (87) 国際公開番号 W02007/117763  
 (87) 国際公開日 平成19年10月18日 (2007.10.18)  
 (31) 優先権主張番号 60/772,911  
 (32) 優先日 平成18年2月13日 (2006.2.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

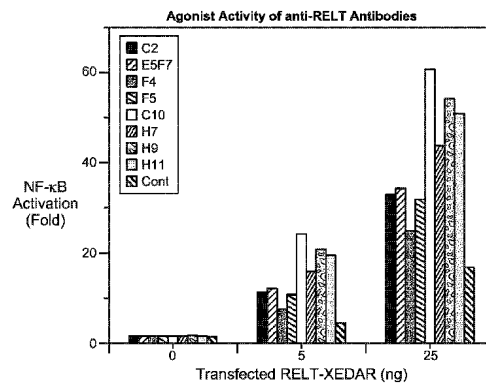
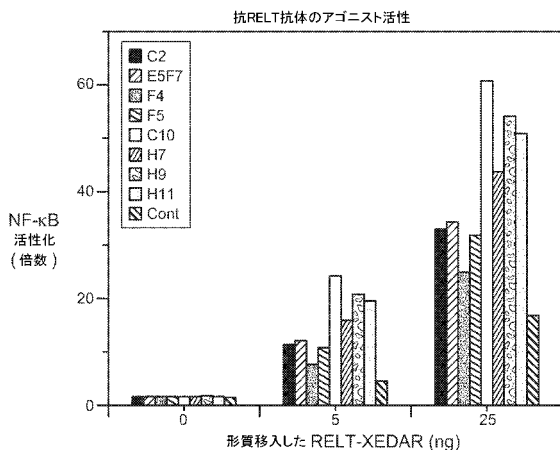
(71) 出願人 596168317  
 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
 GENENTECH, INC.  
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408  
 0-4990・サウス・サン・フランシス  
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ディクスイット, ヴィツシュヴァ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
 22, ロス アルトス, シェイディー  
 オークス コート 26750

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RELTをターゲッティングするための方法と組成物

(57) 【要約】

抗RELTモノクローナル抗体とこの抗体を使用する方法が提供される。また、免疫細胞発達を調整する際、及びサイトカイン産生を調整する際におけるRELTポリペプチド及び核酸の使用法も、提供される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

R E L T に特異的に結合する単離された抗体。

## 【請求項 2】

配列番号：42～49、51～58及び60～67のいずれかの各HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3から選択される、少なくとも一の高頻度可変(HVR)配列を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項 3】

HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、このときのHVR-H1がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j  
10  
を含み、このアミノ酸 a がグリシンであり、アミノ酸 b がフェニルアラニンであり、アミノ酸 c がスレオニンであり、アミノ酸 d がイソロイシンであり、アミノ酸 e がスレオニン、セリン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 f がアスパラギン、グリシン、セリン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 g がスレオニン、セリン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 h がトリプトファン、チロシン及びセリンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンであり、そしてアミノ酸 j がヒスチジンであり、このときのHVR-H2がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z  
20  
a' b' を含み、このアミノ酸 k がグリシン及びアラニンから選択され、アミノ酸 l がフェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、グリシン、アスパラギン及びチロシンから選択され、アミノ酸 m がイソロイシンであり、アミノ酸 n がセリン、チロシン、スレオニン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 o がプロリンであり、アミノ酸 p がセリン、アスパラギン、チロシン及びアラニンから選択され、アミノ酸 q がグリシン、アスパラギン、アスパラギン酸及びセリンから選択され、アミノ酸 r がグリシンであり、アミノ酸 s がチロシン、アスパラギン、アスパラギン酸及びセリンから選択され、アミノ酸 t がスレオニンであり、アミノ酸 u がアスパラギン、チロシン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 v がチロシンであり、アミノ酸 w がアラニンであり、アミノ酸 x がアスパラギン酸であり、アミノ酸 y がセリンであり、アミノ酸 z がバリンであり、アミノ酸 a' がリジンであり、そしてアミノ酸 b' がグリシンであり、このときのHVR-H3がアミノ酸配列 c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' s' t' u' v  
30  
'を含み、このアミノ酸 c' がアルギニン及びリジンから選択され、アミノ酸 d' がフェニルアラニン、トリプトファン、セリン、グリシン、ロイシン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 e' がロイシン、アスパラギン酸、アラニン、セリン及びアルギニンから選択され、アミノ酸 f' がセリン、チロシン、グリシン、トリプトファン及びヒスチジンから選択され、アミノ酸 g' がアスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、トリプトファン及びバリンから選択され、アミノ酸 h' がグリシン、アスパラギン酸、アスパラギン、トリプトファン、アラニン、スレオニン及びヒスチジンから選択され、アミノ酸 i' がアラニン、グリシン、メチオニン、トリプトファン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から選択され、アミノ酸 j' がチロシン、トリプトファン、アスパラギン、バリン、グリシン及びグルタミン酸から選択され、アミノ酸 k' がアラニン、バリン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸及びアルギニンから選択され、アミノ酸 l' がアルギニン、チロシン、バリン、フェニルアラニン及びグリシンから選択され、アミノ酸 m' がアスパラギン酸、スレオニン、メチオニン、グルタミン酸、チロシン及びアルギニンから選択され、アミノ酸 n' がチロシン、セリン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸及びプロリンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 o' がアラニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン及びバリンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 p' がメチオニン、アラニン、バリン及びグリシンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 q' がアルギニン、バリン、メチオニン及びアスパラギン酸から選択されるか、又は存在せず、r' がチロシン及びメチオニンから選択されるか、又は存在せず、s' がバリンであるか又は存在せず、t' がメチオニンであるか又は存在せず、u' がアスパラギン酸であり、v' がチロシンである、請求項2に記載の抗体。  
40  
50

## 【請求項 4】

図 5 A 及び 5 B のクローン C 2 1、C 1 0、E 5 / E 7、F 4、F 5、H 7、H 9 及び H 1 1 に記載のものに対応する H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 配列を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

配列番号：49 の H V R - H 1 配列、配列番号：58 の H V R - H 2 配列、及び配列番号：67 の H V R - H 3 配列を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

さらに、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される軽鎖高頻度可変配列を含んでなる、請求項 2 から 5 のいずれかーに記載の抗体。

10

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれかーに記載の抗体と同じ R E L T 上の抗原決定基に結合する単離された抗体。

## 【請求項 8】

R E L T への結合に関して請求項 1 から 7 のいずれかーに記載の抗体と競合する単離された抗体。

## 【請求項 9】

ヒトの R E L T に特異的に結合する、請求項 1 から 8 のいずれかーに記載の抗体。

## 【請求項 10】

少なくとも一の R E L T リガンドに対する R E L T の結合を阻害する、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

20

## 【請求項 11】

少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を阻害する、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

## 【請求項 12】

少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を刺激する、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

## 【請求項 13】

R E L T を発現する細胞からの N F - B の産生を刺激する、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

30

## 【請求項 14】

R E L T のアゴニストである、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

## 【請求項 15】

R E L T のアンタゴニストである、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体。

## 【請求項 16】

請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体をコードする核酸分子。

## 【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸を含んでなるベクター。

## 【請求項 18】

請求項 17 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

40

## 【請求項 19】

請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体を産生することができる細胞株。

## 【請求項 20】

抗体が産生される条件下で、抗体をコードする核酸分子を含む宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の抗体の産生方法。

## 【請求項 21】

請求項 1 から 13 のいずれかーに記載の抗体の有効量と薬学的に受容可能な担体を含有する組成物。

## 【請求項 22】

R E L T ポリペプチドを含有することが疑われる試料中の R E L T ポリペプチドの存在

50

を決定する方法であって、請求項 1 から 9 のいずれか一に記載の抗体に該試料を曝し、該試料において R E L T ポリペプチドに対する少なくとも一の抗体の結合を決定することを含む方法。

【請求項 2 3】

患者において I F N- が原因となる、I F N- によって悪化する、又は I F N- によって長引く疾患ないしは症状の治療方法であって、請求項 1 から 9 のいずれか一に記載の少なくとも一の抗体の有効量を患者に投与することを含む方法。

【請求項 2 4】

前記疾患ないしは症状が、該疾患ないしは症状のない場合の I F N- レベルと比較して低減した I F N- レベルが原因となる、低減した I F N- によって悪化する、又は低減した I F N- によって長引くものである、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記疾患ないしは症状が、該疾患ないしは症状のない場合の I F N- レベルと比較して増加した I F N- レベルが原因となる、増加した I F N- によって悪化する、又は増加した I F N- によって長引くものである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

R E L T の可溶性の有効量を患者に投与することを含む、患者の I F N- に関連する疾患ないしは症状の治療のための方法。

【請求項 2 7】

前記患者が哺乳類の患者である、請求項 2 3 から 2 6 のいずれか一に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

前記患者がヒトである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記疾患ないしは症状が細胞増殖性疾患、感染症、免疫性 / 炎症性疾患及びインターフェロン関連の疾患のうちの少なくとも一から選択される、請求項 2 3 から 2 6 のいずれか一に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記免疫性 / 炎症性疾患が狼瘡、喘息及びアレルギー性鼻炎から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記感染症が微生物感染症、ウイルス感染症及び真菌感染症から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

前記細胞増殖性疾患が骨髄形成異常症候群 ( M D S ) 及び癌から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

C D 1 1 c + M H C II - 細胞の R E L T の発現を阻害することを含む、従来の樹状細胞 ( c D C ) と比較して C D 1 1 c + M H C II - 細胞から産生される形質細胞様樹状細胞 ( p D C ) の割合を増やすための方法。

【請求項 3 4】

C D 1 1 c + M H C II - 細胞の R E L T 活性を阻害することを含む、従来の樹状細胞 ( c D C ) と比較して C D 1 1 c + M H C II - 細胞から産生される形質細胞様樹状細胞 ( p D C ) の割合を増やすための方法。

40

【請求項 3 5】

R E L T の発現又は活性の阻害に、C D 1 1 c + M H C II - 細胞の R E L T を破壊することが含まれる、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

R E L T の発現又は活性の阻害に、C D 1 1 c + M H C II - 細胞に R E L T に対するオリゴヌクレオチドアンチセンスを投与することが含まれる、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の方法。

50

## 【請求項 37】

RELTの発現又は活性の障害に、RELTの正常リガンドに対するRELTの結合を阻害する抗体をCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞に投与することが含まれる、請求項33又は34に記載の方法。

## 【請求項 38】

RELTの発現又は活性の障害がインビボで生じる、請求項33から37のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 39】

RELTの発現又は活性の障害がインビトロで生じる、請求項33から37のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 40】

CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの発現を刺激することを含む、従来の樹状細胞と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される形質細胞様樹状細胞の割合を低減するための方法。

## 【請求項 41】

CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの活性を刺激することを含む、従来の樹状細胞と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される形質細胞様樹状細胞の割合を低減するための方法。

## 【請求項 42】

RELTの発現又は活性の刺激に、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞に対するRELTをアゴナイズする抗体を投与することが含まれる、請求項40又は41に記載の方法。

20

## 【請求項 43】

哺乳動物のRELTの発現を阻害することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を増加するための方法。

## 【請求項 44】

哺乳動物のRELT活性を阻害することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を増加するための方法。

## 【請求項 45】

哺乳動物のCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの発現を刺激することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を低減するための方法。

30

## 【請求項 46】

哺乳動物のCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの活性を刺激することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を低減するための方法。

## 【請求項 47】

哺乳動物において発現するRELTの量を検出することを含む、哺乳動物の異常なIFN- $\gamma$ レベルに関連する疾患ないしは症状を診断するための方法。

## 【請求項 48】

前記疾患ないしは症状が、細胞増殖性疾患、感染症、免疫性/炎症性疾患及びインターフェロン関連の疾患のうち少なくとも一から選択される、請求項47に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の開示】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、免疫細胞の発達を調整する際及び、サイトカイン産生を調整する際におけるRELTポリペプチド及び核酸の使用法の分野に関する。また、本発明は、抗RELT抗体、特にRELT発現細胞からのサイトカイン産生のアゴニストである抗RELT抗体の分野に関する。

## 【0002】

(発明の背景)

I型インターフェロン(IFN)は、多種多様な細胞種に対して多面的効果を有するサイ

50

トカインである。IFNは、その抗ウイルス活性が最も知られているが、抗細菌性、抗原生動物性、免疫調節性、及び細胞増殖調整機能も有する(van den Broek等, *Immunol. Rev.* 148: 5-18 (1995); Pfeffer等, *Cancer Res.* 58: 2489-99 (1998))。I型インターフェロンは、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )とインターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ )とを含む。

#### 【0003】

IFN産生細胞(IPC)としても知られるマウスCD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45RB<sup>+</sup>形質細胞様樹状細胞(pDC)は、特有の形質細胞様形態を表し、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド又は広範囲のDNA又はRNAウイルスに曝されるとI型IFNを確実に産生する(Colonna等, *Nat. Immunol.* 5: 1219-26 (2004); Hochrein等, *Hum. Immunol.* 63: 1103-10 (2002); Nakano等, *J. Exp. Med.* 194: 1171-8 (2001); Diebold等, *Science* 303: 1529-31 (2004); Dalod等, *J. Exp. Med.* 195: 517-28 (2002); Asselin-Paturel等, *Nat. Immunol.* 2: 1144-50 (2001); 及びLund等, *J. Exp. Med.* 198: 513-20 (2003))。このIFN産生は、Toll様レセプター7及び9及び下流のアダプターMyD88に依存している(Diebold等, *Science* 303: 1529-31 (2004); Lund等, *J. Exp. Med.* 198: 513-20 (2003); Krug等, *Immunity* 21: 107-19 (2004); Hemmi等, *J. Immunol.* 170: 3059-64 (2003))。マウスのサイトメガロウイルス(MCMV)などの特定のウイルスに感染したマウスにおいて、pDCは主要な、おそらく唯一のIFN- $\gamma$ の供給源である(Dalod等, *J. Exp. Med.* 195: 517-28 (2002); Asselin-Paturel等, *Nat. Immunol.* 2: 1144-50 (2001))。抗原特異的ナイーブT細胞を抗原刺激する(Colonna等, *Nat. Immunol.* 5: 1219-26 (2004); Banchereau等, *Nature* 392: 245-52 (1998))「専門の」抗原提示細胞の異なるサブセットである従来CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>DC(cDC)とpDCの発達と協同作用は、所定の病原体に対する適切な免疫応答の生成に重要である。また、pDCは、狼瘡などの自己免疫性疾患(例えばRonnblom, *J. Exp. Med.* 194: F59 (2001)を参照)、アレルギー性鼻炎及び喘息などの免疫性疾患(Jahnsen等, *J. Immunol.* 165: 4062-4068 (2000); Matsuda等, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 166: 1050-1054 (2002))、及び癌(例えばZou等, *Nat. Med.* 7: 1339-1346 (2001)に記載の卵巣癌、及びMa等, *Leukemia* 18(9): 1451-1456 (2004)に記載の骨髓異形成症候群(MDS))の発達及び病態生理において重要な役割を果たすことが示唆されている。

#### 【0004】

マウス骨髓内の共通のリンパ球前駆細胞(CLP)及び共通の骨髓系前駆細胞(CMP)はともにcDCとpDCの細胞集団を生じさせるのに対して(Shigematsu等, *Immunity* 21: 43-53)、末梢血内のCD11c<sup>+</sup>MHCクラスII<sup>-</sup>サブセットは、pDC及びcDCサブセットに対する直接の前駆物質を含む集団として同定されている(del Hoyo等, *Nature* 415: 1043-7 (2002))。マウスの遺伝子ターゲティング研究により、cDCの発達を調節するいくつかの細胞内シグナル伝達分子及び転写因子が同定されている。IFN調節因子(IRF)2、IRF4、Ikaros、RelB、TRAF6及びPU.1はそれぞれ、cDC発達に必須である(Ardavin等, *Nat. Rev. Immunol.* 3: 582-90 (2003))。pDC発達についてはあまり知られていない。IRF8/IFNコンセンサス配列結合タンパク質(ICSBP)を欠くマウスはpDC発達を欠損しているが、これらのマウスでは骨髓系細胞及びcDCの発達も障害されている(Tsujimura等, *J. Immunol.* 170: 1131-5 (2003))。pDC及びcDCへの前駆細胞の分化は、マウス又はfms関連のチロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)による骨髓細胞培養物において刺激される(Vollstedt等, *J. Exp. Med.* 197: 575-84 (2003); Gilliet等, *J. Exp. Med.* 195: 953-8 (2002))。

#### 【0005】

特定のTNFレセプター及びそのリガンドは、樹状細胞活性化及び活性の重要なメディエーターとして同定されている(Anderson等, *Nature* 390: 175-179 (1997))。TNFレセプタースーパーファミリー(TNFRSF)は少なくとも29のメンバーからなり、そのほとんどはI型必須膜タンパク質である。これらのレセプターは、細胞外システイン-リッチドメイン(CRD)を保存しており、このドメインは一般的に、3つのジスルフィド結合によって架橋される6つのシステイン残基を含むシュードリピートである。TNFRSFメ

ンバーは、その同族リガンドと結合したときに生じる生物学的な現象、例えば細胞生存、細胞死、増殖及び分化を促す(Locksley等, Cell 104: 487-501 (2001); Bodmer等, Trends Biochem. Sci. 27: 19-26 (2002))。

【0006】

TNFRSFには、特定のリガンドが同定されている様々なオーファンレセプター、例えばリンパ球組織で発現するレセプター(RELT)/TNFRSF19Lがある(Sica等, Blood 97: 2702-7 (2001))。RELTは、2つのCRDを有するI型細胞表面タンパク質である。異所的に発現される場合、RELTは、先天的及び後天的な免疫のために必要な遺伝子の発現のために必須な転写因子であるNF- $\kappa$ B(id.)を活性化する(Bonizzi等, Trends Immunol. 25: 280-8 (2004))。RELT mRNA発現は、脾臓やリンパ節などのリンパ系組織に非常に限定されているようである(Sica等, Blood 97: 2702-7 (2001))。免疫細胞の調節及び機能におけるRELTの役割を理解することによって、免疫疾患の治療のための新規な手法が提供されるであろう。

10

【0007】

特許出願及び公開公報を含む本明細書中で引用したすべての文献は、その全体が出典明記によって援用される。

【0008】

(発明の説明)

特定の免疫細胞の発達を調整する際及び、特定の免疫細胞からのサイトカイン産生を調整する際におけるRELTポリペプチド及び核酸の使用方法が提供される。また、RELTに結合する及び/又はRELTに関係する生物学的活性を調節することができる新規の抗体が提供される。

20

一実施態様では、RELTに特異的に結合する単離された抗体が提供される。一実施態様では、配列番号：42~49、51~58及び60~67のいずれかの各HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3から選択される、少なくとも一の高頻度可変(HVR)配列を含んでなる単離された抗体が提供される。一態様では、単離された抗体はRELTに特異的に結合する。他の態様では、単離された抗体はさらに、配列番号：1及び配列番号：2から選択される軽鎖高頻度可変配列を含んでなる。他の態様では、抗体はヒトのRELTに特異的に結合する。他の態様では、抗体は、少なくとも一のRELTリガンドへのRELTの結合を阻害する。他の態様では、抗体はRELTのアンタゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一のRELTが媒介するシグナル伝達経路を阻害する。他の態様では、抗体は、RELTを発現する細胞からのNF- $\kappa$ Bの産生を刺激する。他の態様では、抗体はRELTのアゴニストである。他の態様では、抗体は少なくとも一のRELTが媒介するシグナル伝達経路を刺激する。

30

【0009】

他の実施態様では、HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3から選択される少なくとも一の配列を含んでなり、このときのHVR-H1がアミノ酸配列 a b c d e f g h i j を含み、このアミノ酸 a がグリシンであり、アミノ酸 b がフェニルアラニンであり、アミノ酸 c がスレオニンであり、アミノ酸 d がイソロイシンであり、アミノ酸 e がスレオニン、セリン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 f がアスパラギン、グリシン、セリン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 g がスレオニン、セリン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 h がトリプトファン、チロシン及びセリンから選択され、アミノ酸 i がイソロイシンであり、そしてアミノ酸 j がヒスチジンであり、このときのHVR-H2がアミノ酸配列 k l m n o p q r s t u v w x y z a' b' を含み、このアミノ酸 k がグリシン及びアラニンから選択され、アミノ酸 l がフェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、グリシン、アスパラギン及びチロシンから選択され、アミノ酸 m がイソロイシンであり、アミノ酸 n がセリン、チロシン、スレオニン及びアスパラギンから選択され、アミノ酸 o がプロリンであり、アミノ酸 p がセリン、アスパラギン、チロシン及びアラニンから選択され、アミノ酸 q がグリシン、アスパラギン、アスパラギン酸及びセリンから選択され、アミノ酸 r がグリシン

40

50

であり、アミノ酸 s がチロシン、アスパラギン、アスパラギン酸及びセリンから選択され、アミノ酸 t がスレオニンであり、アミノ酸 u がアスパラギン、チロシン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 v がチロシンであり、アミノ酸 w がアラニンであり、アミノ酸 x がアスパラギン酸であり、アミノ酸 y がセリンであり、アミノ酸 z がバリンであり、アミノ酸 a' がリジンであり、そして、アミノ酸 b' がグリシンであり、ここでの H V R - H 3 がアミノ酸配列 c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' s' t' u' v' を含み、このアミノ酸 c' がアルギニン及びリジンから選択され、アミノ酸 d' がフェニルアラニン、トリプトファン、セリン、グリシン、ロイシン及びアスパラギン酸から選択され、アミノ酸 e' がロイシン、アスパラギン酸、アラニン、セリン及びアルギニンから選択され、アミノ酸 f' がセリン、チロシン、グリシン、トリプトファン及びヒスチジンから選択され、アミノ酸 g' がアスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、トリプトファン及びバリンから選択され、アミノ酸 h' がグリシン、アスパラギン酸、アスパラギン、トリプトファン、アラニン、スレオニン及びヒスチジンから選択され、アミノ酸 i' がアラニン、グリシン、メチオニン、トリプトファン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から選択され、アミノ酸 j' がチロシン、トリプトファン、アスパラギン、バリン、グリシン及びグルタミン酸から選択され、アミノ酸 k' がアラニン、バリン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸及びアルギニンから選択され、アミノ酸 l' がアルギニン、チロシン、バリン、フェニルアラニン及びグリシンから選択され、アミノ酸 m' がアスパラギン酸、スレオニン、メチオニン、グルタミン酸、チロシン及びアルギニンから選択され、アミノ酸 n' がチロシン、セリン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸及びプロリンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 o' がアラニン、チロシン、メチオニン、トリプトファン及びバリンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 p' がメチオニン、アラニン、バリン及びグリシンから選択されるか、又は存在せず、アミノ酸 q' がアルギニン、バリン、メチオニン及びアスパラギン酸から選択されるか、又は存在せず、r' がチロシン及びメチオニンから選択されるか、又は存在せず、s' がバリンであるか又は存在せず、t' がメチオニンであるか又は存在せず、u' がアスパラギン酸であり、v' がチロシンである、単離された抗体が提供される。一態様では、単離された抗体は R E L T に特異的に結合する。一態様では、単離された抗体はさらに、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される軽鎖高頻度可変配列を含んでなる。他の態様では、抗体はヒトの R E L T に特異的に結合する。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T リガンドに対する R E L T の結合を阻害する。他の態様では、抗体は R E L T のアンタゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を阻害する。他の態様では、抗体は、R E L T を発現する細胞からの N F - B の産生を刺激する。他の態様では、抗体は R E L T のアゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を刺激する。

#### 【0010】

他の実施態様では、図 5 A 及び 5 B のクローン C 2 1、C 1 0、E 5 / E 7、F 4、F 5、H 7、H 9 及び H 1 1 に記載のものに対応する H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 配列を含んでなる単離された抗体が提供される。一態様では、単離された抗体は R E L T に特異的に結合する。一態様では、単離された抗体はさらに、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される軽鎖高頻度可変配列を含んでなる。他の態様では、抗体はヒトの R E L T に特異的に結合する。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T リガンドへの R E L T の結合を阻害する。他の態様では、抗体は R E L T のアンタゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を阻害する。他の態様では、抗体は、R E L T を発現する細胞からの N F - B の産生を刺激する。他の態様では、抗体は R E L T のアゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一の R E L T が媒介するシグナル伝達経路を刺激する。

#### 【0011】

他の実施態様では、配列番号：49 の H V R - H 1 配列、配列番号：58 の H V R - H 2 配列、及び配列番号：67 の H V R - H 3 配列を含んでなる単離された抗体が提供される

10

20

30

40

50

。一態様では、単離された抗体はさらに、配列番号：1及び配列番号：2から選択される軽鎖高頻度可変配列を含んでなる。一態様では、抗体はヒトのRELTに特異的に結合する。他の態様では、抗体は、少なくとも一のRELTRリガンドへのRELTTの結合を阻害する。他の態様では、抗体はRELTTのアントゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一のRELTTが媒介するシグナル伝達経路を阻害する。他の態様では、抗体はRELTTを発現する細胞からのNF- $\beta$ の産生を刺激する。他の態様では、抗体はRELTTのアゴニストである。他の態様では、抗体は、少なくとも一のRELTTが媒介するシグナル伝達経路を刺激する。

#### 【0012】

他の実施態様では、上記のいずれか一の抗体と同じRELTT上の抗原決定基に結合する単離された抗体が提供される。ある実施態様では、RELTTへの結合に関して上記のいずれか一の抗体と競合する単離された抗体が提供される。

本発明の抗体はあらゆる形態であってもよい。例えば、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であってもよい。一実施態様では、本発明の抗体はヒト抗体でなく、例えばマウス異物において産生される抗体でない(例えば国際公開第96/33735号に記載される)。本発明の抗体は、完全長又はその断片(例えば抗原結合成分を含む断片)であってもよい。

#### 【0013】

一態様では、本発明の抗体をコードする核酸分子が提供される。一態様では、核酸を含んでなるベクターが提供される。一態様では、ベクターを含んでなる宿主細胞が提供される。一態様では、本発明の抗体を生産することができる細胞株が提供される。一態様では、抗体が産生される条件下で、抗体をコードする核酸分子を含む宿主細胞を培養することを含む、本発明の抗体の産生方法が提供される。一態様では、本発明の抗体の有効量と薬学的に受容可能な担体を含む組成物が提供される。

他の実施態様では、RELTPポリペプチドを含むことが疑われる試料中のRELTPポリペプチドの存在を決定する方法であって、本発明のいずれか一の記載の抗体に該試料を曝し、該試料においてRELTPポリペプチドに対する少なくとも一の抗体の結合を決定することを含む方法が提供される。

#### 【0014】

他の実施態様では、患者においてIFN- $\gamma$ が原因となる、IFN- $\gamma$ によって悪化する、又はIFN- $\gamma$ によって長引く疾患ないしは症状の治療方法であって、本発明のいずれか一の記載の少なくとも一の抗体の有効量を患者に投与することを含む方法が提供される。ある態様では、疾患ないしは症状は、該疾患ないしは症状のない場合のIFN- $\gamma$ レベルと比較して低減したIFN- $\gamma$ レベルが原因となる、低減したIFN- $\gamma$ によって悪化する、又は低減したIFN- $\gamma$ によって長引くものである。ある態様では、疾患ないしは症状は、該疾患ないしは症状のない場合のIFN- $\gamma$ レベルと比較して増加したIFN- $\gamma$ レベルが原因となる、増加したIFN- $\gamma$ によって悪化する、又は増加したIFN- $\gamma$ によって長引くものである。他の実施態様では、RELTTの可溶性の有効量を患者に投与することを含む、患者のIFN- $\gamma$ に関連する疾患ないしは症状の治療のための方法が提供される。

#### 【0015】

一態様では、患者は哺乳類の患者である。他の態様では、患者はヒトである。他の態様では、疾患ないしは症状は細胞増殖性疾患、感染症、免疫性/炎症性疾患及びインターフェロン関連の疾患のうちの一つから選択される。他の態様では、免疫性/炎症性疾患は、狼瘡、喘息及びアレルギー性鼻炎から選択される。他の態様では、感染症は、微生物感染症、ウイルス感染症及び真菌感染症から選択される。他の態様では、細胞増殖性疾患は、骨髄異形成症候群(MDS)及び癌から選択される。

#### 【0016】

他の実施態様では、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTTの発現を阻害することを含む、従来の樹状細胞(cDC)と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される

10

20

30

40

50

形質細胞様樹状細胞(pDC)の割合を増やすための方法が提供される。他の実施態様では、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELT活性を阻害することを含む、従来の樹状細胞(cDC)と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される形質細胞様樹状細胞(pDC)の割合を増やすための方法が提供される。一態様では、RELTの発現又は活性の阻害に、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTを破壊することが含まれる。他の態様では、RELTの発現又は活性の阻害に、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞にRELTに対するオリゴヌクレオチドアンチセンスを投与することが含まれる。他の態様では、RELTの発現又は活性の阻害に、RELTの正常リガンドに対するRELTの結合を阻害する抗体をCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞に投与することが含まれる。他の態様では、RELTの発現又は活性の阻害がインビボで生じる。他の態様では、RELTの発現又は活性の阻害がインビトロで生じる。

10

【0017】

他の実施態様では、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの発現を刺激することを含む、従来の樹状細胞と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される形質細胞様樹状細胞の割合を低減するための方法が提供される。他の実施態様では、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの活性を刺激することを含む、従来の樹状細胞と比較してCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞から産生される形質細胞様樹状細胞の割合を低減するための方法が提供される。一態様では、RELTの発現又は活性の刺激に、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞に対するRELTをアゴナイズする抗体を投与することが含まれる。

20

【0018】

他の実施態様では、哺乳動物のRELTの発現を阻害することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を増加するための方法が提供される。他の実施態様では、哺乳動物のRELT活性を阻害することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を増加するための方法が提供される。

他の実施態様では、哺乳動物のCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの発現を刺激することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を低減するための方法が提供される。他の実施態様では、哺乳動物のCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞のRELTの活性を刺激することを含む、哺乳動物におけるIFN- $\gamma$ 産生を低減するための方法が提供される。

他の実施態様では、哺乳動物において発現するRELTの量を検出することを含む、哺乳動物の異常なIFN- $\gamma$ レベルに関連する疾患ないしは症状を診断するための方法が提供される。一態様では、疾患ないしは症状が、細胞増殖性疾患、感染症、免疫性/炎症性疾患及びインターフェロン関連の疾患のうち少なくとも一から選択される。

30

【0019】

(発明を実施するための形態)  
一般的技術

特に示さない限り、本発明の実施には、当業者の技量内にある分子生物学(組換え技術を含む)、細菌学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の一般的な技術を用いる。このような技術は、文献、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版(Sambrook等, 2001); 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編, 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney編, 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel等編, 1987, 及び定期更新物); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullis等編, 1994); PCR2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor編(1995)); Harlow及びLane, 編 (1988 Antibodies, A Laboratory Manual; 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988; 及び「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas等, 2001)に十分に説明されている。

40

【0020】

定義

本明細書中で用いる、「リンパ系組織で発現されるレセプター(Receptor Expressed in Lymphoid Tissues)」及び「RELT」なる用語は、RELTの天然及び合成のポリペプ

50

チドのすべての種類として定められ、その例としては限定するものではないが、完全長 R E L T ポリペプチド、シグナル配列が取り除かれた R E L T ポリペプチドの成熟形態及び R E L T ポリペプチドの可溶性形態がある。

【 0 0 2 1 】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。一実施態様では、タンパク質は、( 1 ) 例えばローリー法で測定した場合 9 5 % を越える抗体、一部の実施態様では 9 9 重量 % を超えるまで、( 2 ) 例えばスピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 1 5 の N 末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なほど、あるいは、( 3 ) 例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での S D S - P A G E により均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

10

【 0 0 2 2 】

本明細書中で用いる、「抗 R E L T 抗体」なる用語は、R E L T に特異的に結合可能である抗体を指す。

【 0 0 2 3 】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」、「等価な」、又は「実質的に等価な」という句は、当業者が 2 つの数値(例えば、分子に関連するもの、及び参照 / 比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えば K d 値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び / 又は統計学的有意差がないと認められるほど、2 つの数値が有意に類似していることを意味する。前記 2 つの値間の差異は、参照 / 比較分子の値の例えば約 5 0 % 以下、約 4 0 % 以下、約 3 0 % 以下、約 2 0 % 以下、及び / 又は約 1 0 % 以下である。

20

【 0 0 2 4 】

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が 2 つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照 / 比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えば K d 値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、2 つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記 2 つの値間の差異は、参照 / 比較分子の値の、例えば約 1 0 % より大きく、約 2 0 % より大きく、約 3 0 % より大きく、約 4 0 % より大きく、及び / 又は約 5 0 % より大きい。

30

【 0 0 2 5 】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の 1 : 1 相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、解離定数 ( K d ) として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的实施態様を記載する。

40

【 0 0 2 6 】

一実施態様では、本発明の「K d」又は「K d 値」は、所望の抗体の F a b 型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(R I A)で測定される。抗原に対する F a b の溶液結合親和性は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の( <sup>1 2 5</sup> I )-標識抗原にて F a b を均衡化して、抗 F a b 抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって測定する(Chen, 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881)。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を 5 µ g / m l

50

の捕獲抗 F a b 抗体(Cappel Labs)を含む 5 0 m M 炭酸ナトリウム(p H 9 . 6)にて一晚コートして、その後 2 % (w/v)のウシ血清アルブミンを含む P B S にて室温(およそ 2 3 )で 2 ~ 5 時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、1 0 0 p M 又は 2 6 p M の [ <sup>1 2 5</sup> I ] 抗原を段階希釈した所望の F a b と混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗 V E G F 抗体、F a b - 1 2 の評価と一致する)。ついで所望の F a b を一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば 6 5 時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば 1 時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを 0 . 1 % の T w e e n 2 0 を含む P B S にて 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、1 5 0 μ l / ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 計測器(Packard)にて 1 0 分間計測する。最大結合の 2 0 % か又はそれ以下濃度の F a b を選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、~ 1 0 反応単位(R U)の固定した抗原 C M 5 チップを用いて 2 5 の BIAcore™-2000又は BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行って K d 又は K d 値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(E D C)及び N-ヒドロキシスクシニミド(N H S)で活性化した。抗原を 1 0 m M 酢酸ナトリウム(p H 4 . 8)で 5 μ g / m l (~ 0 . 2 μ M)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(R U)がおよそ 1 0 になるように 5 μ l / 分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した F a b (0 . 7 8 n M から 5 0 0 n M)を 2 5 、およそ 2 5 μ l / 分の流速で 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S T)を含む P B S に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出した。平衡解離定数(K d)を  $k_{off} / k_{on}$  比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかしながら、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が  $1 0^6 M^{-1} S^{-1}$  を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM-Aminco 分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、P B S (p H 7 . 2)、2 5 の、2 0 n M の抗抗原抗体(F a b 型)の蛍光放出強度(励起 = 2 9 5 n m ; 放出 = 3 4 0 n m、帯域通過 = 1 6 n m)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

#### 【 0 0 2 7 】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」は、~ 1 0 反応単位(R U)の固定した抗原 C M 5 チップを用いて 2 5 の BIAcore™-2000又は BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(E D C)及び N-ヒドロキシスクシニミド(N H S)で活性化した。抗原を 1 0 m M 酢酸ナトリウム(p H 4 . 8)で 5 μ g / m l (~ 0 . 2 μ M)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(R U)がおよそ 1 0 になるように 5 μ l / 分の流速で注入した。反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2 倍の段階希釈した F a b (0 . 7 8 n M から 5 0 0 n M)を 2 5 、およそ 2 5 μ l / 分の流速で 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (P B S T)を含む P B S に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $K_{on}$ )と解離速度( $K_{off}$ )を算出した。平衡解離定数(K d)を  $K_{off} / K_{on}$  比として算出した。例と

して、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかしながら、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  を上回る場合、結合速度は、好ましくは分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)、25 の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起 = 295 nm ; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定される。

#### 【0028】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なDNAセグメントが結合されうる円形の二重鎖DNAループを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「組換えベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

#### 【0029】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に、例えば標識との結合により、さらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ply-L-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有する有機キャップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマ

ー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。ー又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートが  $P(O)S$  (「チオアート」)、 $P(S)S$  (「ジチオアート」)、 $(O)NR_2$  (「アミダート」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 $CO$  又は  $CH_2$  (「ホルムアセタール」) と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれの  $R$  及び  $R'$  は独立して、 $H$  又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA 及び DNA を含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

10

## 【0030】

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

## 【0031】

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

20

## 【0032】

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び/又は親和成熟したものであってよい。

## 【0033】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

30

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

40

## 【0034】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は $F(ab')_2$ 断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

50

## 【0035】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。二本鎖Fv種において、この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv種では、柔軟なペプチドリンカーによって1の重鎖及び1の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連鎖することができ、よって軽鎖及び重鎖は、二本鎖Fv種におけるものと類似の「二量体」構造に連結することができる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してVH-VL二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

10

## 【0036】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するこの命名である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

## 【0037】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

20

## 【0038】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、及び $\delta$ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等、Cellular and Mol. Immunology, 第4版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と1以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

30

## 【0039】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

## 【0040】

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

40

## 【0041】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一である。従って、「モノクローナル」との形容は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。このようなモノクローナル抗

50

体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この場合、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。重要なのは、選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的への親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養液中におけるその産生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等が可能になること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることである。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler等, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling等: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、或るいはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術(例えば、国際公開第98/24893号; 国際公開第96/34096号; 国際公開第96/33735号; 国際公開第91/10741号; Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 同第5661016号; Marks等, *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) 及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

#### 【0042】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第4816567号; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

#### 【0043】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含ん

でいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321:522-525(1986); Riechmann等, Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと: Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle 及びGross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

10

## 【0044】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。「CDR」なる用語に続く「HC」及び「LC」なる文字はそれぞれ、重鎖及び軽鎖のCDRを指す。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、カバットCDRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

20

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(カバット番号付け)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia番号付け)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

30

## 【0045】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、Kabat等、上掲に従って番号を付した。

40

## 【0046】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミ

50

ノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアラメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

【0047】

「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、scFvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはscFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。scFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

10

【0048】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(VH-VL)内で軽鎖可変ドメイン(VL)に重鎖可変ドメイン(VH)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公報93/11161；及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

20

【0049】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。

【0050】

「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のHVRにおいて一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, Proc Nat Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994)；Schier等, Gene, 169:147-155(1995)；Yelton等, J. Immunol.155:1994-2004(1995)；Jackson等, J. Immunol.154(7):3310-9(1995)；及びHawkins等, J. Mol. Biol.226:889-896(1992)に記載されている。

30

【0051】

「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。

40

本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

【0052】

「疾患」とは、本発明の抗体を用いた治療が有益である任意の状態である。これには、慢性及び急性の疾患、又は対象疾患に哺乳動物がかかりやすい病的状態を含む疾病が含まれる。本明細書中で治療される疾患の非限定的例には、感染症、細胞増殖性疾患、免疫性/炎症性疾患(限定するものではないが、自己免疫性疾患を含む)、及び他のインターフェロン関連疾患が含まれる。

「感染症」なる用語は、感染を有する哺乳動物の正常な生理機能へ侵入する又は衝突する一又は複数の他の微生物が原因となる疾患を指す。感染症の例には、限定するものでは

50

ないが、ウイルス感染症、細菌性感染症、寄生虫感染症(例えば、虫及び線虫によって生じる感染症)及び真菌感染症が含まれる。

【0053】

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」なる用語は、ある程度の異常な細胞増殖と関係している疾患を指す。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に制御されない細胞成長/増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態及び、例えば、腫瘍形成を指すか又は表す。癌の例には、限定するものではないが、癌腫(カルシノーマ)、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平癌腫、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌、白血病及びその他リンパ球増殖性疾患、並びに様々な種類の頭頸部癌が含まれる。また、細胞増殖性疾患には、限定するものではないが、前白血病、例えば骨髄異形成症候群(MDS)が含まれる。

10

【0054】

本明細書中で用いる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成性細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」という用語はここで意味するように互いに排除するものではない。

20

「インターフェロン関連の疾患」なる用語は、典型的に、一又は複数のインターフェロンの異常な量又は活性を特徴とする、又は一又は複数のインターフェロンの異常な量又は活性が原因となる疾患を指すか又は表す。インターフェロン関連の疾患の例には含まれるが限定するものではない。

【0055】

「炎症性疾患」及び「免疫疾患」という用語は、異常な免疫性機構及び/又は異常なサイトカインシグナル伝達(例えば、異常なインターフェロンシグナル伝達)により引き起こされる疾患を指す又は表わす。炎症性疾患及び免疫疾患の例には、これらに限定されるものではないが、自己免疫疾患、免疫不全症候群、及び過敏症が含まれる。ここで「自己免疫疾患」とは、個体自身の組織から生じ、個体自身の組織に対する非悪性の疾病又は疾患のことである。ここでの自己免疫疾患は、悪性又は癌性の疾病又は状態、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄芽球性白血病を除く。自己免疫疾病又は疾患の例には、限定されるものではないが、炎症反応、例えば乾癬及び皮膚炎(例えばアトピー性皮膚炎)を含む炎症性皮膚病；全身性強皮症及び硬化症；炎症性腸疾患(例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎)に関連した反応；呼吸困難症候群(成人性呼吸困難症候群；ARDSを含む)；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギー病状、例えば湿疹及び喘息及びT細胞の浸潤に関連した他の病状及び慢性炎症反応；アテローム性動脈硬化症；白血球接着不全症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス(SLE)(ループス腎炎、皮膚ループスを含むがこれらに限定されない)；真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病又はインシュリン依存性真性糖尿病)；多発性硬化症；レノー症候群；自己免疫甲状腺炎；橋本甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェールゲン症候群；若年発症糖尿病；及び結核に典型的に見出されるサイトカイン及びTリンパ球により媒介される急性及び遅延型高血圧に関連した免疫反応、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽種症及び血管炎；悪性貧血(アジソン病)；白血球血管外遊出に関連した疾病；中枢神経系(CNS)炎症性疾患；多臓器損傷症候群；溶血性貧血(限定されるものではないが、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血を含む)；重症筋無力症；抗原抗体複合体媒介性疾病；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；クレーブス病；ランベルト-イートン筋無力症候群；類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫血小板減

30

40

50

少性紫斑病 (ITP) 又は自己免疫血小板減少病等が含まれる。

【0056】

免疫不全症候群の例には、これらに限定されるものではないが、毛細血管拡張性運動失調症、白血球粘着不全症、リンパ球減少症、異常ガンマグロブリン血症、HIV又はデルタトロウイルス感染、分類不全型免疫不全症、重症複合免疫不全症、貪食殺菌機能障害、無ガンマグロブリン血症、ディジョージ症候群、及びウイスコット・アルドリッチ症候群が含まれる。過敏症の例には、これらに限定されるものではないが、アレルギー、喘息、皮膚炎、蕁麻疹、アナフィラキシー、ヴィスラー症候群、及び血小板減少性紫斑病が含まれる。

【0057】

ここで使用される「治療」とは、治療される個体又は細胞の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を意味し、予防のため、又は臨床病理経過中に実施することができる。治療の所望する効果には、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和、疾病の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減少、炎症及び/又は組織/器官の損傷の防止又は減少、疾病の進行速度の低減、病状の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾病又は疾患の進行を遅延化させるために使用される。

【0058】

「個体」は脊椎動物である。特定の実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、これらに限定されるものではないが、家畜(例えばウシ)、スポーツ用動物、愛玩動物(例えばネコ、イヌ及びウマ)、霊長類、マウス及びラットが含まれる。特定の実施態様では、脊椎動物はヒトである。

治療目的の「哺乳動物」とは、ヒト、家畜、並びに動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、等を含む、哺乳動物に分類されるあらゆる動物を類意味する。特定の実施態様では、哺乳動物はヒトである。

【0059】

「有効量」とは、所望される治療的又は予防的結果を達成するのに必要な期間、必要な用量での有効量を意味する。

本発明の物質/分子の「治療的有效量」は、病状、年齢、性別、個体の体重、及び個体に所望する反応を引き出すための物質/分子の能力等の要因に応じて変わり得る。また、治療的有效量とは、物質/分子の任意の毒性又は有害な影響を、治療的に有益な効果が上回る量である。「予防的有效量」は、所望する予防的結果を達成するのに必要な期間、用量で有効な量を意味する。必ずではないが、典型的には、予防的用量は、疾病の前又は初期の段階に患者に使用されるために、予防的有效量は治療的有效量よりも少ない。

【0060】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を意味する。この用語は、放射性同位元素(例えば、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 及びLuの放射性同位元素)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド類(ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞毒性剤を以下に記載する。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0061】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商標登録))のようなアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーバ

10

20

30

40

50

(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチロ-ロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビロール、MARINOL(登録商標))；ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレチン、及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン1I及びカリケアマイシンI1(例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabicin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エボチロン(

10

20

30

40

50

epothilone) ; エトグルシド(etoglucid) ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ;  
 ロニダミン(lonidainine) ; メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(ma  
 ytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine) ; ミトグアゾン(mitoguazone) ; ミトキサ  
 ントロン ; モピダモール(mopidanmol) ; ニトラクリン(nitracrine) ; ペントスタチン ; フェ  
 ナメット(phenamet) ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカ  
 ルバジン ; P S K (登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサ  
 ン(razoxane) ; リゾキシシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム(spirogermanium) ; テニ  
 ュアゾン酸(tenuazonic acid) ; トリアジコン(triaziquone) ; 2, 2', 2''-トリクロロト  
 リエチルアミン ; トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン  
 (roridine)A及びアングイジン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン(E L I D I S I N  
 E (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン(mannomus  
 tine) ; ミトブロニトール ; ミトラクトール(mitolactol) ; ピボプロマン(pipobroman) ;  
 ガシトシン(gacytosine) ; アラビノシド(「A r a - C」) ; チオテパ ; タキソイド類、例  
 えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)  
 、ABRAXANE™パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(America  
 n Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキシタ  
 キセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル ; ゲムシタピン(gemcit  
 abine)(GEMZAR(登録商標)) ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセート ;  
 プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン ; ビンブラスチン(V E L B  
 A N (登録商標)) ; プラチナ ; エトポシド(V P - 1 6) ; イホスファミド ; マイトキサント  
 ロン ; ピンクリスチン(O N C O V I N (登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボリン ;  
 ビノレルピン(NAVELBINE(登録商標)) ; ノバントロン(novantrone) ; エダトレキセート ;  
 ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロナート(ibandronate) ; トポイソメラーゼ  
 阻害剤 R F S 2 0 0 0 ; ジフルオロメチロールニチン(D M F O) ; レチノイン酸のような  
 レチノイド ; カペシタピン(capecitabine)(X E L O D A (登録商標)) ; 及び上述したもの  
 の薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体、並びに、上記のうちの2つ以上の組み合わ  
 せ、例えば、C H O P (シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びブ  
 レドニゾロンの併用療法の略称)、及びF O L F O X (5 - F U及びロイコボリンと組み合  
 わせたオキサリプラチン(E L O X A T I N T M)を用いる治療計画の略称)  
 が含まれる。

10

20

30

#### 【 0 0 6 2 】

またこの定義に含まれるものには、癌の増殖を促進するホルモンの影響を調節、低減、  
 遮断又は阻害するように働く抗ホルモン剤で、多くの場合全身性の治療の形態のものがある。  
 それらはそれ自体がホルモンであり、例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン  
 受容体調節物質(S E R M)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェ  
 ンを含む)、E V I S T A (登録商標)ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン、  
 4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxif  
 ene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びF A R E S T O N (登録  
 商標)トレミフェン ; 抗プロゲステロン ; エストロゲンレセプター下方制御(E R D)、卵  
 巣を抑制又は停止させる機能を有する薬剤、例えば、L U P R O N (登録商標)及びE L I  
 G A R D (登録商標)等の黄体形成ホルモン放出ホルモン(L H R H)アゴニスト、リューブ  
 ロリド酢酸塩、ゴセレリン酢酸塩、プセレリン酢酸塩及びトリプトレリン ; フルタミド、  
 ニルタミド及びピカルタミド等のその他抗アンドロゲン ; 及び副腎のエストロゲン産生を  
 調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール  
 、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)酢酸メゲストロール、AROMASIN(登録商標)エキ  
 セメスタン、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ポロ  
 ゴール、FEMARA(登録商標)レトロゾール、及びARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールを含  
 む。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロン酸等のビスホスホネート(例  
 えば、B O N E F O S (登録商標)又はO S T A C (登録商標)、D I D R O C A L (登録商  
 標)エチドロン酸、N E - 5 8 0 9 5、Z O M E T A (登録商標)ゾレドロン酸/ゾレドロン

40

50

酸、F O S A M A X (登録商標)アレンドロン酸、A R E D I A (登録商標)パミドロン酸、S K E L I D (登録商標)チルドロン酸、又はA C T O N E L (登録商標)リセドロン酸、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体); アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に付着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C - 、R a l f、H - R a s、及び上皮成長因子受容体(E G F - R); T H E R A T O P E (登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン; LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤; ABARELIX(登録商標) r m R H ; ラパチニブditosylate(GW572016としても知られるE r b B - 2及びE G F R二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)及び上記のものの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体を含む。

10

#### 【0063】

##### 組成物とその作製方法

本発明は、R E L Tに特異的に結合する抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 42~49の少なくとも一の配列を含むH V R - H 1領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 51~58の少なくとも一の配列を含むH V R - H 2領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 60~67の少なくとも一の配列を含むH V R - H 3領域を含んでなる抗体を提供する。

一態様では、本発明は、配列番号: 42~49の少なくとも一の配列を含むH V R - H 1領域と、配列番号: 51~58の少なくとも一の配列を含むH V R - H 2領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 60~67の少なくとも一の配列を含むH V R - H 3領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 42~49の少なくとも一の配列を含むH V R - H 1領域と配列番号: 60~67の少なくとも一の配列を含むH V R - H 3領域を含んでなる抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号: 51~58の少なくとも一の配列を含むH V R - H 2領域と配列番号: 60~67の少なくとも一の配列を含むH V R - H 3領域を含んでなる抗体を提供する。

20

#### 【0064】

一態様では、本発明は、以下のうちの少なくとも1、少なくとも2又は少なくとも3を含んでなる抗体を提供する。

30

- i. 配列番号: 42~49の少なくとも一の配列を含むH V R - H 1配列、
- ii. 配列番号: 51~58の少なくとも一の配列を含むH V R - H 2配列、
- iii. 配列番号: 60~67の少なくとも一の配列を含むH V R - H 3配列。

図5A及び5Bに示すように、配列番号42~49、51~58及び60~67のアミノ酸配列には個々のH V R(すなわちH 1、H 2、H 3)に関して番号を付けた。後述するように、この番号付けは、カバット番号付けシステムと整合している。一実施態様では、本発明の抗体は、上記の(i)~(iii)のH V R配列の1、2又は3と、配列番号: 1又は2に記載の軽鎖高頻度可変領域を含んでなる。

一態様では、本発明は、図5A及び5Bに示す重鎖H V R配列を含んでなる抗体を提供する。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号: 1又は2に示す軽鎖H V R配列を含んでなる。

40

#### 【0065】

本発明の抗体のある実施態様は、下記の配列番号: 1に示す、ヒト化4D5抗体(h u M A b 4 D 5 - 8)(ハーセプチン(登録商標) Genentech, Inc.、米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)(米国特許第6407213号及びLee等, J. Mol. Biol (2004), 340(5):1073-93においても言及される)の軽鎖可変ドメインを含む。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val *Asn* Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser *Arg* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln *His* Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (配列番号:1)

(H V R 残基を下線で示す)

【0066】

一実施態様では、h u M A b 4 D 5 - 8 軽鎖可変ドメイン配列は、位置30、66及び91のー又は複数(それぞれ、上記に太字/斜体で示した*A s n*、*A r g*及び*H i s*)において修飾される。一実施態様では、修飾h u M A b 4 D 5 - 8 配列は、位置30に*S e r*、位置66に*G l y*及び/又は位置91に*S e r*を含む。したがって、一実施態様では、本発明の抗体は、以下の配列番号:2に示される配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる。

10

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val *Ser* Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser *Gly* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln *Ser* Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (配列番号:2)

20

(H V R 残基を下線で示す)

h u M A b 4 D 5 - 8 に関する置換された残基を上記に太字/斜体で示す。

【0067】

R E L T に対する結合活性が実質的に保持されるならば、本発明の抗体はいかなる適切なフレームワーク可変ドメイン配列をも含むことができる。例えば、ある実施態様では、本発明の抗体は、ヒトサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含んでなる。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置71、73及び/又は78に置換を含む。これらの抗体のある実施態様では、位置71はAであり、73はTであり、及び/又は78はAである。一実施態様では、これらの抗体はh u M A b 4 D 5 - 8 (ハーセプチン(登録商標), Genentech, Inc., 米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)(米国特許第6407213号及び同第5821337号、及びLee等, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93においても言及される)の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む。一実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、米国特許第6407213号及び同第5821337号に記載のh u M A b 4 D 5 - 8 の軽鎖H V R 配列を含む。一実施態様では、これらの抗体は、h u M A b 4 D 5 - 8 (配列番号:1及び2)(ハーセプチン(登録商標), Genentech, Inc., 米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)(米国特許第6407213号及び同第5821337号、及びLee等, J. Mol. Bio

30

40

【0068】

ある実施態様では、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含んでなり、このフレームワーク配列は配列番号:3~21、30~33、38~41及び73~129の少なくとも一の配列を含み、H V R H 1、H 2及びH 3配列は配列番号:42~50、51~59及び60~68の少なくとも一からそれぞれ選択される。ある実施態様では、本発明の抗体は軽鎖可変ドメインを含んでなり、このフレームワーク配列は配列番号:22~25、26~29、34~37及び130~141の少なくとも一の配列を含み、高頻度可変領域は配列番号:1及び2から選択される。

ある実施態様では、本発明の抗体は重鎖可変ドメインを含んでなり、このフレームワー

50

ク配列は配列番号：3～21及び73～129の少なくとも一の配列を含み、HVR-H1、H2及びH3配列はそれぞれ配列番号：49、58及び67である(クローンH11)。同様に、他の実施態様では、各クローンC21、C10、E5/E7、F4、F5、H7及びH9の抗体は重鎖可変ドメインを含み、このフレームワーク配列は配列番号：3～21及び73～129の少なくとも一の配列を含み、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列は図5A及び5Bの各クローン又はFabについて具体的に列挙した配列である。

#### 【0069】

ある実施態様では、本発明の抗体は、所望のターゲット結合親和性を得るために親和性成熟させる。

ある態様では、本発明は、REL Tへの結合について、上記のいずれかの抗体と競合する抗体を提供する。ある態様では、本発明は、上記のいずれかの抗体と同じREL T上の抗原決定基に結合する抗体を提供する。

#### 【0070】

少なくとも一の抗REL T抗体、又は抗REL T抗体をコードする配列を含む少なくとも一のポリヌクレオチドを含んでなる組成物が提供される。特定の実施態様では、組成物は、医薬品組成物とすることができる。本明細書で使用する場合、組成物は、REL Tと結合する一又は複数の抗体、及び/又はREL Tと結合する一又は複数の抗体をコードする配列を含む一又は複数のポリヌクレオチドを含んでなる。これらの組成物は、公知の適切な担体、例えばバッファーを含む製薬的に許容可能な賦形剤等を更に含むことができる。

単離された抗体及びポリヌクレオチドも提供される。特定の実施態様では、単離された抗体及びポリヌクレオチドは実質的に純粋である。

#### 【0071】

一実施態様において、抗REL T抗体はモノクローナル抗体である。別の実施態様では、抗REL T抗体の断片(例えばFab、Fab'-SH及びF(ab')<sub>2</sub>断片)が提供される。これらの抗体断片は、酵素消化等の従来的手段によって作成することができるか又は組換え体技術によって生成することができる。このような抗体断片は、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体でもよい。これらの断片は、後述する診断及び治療目的に有用である。

#### 【0072】

ファージディスプレイライブラリを用いた抗REL T抗体の生成

対象とする抗体が得られるファージディスプレイライブラリを生成するための様々な方法が従来技術に既知である。対象とする抗体の一生成法では、Lee等, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93に記載されているファージ抗体ライブラリを使用する。

本発明の抗REL T抗体は、所望される活性を有する合成抗体クローンをスクリーニングするために、コンビナトリアルライブラリを用いて同定することができる。原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリ为非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収/溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗REL T抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗REL T抗体クローンの構築によって得ることができる。

#### 【0073】

10

20

30

40

50

抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの超可変ループ又は相補鎖決定領域(CDR)が存在する。可変ドメインは、Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

#### 【0074】

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, *EMBO J.*, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

#### 【0075】

繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marks等, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboom等, *Nucl. Acids. Res.*, 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

#### 【0076】

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗RELTクローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合には、検体をRELTで免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び/又は循環B細胞又は他の末梢血リンパ球(PBL)を、ライブラリ構築のために回収する。一実施態様では、RELT免疫化により、RELTに対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、抗ヒトRELTクローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗ヒトRELT抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下の(III)(b)の章に記載する。

#### 【0077】

抗RELT反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してRELT特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、RELTアフィニティークロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識RELTへの細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(FACS)によって得ることができる。

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び/又はB細胞又は他のPBLの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、RELTが免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検

10

20

30

40

50

体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

#### 【0078】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandi等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandi等, (1989)及びWard等, Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJセグメントに基づいた前方向プライマーにより、cDNA及びゲノムDNAから増幅することが可能である。しかしながら、cDNAからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jones等, Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastry等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandi等(1989)又はSastry等(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。特定の実施態様では、例えば、Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrum等, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及びVL配列を増幅するために、各V遺伝子ファミリーを標的にしたPCRプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandi等(1989)に記載のように、又はClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内の1つの末端ヘタグとして導入することができる。

#### 【0079】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsuda等, Nature Genet., 3: 88-94(1993)); これらクローニングされたセグメント(H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。VHレパートリーは、また、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いH3ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>セグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。VH及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。DNAをコードするV遺伝子の増幅に続いて、生殖系のV遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

#### 【0080】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefe等, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等, Nucl. Acid Res., 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可

能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強えられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種の F a b フラグメントが利用される。ナイーブの V H 及び V L レパートリーは、1つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この2つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約  $10^{12}$  クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、V H 及び V L 遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージピリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約  $10^{-8}$  M の  $K_d^{-1}$ )の多くの多様な抗体を提供する。

#### 【0081】

別法として、このレパートリーは、例えば Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように、同じベクターへ連続してクローニングするか、又は、Clacksonら, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のように P C R 後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。P C R アセンブリは、また、柔軟なペプチドスペーサーをコードしている D N A と V H 及び V L D N A を連結させて、単鎖の F v ( s c F v ) レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内での P C R アセンブリ」は、Embleton 等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、P C R によってリンパ球内の V H 及び V L 遺伝子を組み合わせ、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

ライブラリのスクリーニングは、いずれかの既知の技術によって行うことができる。例えば、R E L T を使用して、吸着プレートの壁をコーティングし、吸着プレートに固定した宿主細胞上に発現させることができるか、細胞選別に使用することができるか、ビオチンにコンジュゲートさせて、ストレプトアビジンでコーティングしたビーズにて捕捉することができるか、又はファージディスプレイライブラリをパニングするための何れかの既知の方法に使用することができる。

#### 【0082】

ファージライブラリサンプルを、少なくとも一部のファージ粒子を吸収剤と結合させるのに適した条件下で、固定化した R E L T に接触させる。通常、p H、イオン強度、温度等を含むこの条件は、生理的条件に近似するように選択される。固体ファージに結合させるファージを洗浄し、次いで、Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載のように酸により、Marks 等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載のようにアルカリにより、或いは、例えば Clackson 等, Nature, 352: 624-628 (1991)の抗原競合法に類似の手順での、R E L T 抗原競合により、溶出する。ファージは、単一回の選択で  $20 \sim 1000$  倍に濃縮することができる。更に、濃縮ファージを細菌培養で増殖させ、更なる選択回を行うことができる。

選択の効率は、洗浄の間の解離の動力学、及び単一のファージ上の多数の抗体断片が同時に抗原と結合できるかどうかを含む、多数の要因によって決まる。短時間の洗浄、多価のファージディスプレイ、及び固体相の抗原の高いコーティング密度により、速い解離動態(及び弱い結合親和性)を有する抗体を保持することができる。密度が高いことは、多価の相互作用によりファージを安定させるだけでなく、解離したファージの再結合に有利である。遅い解離動態(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択を、長時間の洗浄及び Bass 等, Proteins, 8: 309-314 (1990)及び WO 92/09690に記載のような単価ファージディスプレイ、並びに Marks 等 Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載のような抗原の低いコーティング密度によって促進することができる。

#### 【0083】

R E L T のために、異なる親和性のファージ抗体間で選択を行うことが、親和性の差異がわずかであっても、可能である。しかしながら、選択された抗体をランダムに変異させることにより(例えば、上記親和性成熟技術の一部において行われるように)、多数の変異が生じ、大部分が抗原に結合し、且つ少数に親和性の向上が生じると思われる。R E L T

10

20

30

40

50

が制限されている場合、珍しい高親和性ファージを計算することができた。親和性の高い変異体全てを保持するため、過剰ビオチン標識したRELTであるが、RELTの標的モル親和性定数より低いモル濃度でビオチン標識したRELTを用いてファージをインキュベートすることができる。次いで、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズで高親和性結合ファージを捕捉することができる。このような「平衡捕捉」により、結合の親和性に従って抗体を選択することができ、その際の感受性は、親和性の低い、過剰なファージの2倍に過ぎない親和性を有する変異クローンを単離可能なものである。固体相に結合したファージの洗浄に使用する条件を操作して、解離動態に基づき識別を行うこともできる。

#### 【0084】

抗RELTクローンは活性で選別されてもよい。ある実施態様では、本発明は、インビボに投与した場合又はMHC II<sup>+</sup> DC前駆細胞培養物にインビトロで添加した場合に、cDCと比較してpDCの産生を増加させる抗RELT抗体を提供する。他の実施態様では、本発明は、インビボに投与した場合にIFN- $\gamma$ の血清中濃度を増加させる、又はMHC II<sup>+</sup> DC前駆細胞培養物にインビトロで添加した場合にIFN- $\gamma$ 分泌を増加させる、抗RELT抗体を提供する。そのような抗RELT抗体に対応するFvクローンは、(1)上記B(I)(2)に記載のように、ファージライブラリから抗RELTクローンを単離し、場合によって、単離されたファージクローンの集団を、当該集団を適切な細菌宿主中で増殖させることにより増幅すること、(2)それぞれ、所望の遮断活性及び非遮断活性を有する、RELT及び第2タンパク質を選択すること、(3)抗RELTファージクローンを吸収してRELTを固定すること、(4)過剰な第2タンパク質を使用して、第2タンパク質の結合決定基と重複するか、同決定基と共有されるRELT結合決定基を認識するすべての望ましくないクローンを溶出すること、及び(5)(4)の後に吸収されたままのクローンを溶出することにより、選択することができる。場合によって、所望の遮断/非遮断特性を有するクローンを、本明細書に開示される選択手順を1回以上繰り返すことにより、更に濃縮することができる。

#### 【0085】

本発明のFvクローンをコードするDNAは、従来の手順により容易に単離及び配列決定することができる(例えば、ハイブリドーマ又はファージDNAテンプレートから対象の重鎖及び軽鎖コード化領域を特異的に増幅させるように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)。単離後、DNAを発現ベクターに配置し、次いで当該ベクターを、大腸菌細胞、サルのコス細胞、チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞、又は他の場合には免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髓腫細胞等の宿主細胞に形質移入し、よって組換え宿主細胞中に所望のモノクローナル抗体の合成を得る。抗体コード化DNAの細菌における組換え発現に関する参考文献には、Skerra等, *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256 (1993)及びPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)が含まれる。

本発明のDNAコード化Fvクローンを、重鎖及び/又は軽鎖の定常領域をコードする既知のDNA配列(例えば、適切なDNA配列をKabat等, 上掲から得ることができる)と組み合わせ、完全長又は部分長の重鎖及び軽鎖を形成することができる。IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE定常領域を含む、任意のアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用できること、及びそのような定常領域は任意のヒト又は動物の種から採取できることを理解されたい。「ハイブリッド」の完全長重鎖及び/又は軽鎖のコード化配列を形成するために、一の動物(例えばヒト)の種の可変ドメインDNAから採取し、次いで別の動物種の定常ドメインDNAに融合させるFvクローンは、本明細書で使用する「キメラ」抗体及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。一実施態様では、ヒト可変DNA由来のFvクローンをヒトの定常領域DNAに融合させ、全ヒトの完全長又は部分長重鎖及び/又は軽鎖のコード化配列を形成する。

#### 【0086】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和

10

20

30

40

50

性(約  $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$  の  $K_d^{-1}$ )である可能性があるが、Winterら(1994)、上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等、*J. Mol. Biol.* 226: 889-896(1992)の方法、又はGramら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローンポリメラーゼ(Leung等、*Technique*, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、1つ又はそれより多いCDRをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のFvクローンにおいて、対象のCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第9607754号(1996年3月14日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等、*Bio technol.* 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、 $10^{-9}\text{M}$ の範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

10

#### 【0087】

抗RELT抗体を生成する他の方法

更に、抗体を生成して親和性を評価する他の方法が従来技術に既知であり、例えばKohler等、*Nature* 256: 495 (1975)；米国特許第4816567号；Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986；Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；Brodeur等、*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987；Munson等、*Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)；Engels等、*Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989)；Abrahmsen等、*EMBO J.*, 4: 3901 (1985)；*Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976)；Morrison等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)に記載されている。

20

#### 【0088】

一般的な方法

一般的に、本発明は、一又は複数のRELT活性の一部又は完全な遮断が所望されるRELTが媒介する疾患の治療に有用である抗RELT抗体を提供する。一実施態様では、本発明の抗RELT抗体は、細胞増殖性疾患を治療するために用いる。他の実施態様では、本明細書において提供される抗RELT抗体は、感染症を治療するために用いる。他の実施態様では、本明細書において提供される抗RELT抗体は、免疫不全、例えば上述したものを治療するために用いる。他の実施態様では、本明細書において提供される抗RELT抗体は、炎症性疾患、例えば上述したものを治療するために用いる。他の実施態様では、本明細書において提供される抗RELT抗体は、インターフェロン関連の疾患を治療するために用いる。

30

#### 【0089】

本明細書中に示すように、RELTは、 $\text{CD}11^+ \text{B}220^+ \text{CD}11\text{b}^- \text{CD}45\text{RB}^+$ 形質細胞様樹状細胞(「pDC」)のネガティブ調節因子であるが、従来の $\text{CD}11\text{c}^+ \text{B}220^-$ 樹状細胞(「cDC」)のネガティブ調節因子ではない。したがって、本発明の抗RELT抗体は、該抗体が結合するエピトープに応じて、RELTの正常機能をアンタゴナイズしてもよいし(これは前駆細胞からのIFN-分泌pDCの産生の増加による)、又はRELTの正常機能をアゴナイズしてもよい(これは前駆細胞からのIFN-分泌pDCの産生の低減による)。一又は複数の天然のRELTリガンドへのRELTの結合をブロックする抗RELT抗体は、おそらくRELT活性に対してアンタゴニスト作用があるであろう。一又は複数の天然のRELTリガンドへのRELTの結合を安定させるか又は増加させる抗RELT抗体は(すなわち、一又は複数のRELT抑制因子へのRELTの結合のブロックによって、又は、天然のRELTリガンドへのRELTの結合能を

40

50

干渉することなく R E L T の分解を予防することによって)、おそらく R E L T 活性に対してアゴニスト作用があるようである。アゴニスト抗体及びアンタゴニスト抗体の両方が本発明で考慮されるので、本発明の抗 R E L T 抗体によるインビトロ及びインビボでの相対的な p D C 及び I F N - のレベルを増加(アンタゴニスト作用)又は低減(アゴニスト作用)する方法が提供される。

#### 【 0 0 9 0 】

他の態様では、本発明の抗 R E L T 抗体は、R E L T の検出及び単離、例えば様々な細胞種類及び組織での R E L T の検出、例として、細胞群内及び所定の細胞内での R E L T の密度及び分布の決定、及び R E L T の存在又は量に基づく細胞選別のための試薬としての有用性が明らかとされた。

10

さらに他の態様では、本発明のアンタゴニスト性抗 R E L T 抗体は、本発明の目的とする抗体と類似の活性パートナーをブロックする R E L T アンタゴニストの開発に有用である。例として、本発明のアンタゴニスト性抗 R E L T 抗体は、同じ R E L T 結合特性及び / 又は R E L T が媒介する経路の遮断能を有する他の抗体を同定するために用いてもよい。更なる例として、本発明の抗 R E L T アンタゴニスト抗体は、本明細書中で例示される抗体と同じ R E L T の抗原決定基(一又は複数)(線形エピトープ及び立体構造のエピトープを含む)を実質的に結合する他の抗 R E L T 抗体を同定するために用いてもよい。

#### 【 0 0 9 1 】

本発明の抗 R E L T 抗体は、R E L T への一又は複数の結合パートナーの結合をブロックする際に類似の薬理学的作用を示すと思われる R E L T の小分子アンタゴニストをスクリーニングするために、R E L T が関与する生理学的経路をベースとしたアッセイに用いてもよい。本明細書中に示すように、マウスにおいて r e l t を欠損すると、I F N - 分泌 p D C の集団が増加し、それによってこのマウスの血清中の I F N - レベルが全体的に増加した。したがって、抗 R E L T 抗体のブロックは、p D C 発達の R E L T が媒介する抑制の小分子アンタゴニストを同定するためのスクリーニングに用いてもよい。例えば、一又は複数の潜在的な小分子アンタゴニストの活性は、M H C II - D C 前駆細胞からの p D C の発達を抑制する際のアンタゴニスト的な抗 R E L T 抗体の活性と比較してもよい。

20

#### 【 0 0 9 2 】

本明細書中に示すように、マウスにおいて r e l t を破壊すると、c D C と比較して、C D 1 1 c + M H C II - 細胞からの p D C 産生量が増加する。したがって、他の実施態様では、本発明は、C D 1 1 c + M H C II - 細胞における R E L T の発現及び / 又は活性を阻害することによって、C D 1 1 c + M H C II - 細胞からの c D C に対する p D C 産生の割合を調節するための方法を提供する。ある態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は r e l t を破壊することによって阻害される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、R E L T の DNA 又は RNA に対するオリゴヌクレオチドアンチセンスを投与することによって阻害される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、R E L T をアンタゴナイズする一又は複数の抗体を投与することによって阻害される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、抗体 H 1 1 を投与することによって阻害される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、インビトロで阻害される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、インビボで阻害される。

30

40

#### 【 0 0 9 3 】

同様に、本発明は、C D 1 1 c + M H C II - 細胞における R E L T の発現及び / 又は活性を刺激することを含む、c D C 細胞と比較して、C D 1 1 c + M H C II - 細胞からの p D C 産生の割合を低減するための方法を提供する。ある態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、R E L T をアゴナイズする一又は複数の抗体を投与することによって刺激される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、インビボで刺激される。他の態様では、R E L T の発現及び / 又は活性は、インビトロで刺激される。

50

## 【0094】

IFN- は、主にpDCにより産生されることが知られており、本明細書中に示すように、インビボでの全身のIFN- レベルは主にpDCによるIFN- の産生に起因する。したがって、本発明は、RELTの発現及び/又は活性を阻害することによってIFN- の産生を増加させる方法を提供する。ある態様では、RELTの発現及び/又は活性はreltを破壊することによって阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、RELTのDNA又はRNAに対するオリゴヌクレオチドアンチセンスを投与することによって阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、RELTをアンタゴナイズする一又は複数の抗体を投与することによって阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、本発明の一又は複数の抗体を投与することによって阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、抗体H11を投与することによって阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、インビトロで阻害される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、インビボで阻害される。

10

同様に、本発明は、RELTの発現及び/又は活性を刺激することによって、IFN- 産生を低減する方法を提供する。ある態様では、RELTの発現及び/又は活性は、RELTをアゴナイズする一又は複数の抗体を投与することによって刺激される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、インビボで刺激される。他の態様では、RELTの発現及び/又は活性は、インビトロで刺激される。

## 【0095】

候補抗体の生成は、ハイブリドーマ技術、及び結合分子のファージディスプレイライブラリのスクリーニング等の、本明細書に記載の技術を含め、当技術分野において常套的な技術を用いて達成することができる。これらの方法は従来技術において確立されている。

簡潔に説明すると、本発明の抗RELT抗体は、一又は複数の所望の活性を有する合成抗体クローンをスクリーニングするために、コンビナトリアルライブラリを用いて作製することができる。原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原に吸収され、それによってライブラリーの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンを抗原から溶出することができ、抗原吸収/溶出のサイクルを繰り返すことによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗RELT抗体は、対象のファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて対象のファージクローン由来のFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いて完全長抗RELT抗体クローンを構築することにより、得ることができる。国際公開第03/102157号パンフレット及びその引用文献も参照されたい。

20

30

## 【0096】

一実施態様では、本発明の抗RELT抗体はモノクローナルである。また、ここに提供される抗RELT抗体のFab、Fab'、Fab'-SH及びF(ab')<sub>2</sub>断片、並びにそれらの変形形態も本発明の範囲に含まれる。これらの抗体断片は、酵素消化等の常套的な手段により作製することができるか、又は組換え技術により生成することができる。このような抗体断片は、キメラ、ヒト又はヒト化とすることができる。これらの断片は、本明細書に定める実験、診断及び治療の目的に有用である。

40

モノクローナル抗体は、ほぼ同種の抗体の集団から得ることができる。つまり、集団を構成する個々の抗体は、少量だけ存在する可能性のある天然に発生する突然変異を別にすれば同一である。従って、形容詞「モノクローナル」とは、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特性を示す。

本発明の抗RELTモノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)によっ

50

て最初に開示されたハイブリドーマ法を含む、従来技術に既知の様々な方法を用いて作製することができるか、或いは組換えDNA法によって作製することができる(例えば、米国特許第4816567号)。

#### 【0097】

##### ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。宿主細胞は、限定するものではないが、原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞を含む。この目的のために、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEの定常領域を含め、いずれかのアイソタイプの定常領域を使用することができ、そのような定常領域は何らかのヒト又は動物種から採取することができる。

10

#### 【0098】

##### 原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

##### ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に依りて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

20

30

#### 【0099】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン(Amp)及びテトラサイクリン(Tet)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモーターを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。

40

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、GEM.TM.-11のようなバクテリオファージを、大腸菌LE392のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

#### 【0100】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモーター-シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘

50

導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に应答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモーターを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモーターを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び/又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

10

#### 【0101】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等(1980) Cell 20:269)。

20

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

30

#### 【0102】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌trxB系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

本発明の抗体は、発現されるポリペプチド成分の量的な比を変更することにより、分泌されて適切に集合体化(アSEMBル)された本発明の抗体の産出を最大化することができる発現系を用いても生成することができる。このような変更は、少なくとも部分的にはポリペプチド成分の翻訳強度を同時に変更することにより行われる。

40

#### 【0103】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等による米国特許第5840523号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。任意のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作成することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。特定の実施態様では、ヌクレオチド配列における変化はサイレントである。TIRにおけ

50

る変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード化配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。加えて、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、1番目及び2番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

#### 【0104】

一実施態様では、含有される各シストロンについて一定の範囲のTIR強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のTIR強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。TIR強度は、Simmons等による米国特許第5840523号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づいて、所望の個々のTIRを選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lacIq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup> を有する33D3株(米国特許第5639635号)を含むW3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌1776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608)など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。pBR322、pBR325、pACYC177、又はpKN410のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

#### 【0105】

##### 抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNAを原核生物宿主中に導入し、そのDNAを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール/DMSOを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリ

10

20

30

40

50

ア培地(LB)プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

#### 【0106】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリール及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、限定するものではないが、約20 から約39、約25 から約37 の範囲、及び約30 を含む温度範囲で増殖が起こる。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。大腸菌に対しては、pHは約6.8から約7.4、又は約7.0とすることができる。

本発明の発現ベクターに誘導性プロモーターが用いられる場合、プロモーターの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモーターが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。一実施態様では、リン酸限定培地はC.R.A.P培地である(例として、Simmons等, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

#### 【0107】

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

本発明の一態様では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、例えば約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(一般的炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

#### 【0108】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180 - 220のOD<sub>550</sub>まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12 - 50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、ト

10

20

30

40

50

ランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等 (1999) J Bio Chem 274:19601-19605 ; Georgiou等, 米国特許第 6 0 8 3 7 1 5 号 ; Georgiou等, 米国特許第 6 0 2 7 8 8 8 号 ; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105 ; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113 ; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

#### 【 0 1 0 9 】

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼ I I I、O m p T、D e g P、T s p、プロテアーゼ I、プロテアーゼ M i、プロテアーゼ V、プロテアーゼ V I 及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲の Joly等 (1998) ; Georgiou等, 米国特許第 5 2 6 4 3 6 5 号 ; Georgiou等, 米国特許第 5 5 0 8 1 9 2 号 ; Hara等 (1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

#### 【 0 1 1 0 】

##### 抗体精製

一実施態様では、ここで生成される抗体タンパク質を更に精製することにより、更なるアッセイ及び使用のためにほぼ同種の調製物を得る。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相 H P L C、シリカ又は D E A E などの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

一態様では、固形層に固定したプロテイン A を本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテイン A は抗体の F c 領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した 4 1 k D の細胞壁タンパク質である。Lindmark 等 (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテイン A を固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、或いは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムとすることができる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着をできるだけ防ぐように、グリセロールなどの試薬でコートされる。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテイン A 固定固形層に適応し、プロテイン A に対象とする抗体を特異的に結合させることができる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

#### 【 0 1 1 1 】

##### 真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、ベクターは、限定するものではないが、以下の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモーター及び転写終末因子。

#### 【 0 1 1 2 】

##### (i) シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。通常選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発

現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g Dシグナルが利用できる。

このような前駆体領域の DNA は、多価抗体をコードする DNA に読み取り枠を一致させて結合される。

#### 【 0 1 1 3 】

##### (ii) 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、SV40 開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

#### 【 0 1 1 4 】

##### (iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

#### 【 0 1 1 5 】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えば DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び II、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、DHFR 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFR の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート (Mtx) を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、例えば、DHFR 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 株化細胞 (例として、ATCC CRL-9096) を含む。

あるいは、抗体をコードする DNA 配列、野生型 DHFR タンパク質、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞 (特に、内在性 DHFR を含む野生型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシンあるいは G418 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第 4965199 号を参照のこと。

#### 【 0 1 1 6 】

##### (iv) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常、宿主生物体によって認識され、対象のポリペプチドをコードする核酸 (例えば抗体) に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ 25 ないし 30 塩基上流に見出される ATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から 70 ないし 80 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである CNC AAT 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルである AATAA 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス及びサルウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ンプロモーター、或いは熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節されうる。

S V 4 0 ウイルスの初期及び後期プロモーターは、S V 4 0 ウイルスの複製起点を更に含む S V 4 0 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主中で D N A を発現させる系が、米国特許第 4 4 1 9 4 4 6 号に開示されている。この系の変形例は米国特許第 4 6 0 1 9 7 8 号に開示されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下におけるマウス細胞内のヒト インターフェロン c D N A の発現に関する Reyes 等, Nature 297:598-601 (1982) も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用

10

#### 【 0 1 1 7 】

##### (v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明の抗体ポリペプチドをコードしている D N A の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強され得る。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の S V 4 0 エンハンサー(1 0 0 - 2 7 0 塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされうるが、通常プロモーターから 5' 位に位置している。

20

#### 【 0 1 1 8 】

##### (vi) 転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及び m R N A の安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウイルスの D N A 又は c D N A の 5'、時には 3' の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしている m R N A の非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第 9 4 / 1 1 0 2 6 号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

30

#### 【 0 1 1 9 】

##### (vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中の D N A をクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、S V 4 0 によって形質転換されたサル腎臓 C V 1 株 (C O S - 7, A T C C C R L 1 6 5 1); ヒト胚腎臓株 (2 9 3 又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された 2 9 3 細胞、Graham 等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞 (B H K, A T C C C C L 1 0); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - D H F R (C H O, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (T M 4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞 (C V 1 A T C C C C L 7 0); アフリカミドリザルの腎細胞 (V E R O - 7 6, A T C C C R L - 1 5 8 7); ヒト子宮頸癌細胞 (H E L A, A T C C C C L 2); イヌ腎細胞 (M D C K, A T C C C C L 3 4); バッファローラット肝細胞 (B R L 3 A, A T C C C R L 1 4 4 2); ヒト肺細胞 (W 1 3 8, A T C C C C L 7 5); ヒト肝細胞 (H e p G 2, H B 8 0 6 5); マウス乳房腫瘍細胞 (M M T 0 6 0 5 6 2, A T C C C C L 5 1); T R I 細胞 (Mather 等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); M R C 5 細胞; F S 4 細胞;

40

50

及びヒト肝癌株(HepG2)である。

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

#### 【0120】

##### (viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(Sigma)、最小必須培地(MEM),(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地(DMEM),Sigma)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号;同4657866号;同4927762号;同4560655号;又は同5122469号;国際公開第90/03430号;国際公開第87/00195号;又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN<sup>TM</sup>薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0121】

##### (ix) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

#### 【0122】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーは一般に許容可能な精製技術である。プロテインA等のアフィニティークロマトグラフィーの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 1657-1675 (1986))。アフィニティークロマトグラフィーが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSE<sup>TM</sup>クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

任意の予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばpH約2.5-4.5、一般的には低塩濃度(例として、約0-0.25M塩)の溶出緩衝液を用

いて低 pH 疎水性作用クロマトグラフィーにより、必要な精製ステップを更に行う。

一般に、研究、試験及び臨床用に使用される抗体を調製するための技術及び方法は従来技術において既に確立されており、上記と合致している及び/又は対象とする特定の抗体について当業者により適切とみなされることに注意されたい。

#### 【0123】

##### 活性アッセイ

本発明の抗体は、従来技術に既知の様々なアッセイにより、その物理的/化学的特性及び生物学的機能について特徴付けることができる。

精製された抗体は、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパepsin消化を含むがこれらに限定されない一連のアッセイにより、更に特徴付けることができる。

必要に応じて、抗体の生物学的活性が分析される。一部の実施態様では、本発明の抗体の抗原結合活性について試験する。従来技術に既知の、本発明に使用可能な抗原結合アッセイには、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインAイムノアッセイ等のあらゆる直接的又は競合的結合アッセイを含むがこれらに限定されない。

#### 【0124】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はADCCなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のFc活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び/又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、CDC及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠損している(すなわちADCC活性を欠損していると思われる)が、FcRn結合能は維持していることを確認することができる。ADCCを仲介する第一細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血系細胞でのFcR発現については、Ravetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等のPNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合できない、つまりCDC活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)に記載のように、CDCアッセイを行ってもよい。また、FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

#### 【0125】

##### 抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennan等, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Fab、Fv及びScFv抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模産生が容易となる。抗体断片は上述に

10

20

30

40

50

において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF (a b')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F (a b')<sub>2</sub>断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したF a b及びF (a b')<sub>2</sub>断片は米国特許第5 8 6 9 0 4 6号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖F v断片(s c F V)である。国際公開第9 3 / 1 6 1 8 5号；米国特許第5 5 7 1 8 9 4号；及び米国特許第5 5 8 7 4 5 8号を参照のこと。F v及びs F vは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である。したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。s F v融合タンパク質は、s F vのアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第5 6 4 1 8 7 0号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

#### 【0126】

##### ヒト化抗体

本発明は、ヒト化抗体を含む。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が従来技術に既知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトのソースからそれに導入された一以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「重要な」残基と呼ばれ、一般に「重要な」可変ドメインに由来する。ヒト化は、基本的にヒト抗体の該当する配列を高頻度可変領域配列で置換することにより、Winter及び共同研究者(Jones等(1986)Nature 321:522-525；Riechmann等(1988)Nature, 332:323-327；Verhoeyen等(1988)Science 239:1534-1536)の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4 8 1 6 5 6 7号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基が、及び場合によっては幾つかのF R残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0127】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽鎖及び重鎖いずれも、抗原性を減らすために重要である。いわゆる「最良に適合する(ベストフィット)」方法によれば、齧歯類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。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる(Sims等(1993)J. Immunol. 151:2296；Chothia等(1987)J. Mol. Biol. 196:901)。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列から得られた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複数の異なるヒト化抗体に使用することができる(Carter等(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Presta等(1993)J. Immunol., 151:2623)。

更には、抗体は、抗原に対する高い親和性及びその他の望ましい生物学的特性を保持してヒト化されることが一般に好ましい。この目的を達成するために、一方法では、親の配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び様々な概念上のヒト化産物を分析するプロセスにより、ヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当技術分野の当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の、有望な三次元立体配置的構造を図解及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。このような表示を検査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際に残基が果たすと思われる役割を分析することができ、つまり候補免疫グロブリンの、その抗原に対する結合能に影響する残基を分析することができる。このように、レシピエント及び重要な配列からF R残基を選択して組み合わせることにより、所望の抗体特性、例えば標的とする抗原に対する親和性の増大を達成することができる。一般に、高頻度可変領域残基は、抗原の結合に対する影響に、直接的に且つ最も有意に関わっている。

## 【0128】

## ヒト抗体

本発明のヒト抗 R E L T 抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択した F v クローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗 R E L T 抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner 等, J. Immunol., 147: 86 (1991)によって記載されている。

10

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレポーターを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域( $J_H$ )遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555(1993); Jakobovits等, Nature 362, 255-258(1993)を参照のこと。

## 【0129】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、上記のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒト V ドメイン遺伝子のレポーターで置換し、非ヒト鎖/ヒト鎖 s c F v ないし F a b キメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラ s c F v ないし F a b が単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日公開のPCT特許出願WO 93/06213を参照)。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

20

30

## 【0130】

## 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、二重特異性抗体は、ヒト抗体ないしヒト化抗体である。特定の実施態様では、結合特異性の一つは R E L T に対するものであり、他は他の任意の抗原に対するものである。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えば F ( a b ' )<sub>2</sub> 二重特異性抗体)として調製することができる。

## 【0131】

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等ら, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が1993年5月13日に公開の国際公報第93/08829号及びTraunecker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

40

異なる実施態様によれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結

50

合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は、例えば、少なくともヒンジの一部、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。特定の実施態様では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C<sub>H</sub>1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

## 【0132】

このアプローチ法のある実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

20

他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。界面は抗体定常ドメインのC<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

## 【0133】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公報第91/00360号、国際公報第92/00373号及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

30

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら、Science, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')<sub>2</sub>断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、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、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により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する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

40

## 【0134】

最近の進歩により大腸菌からF a b'-S H断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体を形成する。Shalaby等、J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体F(a b')<sub>2</sub>分子の産生について記述している。各々のF a b'断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビト

50

口で化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、HER2を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

#### 【0135】

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方法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産された。Kostelny等, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のFab'部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, 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を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を結合してなる。従って、一つの断片の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは他の断片の相補的 $V_L$ 及び $V_H$ ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

20

#### 【0136】

##### 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。二量化ドメインは、例えば、Fc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。一実施態様では、多価抗体は、例えば、3ないし8、又は4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(例えば2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はVD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、少なくとも2つ(例えば4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有することができる。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

30

40

#### 【0137】

##### 抗体変異体

一実施態様では、ここで記載の抗体のアミノ酸配列の修飾を考察する。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性が改善されることが望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、適当なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終コンストラクトに達するまでなされるが、その最終コンストラクトは所望の特徴を

50

有する。アミノ酸変化は、配列を作製する時点で対象とする抗体のアミノ酸配列に導入してもよい。

突然変異のための好ましい位置にある抗体の特定の残基又は領域の同定のために有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) Science 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され(例えば、arg、asp、his、lys及びglu等の荷電残基)、中性又は負荷電アミノ酸(例えばアラニン又はポリペプチドアニリン)に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。次いで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更に又は他の置換を導入することにより精密にされる。即ち、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、alaスキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【0138】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び/又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基によって置換された抗体分子に少なくとも一つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異について最も対象となる部位は高度可変領域を含むが、FR変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表Aに示す。これらの置換により生物学的活性に変化が生じる場合、表Aに「例示的置換」と称した又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてよい。

【0139】

表A

10

20

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

## 【 0 1 4 0 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、( a )置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、( b )標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は( c )側鎖の高を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))

40

:

( 1 )無極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

( 2 )無電荷極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

( 3 )酸性 : Asp (D), Glu (E)

( 4 )塩基性 : Lys (K), Arg (R), His(H)

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる :

( 1 )疎水性 : ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

( 2 )中性の親水性 : Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

( 3 )酸性 : Asp、Glu ;

( 4 )塩基性 : His、Lys、Arg ;

50

(5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；及び

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。このような置換された残基も、保存的置換部位か、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

#### 【0141】

一つの種類の置換による変異体は、親抗体(例えばヒト化抗体又はヒト抗体)の一以上の高頻度可変領域残基を置換することを含む。一般に、更なる開発用に選択される結果として得られた変異体の生物学的特性は、それらが生成された親抗体と比べて変更(例えば改善)される。このような置換による変異体を生成する便利な方法では、ファージディスプレイを用いた親和性成熟を使用する。簡単には、複数の高頻度可変領域部位(例えば6~7の部位)を変異させることにより、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生じさせる。このようにして生成された抗体は、各粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質(例えば、M13の遺伝子III産物)の少なくとも一部への融合物として、糸状のファージ粒子から表示される。次いで、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書に開示されるように、その生物学的活性(例えば結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、系統的変異導入法(例えばアラニンスキャニング)を行って、抗原結合に有意に貢献する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又は付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することにより、抗体と抗原との接触点を同定することが有効である。このような接触残基隣接残基は、従来技術に既知の技術による置換の候補であり、それにはここに説明するものが含まれる。そのような変異体が生成されたら、本明細書に記載のものを含む従来技術に既知の技術を用いて変異体パネルのスクリーニングを行い、更なる開発のために一以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体を選択することができる。

#### 【0142】

従来技術に既知の様々な方法により、本抗体の、アミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を調製した。これらの方法は、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)突然変異による調製、PCR突然変異誘発、及び前もって調製された変異体又は抗体の非変異バージョンのカセット変異導入法を含むが、これらに限定されない。

本発明の抗体のFc領域に一以上のアミノ酸修飾を導入することにより、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのアミノ酸位置を含む一以上のアミノ酸位置に一のアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含みうる。

本明細書及び従来技術の教示によれば、一部の実施態様では、本発明の抗体は、対応する野生型の抗体と比較した場合、例えばFc領域内に、一以上の変更を有すると考えられる。それでも、これらの抗体は、その野生型の同等物と比較した場合、治療的有効性に必要なほぼ同一の特性を保持している。例えば、国際公開第99/51642号等に記載されているように、Fc領域に、C1q結合及び/又は補体依存性細胞障害性(CDC)に変化(つまり効果の改善又は低減)をもたらす特定の変更を実施することが考慮される。Fc領域の変異体の他の例に関し、Ducan及びWinterによるNature 322:738-40 (1998)；米国特許第5648260号；同第5624821号；及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドのインターフェースに変更を含む抗体を提供し、この場合前記変更によりヘテロ二量体化が促進及び/又は増長される。これらの変更には、第1のFcポリペプチドへの隆起の導入及び第2のFcポリペプチドへの空洞の導入を含み、前記隆起が前記空洞に配置可能であることにより、第1及び第2のFcポリペプチドの複合が促進される。このような変更を有する抗体の生成方法は、米国特許第5731168号に記載のように、従来技術に既知である。

#### 【0143】

## イムノコンジュゲート

別の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞障害剤にコンジュゲートした抗体を含んでなる、イムノコンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を提供する。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等(編), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキシソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandler等(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler等(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler等(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第 1 3 9 1 2 1 3 号; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等 (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等 (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

### 【 0 1 4 4 】

ゼパリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1モノクローナル抗体と<sup>111</sup>In又は<sup>90</sup>Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等 (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼパリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 米国特許第 4 9 7 0 1 9 8 号; 同第 5 0 7 9 2 3 3 号; 同第 5 5 8 5 0 8 9 号; 同第 5 6 0 6 0 4 0 号; 同第 5 6 9 3 7 6 2 号; 同第 5 7 3 9 1 1 6 号; 同第 5 7 6 7 2 8 5 号; 同第 5 7 7 3 0 0 1 号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuC242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)を、CanAgを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療について試験する。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療用に試験する。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタ

10

20

30

40

50

チン(MMAE)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体 c B R 9 6 (癌細胞上のルイス Y に特異的)及び c A C 1 0 (血液系悪性腫瘍上の C D 3 0 に特異的)(Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

#### 【0145】

イムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(上記)に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデクシン(modectin) A 鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコセセン(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Reが含まれる。抗体及び細胞障害剤の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセセン(trichotheine)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

#### 【0146】

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号;同4248870号;同4256746号;同4260608号;同4265814号;同4294757号;同4307016号;同4308268号;同4308269号;同4309428号;同4313946号;同4315929号;同4317821号;同4322348号;同4331598号;同4361650号;同4364866号;同4424219号;同4450254号;同4362663号;及び同4371533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii)抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii)血漿中で安定、そして(iv)様々な腫

10

20

30

40

50

瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0147】

メイタンシノイド薬剤分子の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3及びDM4が含まれる。メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93：8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等、Cancer Research, 52：127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり $3 \times 10^5$  HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

10

20

【0148】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5208020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが预期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述の非特許文献に開示されている。メイタンシノイドは、限定するものではないが、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体を含む。

30

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235号B1、Chari等、Cancer Research, 52：127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願の米国公開特許第10/960602号に開示されるように調製される。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

40

【0149】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベン

50

ゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。カップリング剤には、限定されるものではないが、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。一実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

#### 【0150】

##### アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号; 同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分DE及びDFを含み、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国公開特許第10/983340号に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に組み込まれる。

#### 【0151】

例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAE及びMMAFである。それ以外の例示的な実施態様には、MMAE又はMMAF、及び様々なリンカー成分(後述で更に説明)であるAb-MC-vc-PAB-MMAF、Ab-MC-vc-PAB-MMAE、Ab-MC-MMAE及びAb-MC-MMAFが含まれる。

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬剤成分は、US 5635483; US 5780588; Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及びPettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863の方法に従って調製されうる。また、Doroni (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日出願の米国公開特許第10/983340号も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる(例えば、リンカー及びモノメチルパリン化合物、例えばMMAE及びリンカーにコンジュゲートしたMMAFの調整方法を開示している)。

#### 【0152】

##### カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコ

10

20

30

40

50

モルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 $^1\text{I}$ 、 $^2\text{I}$ 、 $^3\text{I}$ 、N-アセチル- $^1\text{I}$ 、PSAG及び $^1\text{I}$  (Hinman等, *Cancer Research*, 53:3336-3342(1993)、Lode等 *Cancer Research*, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

10

## 【0153】

## 他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*Saponaaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

20

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成されるイムノコンジュゲートをさらに考察する。

30

## 【0154】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば $\text{t c}^{99\text{m}}$ 又は $\text{I}^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $\text{t c}^{99\text{m}}$ 又は $\text{I}^{123}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 及び $\text{In}^{111}$ は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

40

## 【0155】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシン

50

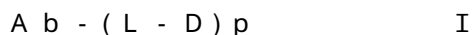
イミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等、Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (succinimidyl-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

#### 【0156】

##### 抗体薬剤コンジュゲートの調製

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態及び試薬を用いて調製される：(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシラート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIA B」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に出願した米国公開特許第10/983340号を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

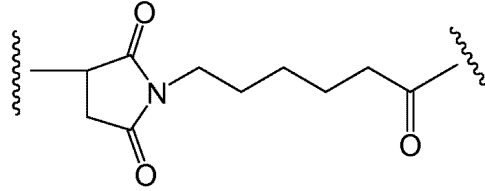
#### 【0157】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然

に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C 及び D 又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

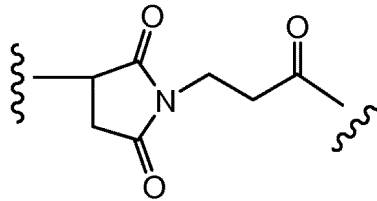
【 0 1 5 8 】

例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線は A D C の他の構成成分への共有結合の部位を示す) :



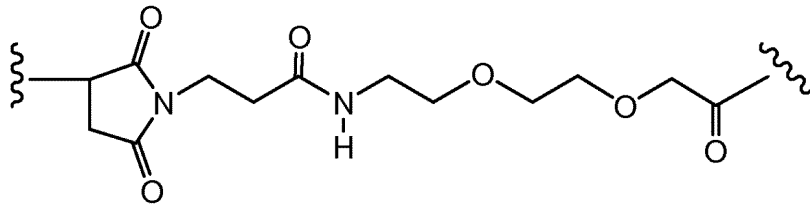
MC

10



MP

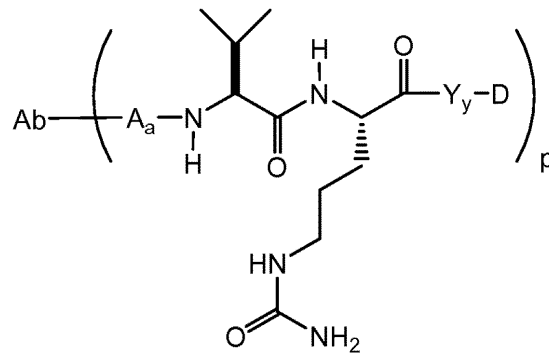
20



MPEG

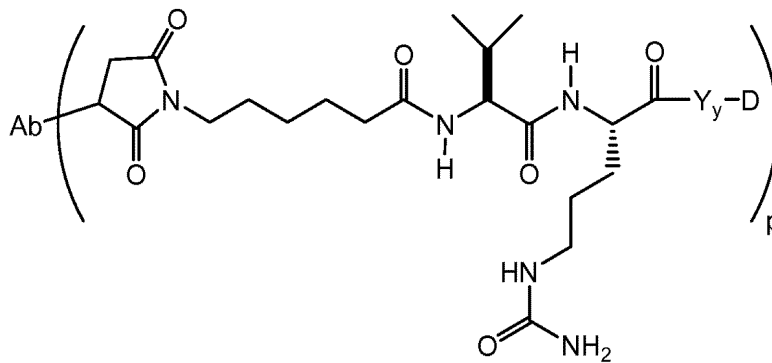
【 0 1 5 9 】

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(A b)及びリンカーが示されており、p は 1 ~ 約 8 である) :



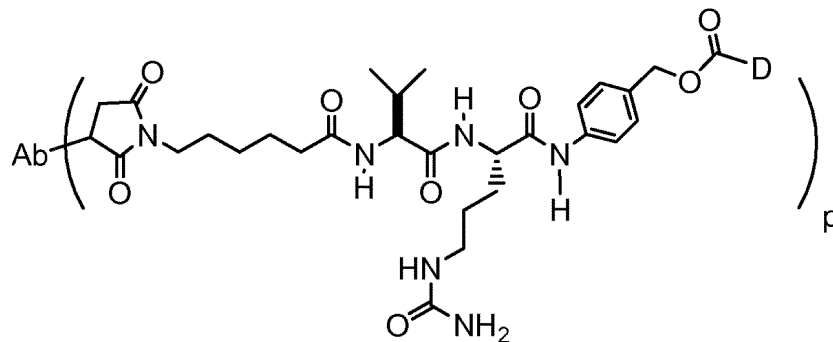
Val-cit

40



MC-val-cit

10



MC-val-cit-PAB

20

## 【0160】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及びリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

30

## 【0161】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & S

40

50

troh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146 ; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

#### 【0162】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリアルヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えば NHS エステル、HOBT エステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物)；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNA の長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

#### 【0163】

抗体(Ab)-MC-MMAE は、本明細書中に提供される何れかの抗体と以下のMC-MMAE とのコンジュゲートにより調製されうる。抗体は、pH 8.0 の 500 mM ホウ酸ナトリウムと 500 mM 塩化ナトリウムに溶解して、過剰量の 100 mM ジチオトレイトール(DTT)で処理した。37 °C で30分インキュベートした後、Sephadex G25 樹脂で溶出することによって、バッファーを交換して、1 mM DTPA を含む PBS にて溶出した。溶液の 280 nm の吸光度と DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) と反応させて 412 nm の吸光度の測定によるチオール濃度から減少した抗体濃度を決定することによって、チオール/Ab 値を調べる。PBS に溶解した減少した抗体を氷上で冷やす。薬剤リンカー試薬であるマレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、すなわちMC-MMAE を DMSO に溶解して、濃度がわかっているアセトニトリルと水にて希釈して、冷やした減少した抗体 2H9 を含む PBS に添加する。およそ1時間後に、過剰量のマレイミドを添加して反応を止め、反応していない抗体チオール基を覆った。反応混合物を遠心限外濾過によって、濃縮し、2H9-MC-MMAE を精製して、PBS の G25 樹脂による溶出によって、脱塩して、無菌条件下で 0.2 mm のフィルターに濾過して、保存のために凍結した。

#### 【0164】

抗体-MC-MMAF は、Ab-MC-MMAE の調製のためのプロトコールによるMC-MMAF と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製されうる。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAE は、Ab-MC-MMAE の調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAE と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-MC-val-cit-PAB-MMAF は、Ab-MC-MMAE の調製のためのプロトコールによるMC-val-cit-PAB-MMAF と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。

抗体-SMCC-DM1 は、以下のSMCC-DM1 と本明細書において、提供される何れかの抗体とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、(スクシンイミジル4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) で誘導体化して、SMCCリンカーを導入する。具体的には、50 mM リン酸カリウム / 50 mM 塩化ナトリウム / 2 mM EDTA、pH 6.5 中で、7

10

20

30

40

50

．5モル等量のSMCC(DMSO中に20mM、6.7mg/ml)にて20mg/mlの抗体を処理した。室温のアルゴン下で2時間攪拌した後に、反応混合物を、50mMリン酸カリウム/50mM塩化ナトリウム/2mMEDTA、pH6.5にて平衡化したSephadex G25カラムにてろ過する。抗体を含有する分画をプールして、アッセイする。

#### 【0165】

このようにして調製される抗体-SMCCは、50mMリン酸カリウム/50mM塩化ナトリウム/2mMEDTA、pH6.5で希釈して、最終濃度およそ10mg/mlとし、10mMのDM1の溶液を含むジメチルアセトアミドにて反応させる。反応は、16.5時間に亘り、室温、アルゴン下にて攪拌して行う攪拌して行う。コンジュゲート反応混合物は、pH6.5の1xPBSによるSephadex G25ゲル濾過カラム(1.5x4.9cm)にろ過する。252nmと280nmの吸光度で測定されるように、抗体に対するDM1薬剤の比率(p)はおよそ2~5でありうる。

Ab-SPP-DM1は、本明細書中で提供される何れかの抗体と以下のSPP-DM1とのコンジュゲートにより調製される。精製された抗体は、ジチオピリジル基を導入するために、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエートによって、誘導体化される。NaCl(50mM)及びEDTA(1mM)を含有する44.7mlの50mMリン酸カリウムバッファー(pH6.5)中の抗体(376.0mg、8mg/ml)を、SPP(2.3mlエタノール中に5.3のモル等量)にて処理した。室温、アルゴン下にて90分間インキュベートした後、反応混合物を、35mMのクエン酸ナトリウム、154mM NaCl、2mMEDTAバッファーにて平衡化したSephadex G25カラムにろ過する。抗体含有分画をプールして、アッセイした。抗体の修飾の程度は、上記の通りに決定される。

#### 【0166】

抗体-SPP-Py(およそ10mmolの解放可能な2-チオピリジン基)を上記の35mMクエン酸ナトリウムバッファー、pH6.5にて希釈して、およそ2.5mg/mlの終濃度にした。次いで、DM1(1.7等量、17mmole)を含む3.0mMのジメチルアセトアミド(DMA、最終反応混合物中3%v/v)を抗体溶液に添加する。およそ20時間、室温、アルゴン下にて反応を行う。反応物を、35mMクエン酸ナトリウム、154mM NaCl、pH6.5にて平衡化したセファクリルS300ゲル濾過カラム(5.0cmx90.0cm、1.77L)に流す。流速はおよそ5.0ml/分よく、65の分画(各々20.0ml)を回収する。抗体分子当たりの結合されるDM1薬剤分子の数(p')は、252nm及び280nmの吸光度を測定して決定し、抗体当たりのDM1薬剤成分をおよそ2~4としてもよい。

抗体-BMPEO-DM1は、本明細書中に示される何れかの抗体と以下のBMPEO-DM1とのコンジュゲートにより調製される。抗体を、ビスマレイミド試薬BM(PEO)4(Pierce Chemical)にて修飾して、抗体の表面上の反応していないマレイミド基を除去する。これは、BM(PEO)4を50%のエタノール/水混合液に10mMの濃度になるまで溶解して、およそ1.6mg/ml(10マイクロモル)の濃度でリン酸緩衝食塩水に抗体を含有する溶液に10倍のモル過剰量を加え、1時間反応させて、抗体-リンカー中間生成物である2H9-BMPEOを形成させることにより達成される。150mMのNaClバッファーと0mMのクエン酸塩、pH6のゲル濾過(HiTrap column, Pharmacia)によって、過剰なBM(PEO)4を取り除く。およそ10倍のモル過剰DM1を、ジメチルホルムアミド(DMF)を用いて薬剤成分試薬を溶解してもよい。反応混合物を終夜反応させて、PBSでゲル濾過ないし透析を行って反応していないDM1を取り除く。PBSのS200カラムによるゲル濾過を用いて、高分子量凝集塊を取り除いて、精製された2H9-BMPEO-DM1に供給する。

#### 【0167】

抗体誘導体

10

20

30

40

50

本発明の抗体を更に変更し、従来技術に既知で容易に入手可能な非タンパク質性成分を更に含有させる。一実施態様では、抗体の誘導体化に適した成分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されないが、ポリエチレングリコール(P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキサラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサラン、エチレン/マレイン無水物共重合体、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムな共重合体)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレ  
10

別の実施態様では、放射線照射に暴露することにより選択的に加熱することができる非タンパク質性部分と抗体とのコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分はカーボンナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11  
20 605 (2005))。照射はどのような波長のものでよく、限定するものではないが、通常の細胞を傷つけないが、非タンパク質性の部分を抗体-非タンパク質性部分に近接する細胞が死滅する温度まで加熱する波長を含む。

#### 【0168】

##### 薬学的製剤

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharm  
30 aceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osool, A. Ed. (1980))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムク  
40 ロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A等のキレート化  
40 剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>又はポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0169】

ここでの製剤は、限定しないが、互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものを含め、治療される特定の徴候のために必要ならば一以上の活性化化合物も含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒  
50

子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

#### 【0170】

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の免疫グロブリンを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37%の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

#### 【0171】

使用

本発明の抗体を、例えば、インビトロ、エクスピボ及びインビボの治療法に用いてもよい。本発明の抗体をアンタゴニストとして使用し、インビトロ、エキソピボ及び/又はインビボにおいて、特定の抗原活性を部分的又は完全に遮断することができる。更に、本発明の少なくともいくつかの抗体は、他の種由来の抗原活性を中和することができる。従って、本発明の抗体を使用することにより、抗原を含む細胞培養物、或いはヒト被験者又は本発明の抗体と交差反応する抗原を有する他の哺乳類の被験体(例えばチンパンジー、ヒヒ、マモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)において特定の抗原活性を阻害することができる。一実施態様では、本発明の抗体は、抗体に抗原を接触させて抗原活性を阻害することにより、抗原活性を阻害するために使用することができる。一実施態様では、抗原はヒトタンパク質分子である。

一実施態様では、本発明の抗体は、抗原活性が有害な疾患に罹患している被験体の抗原を阻害する方法に使用することができる。この方法では、本発明の抗体を被験体に投与することにより、被験体の抗原活性を阻害する。一実施態様では、抗原はヒトタンパク質分子であり、被験体はヒト被験者である。或いは、被験体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現している哺乳動物とすることができる。更には、対象は、(例えば、抗原の投与によるか、又は抗原導入遺伝子の発現により)抗原が導入された哺乳動物でもよい。本発明の抗体は、治療的目的のためにヒト被験者に投与することができる。更に、獣医学的目的のために、又はヒトの疾病の動物モデルとして、当該抗体に交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳動物(例えば霊長類、ブタ又はマウス)に本発明の抗体を投与することができる。動物モデルに関して言えば、このようなモデルは、本発明の抗体の治療有効性を評価するために有用であり得る(例えば、投与量及び時間経過の試験)。本発明の抗体は、REL<sup>T</sup>の異常発現及び/又は活性に関連する疾病、障害又は症状を、治療、阻害、進行を遅延、再発を予防/遅延、寛解、或いは予防に使用することができ、前記疾病、障害又は症状には、細胞増殖性疾患、感染症、免疫性/炎症性疾患、及び他のインターフェロン関連の疾患が含まれるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0172】

一態様では、本発明の阻止抗体は、RELTに特異的に結合して、RELTと一又は複数のRELTリガンドとの相互作用を阻止する又は干渉することによって正常なRELT活性を阻害するようにし、それによって対応するシグナル伝達経路及びその他関連の分子又は細胞イベントを阻害する。

ある実施態様では、一の細胞障害性剤とコンジュゲートした抗体を含んでなるイムノコンジュゲートを患者に投与する。いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲート及び/又はそれが結合する抗原が細胞に内在化されていると、結合する標的細胞を殺す際のイムノコンジュゲートの治療効果が増す。一実施態様において、細胞障害性剤は標的細胞内の核酸を標的とするか又は妨げる。このような細胞障害性剤の例には、本明細書に記載の何れかの化学療法剤(例えばメイトンシノイド、又はカリケアマイシン)、放射性同位元素、又はRNA分解酵素ないしDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

## 【0173】

本発明の抗体は、単独で、又は、他の組成物と組み合わせて治療に用いることができる。例えば、本発明の抗体は、他の抗体、及び/又はアジュバント/治療薬(例えばステロイド)と同時に投与してもよい。例えば、本発明の抗体は、治療計画において、例えば細胞障害性疾患、感染症、免疫性/炎症性疾患、及び他のインターフェロン関連の疾患を含む、本明細書に記載するいずれかの疾病の治療において、抗炎症薬及び/又は消毒薬と組み合わせてもよい。上記の併用治療には、併用投与(2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に包含される)及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体は補助治療(一又は複数)の前及び/又はその後投与することができる。

本発明の抗体(及び補助治療薬)は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体を、特に抗体の用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

## 【0174】

抗体の調製及び投与において、本発明の抗体の結合標的の位置を考慮することができる。結合標的が細胞内分子である場合、本発明の特定の実施態様では、結合標的が位置する細胞に導入される抗体又はその抗原結合断片が提供される。一実施態様では、本発明の抗体は、細胞内に細胞内抗体として発現させることができる。本明細書で使用する「細胞内抗体(intrabody)」という用語は、Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); 米国特許第6004940号及び同第6329173号; 米国公開特許第2003/0104402号及び国際公開第2003/077945号に記載のように、標的分子に特異的に結合することができる、細胞内で発現される抗体又はその抗原結合タンパク質を指す。細胞内抗体の細胞内発現は、標的細胞内に、所望の抗体をコードする核酸又はその抗原結合タンパク質(当該抗体又は抗原結合断片をコードする遺伝子に通常関連付けられる野生型リーダー配列及び分泌性シグナルを欠いている)を導入することにより達成することができる。細胞に核酸を導入するための何らかの標準的方法を使用することができ、これらの方法には、限定するものではないが、微量注入、弾道的注入、電気泳動、リン酸カルシウム沈降、リポソーム、及び対象の核酸を有するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス及びワクシニアベクターによる形質移入が含まれる。本発明の抗RELT抗体の全部又は一部をコードする一以上の核酸を標的細胞に送達することにより、RELTに細胞内で結合し、一以上のRELT媒介性細胞経路を調節できる、一以上の細胞内抗体を発現させることができる。

別の実施態様では、内部移行する抗体が提供される。抗体は、細胞内への抗体の送達を増強する特定の特徴を有することができるか、又はそのような特徴を有するように修飾することができる。これを達成する技術は従来技術に既知である。例えば、抗体のカチオン化は、細胞内へのその取り込みを容易にすることが知られている(例えば、米国特許第6

10

20

30

40

50

703019号参照)。リポフェクション又はリポソームも、細胞内に抗体を送達するために使用することができる。抗体断片を使用する場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の抑制性断片が一般に有利である。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的のタンパク質配列に対する結合能を有するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成することができる、及び/又は組換えDNA技術によって製造することができる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 90: 7889-7893 (1993)を参照されたい。

#### 【0175】

標的細胞への修飾因子ポリペプチドの移入は、従来技術に既知の方法によって増強することができる。例えば、HIV Tat又はアンテナペディアホメオドメインタンパク質由来の配列のような特定の配列は、細胞膜全体に異種タンパク質の効率的な取り込みを導くことができる。例えば、Chen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329参照。

結合標的が脳に位置する場合、本発明の特定の実施態様は、血液脳関門を横切る抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の神経変性疾患は、血液脳関門の透過性の増大に関連しており、これにより抗体又は抗原結合断片を脳に容易に導入できる。血液脳関門が完全に保持されているとき、そこに分子を搬送するための複数の従来技術に既知の手法が存在し、それらには、限定するものではないが、物理的方法、脂質に基づく方法、及びレセプターとチャンネルに基づく方法が含まれる。

#### 【0176】

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送する物理的方法には、限定するものではないが、血液脳関門を完全に包囲すること、又は血液脳関門に開口部を形成することが含まれる。包囲法には、限定するものではないが、脳への直接注入(例えば、Papanastassiou等, Gene Therapy 9: 398-406 (2002))、間質性注入/対流強化送達(例えば、Bobo等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)参照)、及び脳への送達装置の移植(例えば、Gill等, Nature Med. 9: 589-595 (2003); 及びGliadel Wafers<sup>TM</sup>, Guildford Pharmaceutical参照)が含まれる。関門に開口を形成する方法には、限定するものではないが、超音波(例えば、米国特許出願公開第2004/0038086号参照)、浸透圧(例えば、高浸透圧性マンニトールの投与による(Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)))、例えば、ブラジキニン又はパーミアライザーA-7による透過性化(例えば、米国特許第5112596号、同第5268164号、同第5506206号、及び同第5686416号参照)、及び抗体又は抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門にまたがるニューロンの形質移入(例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号)が含まれる。

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送する脂質に基づく方法には、限定されるものではないが、血液脳関門の血液内皮上のレセプターに結合する抗体結合断片に連結されるリポソームに抗体又は抗原結合断片を封入すること(例えば、米国特許出願公開第2002/0025313号参照)、及び低密度リポタンパク質粒子(例えば、米国特許出願公開第2004/0204354号参照)、又はアポリポタンパク質E(例えば、米国特許出願公開第2004/0131692号参照)中の抗体又は抗原結合断片をコーティングすることが含まれる。

#### 【0177】

血液脳関門に抗体又は抗原結合断片を搬送するレセプター及びチャンネルに基づく方法には、限定するものではないが、グリコシルコイド遮断薬を用いて血液脳関門の透過性を増大させること(例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、同第2003/0162695号、及び同第2005/0124533号参照)、カリウムチャンネルを活性化させること(例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号参照)、ABC薬の搬送を抑制すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0073713号参照)、抗体をトランスフェリンでコーティングし、一以上のトランスフェリンレセプター

一の活性を調節すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号参照)、及び抗体のカチオン化(例えば、米国特許第5004697号参照)が含まれる。

本発明の抗体組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1~99%で、或いは経験的/臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

10

#### 【0178】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$ )の抗体を、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができる。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

20

30

#### 【0179】

##### 製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療、予防及び/又は診断するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択された症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、(a)本発明の抗体を含有する組成物の中に収容する第一の容器;と(b)更なる細胞障害剤又はそれ以外の治療薬を含有する組成物の中に収容する第二の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、組成物を特定の症状の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくはは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

40

#### 【0180】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上記に示す一般的な説明により、様々な

50

他の実施態様が実施しうることは理解される。

【実施例】

【0181】

実施例1： 抗RELTモノクローナル抗体の産生と特徴付け

(a) ライブラリスクリーニング

既に記載されているように(Lee等, J. Mol. Biol. 340: 1073-1093 (2004)及び米国特許公開第2005-0106667号)、ヒト化Fab'2を発現するファージディスプレイクローンライブラリを、RELT-Fc融合タンパク質を結合する能力についてスクリーニングした。ファージディスプレイ抗体ライブラリは、3つすべての重鎖CDRにランダム化したアミノ酸を含有し、ヒト化抗体4D5をベースとした。全体的な重鎖及び軽鎖の可変領域コンセンサスフレームワークはそれぞれ図1及び2に示し、4D5抗体のフレームワーク領域は図3に示す。図4に示すように、4D5フレームワーク配列の特定の変異体も公知である。

4サイクルの選別の後、8つのポジティブクローンを単離した。ファージFab'2クローンは、PCRによって関連の断片を増幅し、IgG1コンストラクトにその増幅断片をスプライシングさせて完全なヒトIgG1を産生することによって再編成した。そして、8つの抗RELT mAbをCHO細胞上清から精製し、ビオチン(Pierce)にて標識した。8つのCHO細胞株の生産性はおよそ8000ng/ml~およそ18000ng/mlの範囲で変化し、mAb H7は最も少ない量で産生され、mAb F7は最も多い量で産生された。

各々のmAbの重鎖及び軽鎖を配列決定した。重鎖のCDRは図5に示す。各々のmAbの軽鎖は、修飾したヒトモノクローナル抗体4D5-8の軽鎖配列(配列番号:2)と同一であった。

【0182】

(b) 抗RELT mAbの特徴付け

(1) 細胞表面での結合

細胞表面でRELTを発現している細胞に対する各々の抗体の結合を評価した。mock(コントロール)又はマウスRELT cDNAを形質移入した仔ハムスター腎臓(BHK)細胞を氷上で30分かけて各抗RELT抗体にて別々に染色した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて洗浄して、その後PE標識抗ヒトIgG抗体とともにインキュベートした。細胞の蛍光強度は、FACSCalibur(BD Science)の後にCellQuest(BD Science)分析を行って評価した。

8つの抗体はいずれもコントロールBHK細胞に特異的に結合しなかったが、各抗体はRELT cDNAを形質移入したBHK細胞を特異的に結合した(図6参照)。また、上記のBHK細胞の形質移入及び結合について記載されたのと同じプロトコルを用いると、8つのうち5つの抗体(F4、C10、H7、H9及びH11)が、RELTを発現するマウス脾細胞に特異的に結合したことが観察された(図7)。マウスRELT発現脾細胞に最も強く結合した3つの抗RELT mAb(H7、H9及びH11)は、relt-/-マウスのマウス脾細胞に結合しなかった(図7、下段)。

【0183】

(2) NF- $\kappa$ B活性化と抗RELT抗体の関連

細胞のNF- $\kappa$ B活性化に対する抗RELT抗体の効果を評価した。HEK293細胞に、示した量のRELT-xedar cDNA(マウスRELTの細胞外ドメイン及びxedarの細胞質ドメイン)を形質移入した。12時間後、各々の抗RELT抗体は10 $\mu$ g/mlの濃度で別々の培養物に加え、さらに細胞を24時間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、二重レポーターアッセイキット(Dual-Luciferase(登録商標) Reporter Assay Systems)(Promega)で測定した。各々の抗RELT抗体は、異なる程度ではあるが、細胞におけるNF- $\kappa$ B産生を用量に依存して刺激した(図8)。F4抗RELT抗体で最も小さい刺激が観察され(5ngのRELT-xedarでおよそ7倍、25ngのRELT-xedarでおよそ22倍)、C10、H9及びH11 mAbで最も強い刺激が観

10

20

30

40

50

察された(5 ngのRELT-xedarでおよそ20倍、25 ngのRELT-xedarでおよそ50~60倍)。

【0184】

(3) マウスRELTに対する抗RELT抗体の親和性

RELTに対する各々の抗RELT抗体の親和性を決定するために、設定した量のマウスRELTの存在下で各々固定した抗RELT抗体についてファージベースの競合結合ELISAを、クローンごとに行った。96ウェルMaxisorpイムノプレート(NUNC)を2 μg/mlの濃度のマウスRELTを含むPBSにて4時間終夜をかけてコートし、0.5%BSA及び0.05%Tween20を含むPBS(「PBT」)にて室温で2時間かけてブロックした。段階希釈した抗RELT抗体をディスプレイするファージを含むPBTを抗原をコートしたプレート上で室温で15分間インキュベートした。プレートを0.05%Tween20を含むPBS(「PBST」)にて洗浄した。結合したファージを、PBTにて1:5000に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ(Amersham Pharmacia)標識抗M13モノクローナル抗体にて検出し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質(TMB、Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD)とおよそ5分間反応させ、1.0MのH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>にて消光して、450nmの分光光度を読んだ。4nM(mAb H11)から250nM(mAb H7)の範囲の抗体の親和性を表Bに示す。

表B：抗RELT抗体親和性データ

クローン#	K <sub>d</sub> (M)
C2	8 × 10 <sup>-8</sup>
C10	2 × 10 <sup>-8</sup>
E5/E7	1 × 10 <sup>-7</sup>
F4	2 × 10 <sup>-7</sup>
F5	1 × 10 <sup>-7</sup>
H7	2.5 × 10 <sup>-7</sup>
H9	4 × 10 <sup>-8</sup>
H11	4 × 10 <sup>-9</sup>

【0185】

(4) BIAcore(登録商標)分析

さらに、RELTに対する抗RELTモノクローナル抗体H11の親和性は、BIAcore(登録商標)3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた表面プラズモン共鳴(SRP)分析によって評価した。カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5、BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗RELT抗体H11は、10mM酢酸ナトリウム(pH4.8)にて5 μg/mlの濃度に希釈した。およそ500反応単位(RU)の抗体がフローセル表面にカップリングするまで、希釈したH11抗体を5 μl/分の流速で誘導体化CM5チップ表面に注入した。反応していない基を1Mエタノールアミンの注入によってブロックした。段階希釈したマウスhis-タグRELT(7.5nMから500nM)を含む0.05%Tween20含有のPBSを、25°Cの一定温度、25 μl/分の流速でH11-固定フローセルに注入した。単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、観察された結合曲線から会合速度(k<sub>on</sub>)と解離速度(k<sub>off</sub>)を得た。平衡解離定数(K<sub>d</sub>)をk<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>の比として算出した。抗RELT抗体H11-マウスRELT相互作用の速度は、以下の通りであった。k<sub>on</sub>: 1.52 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; k<sub>off</sub>: 1.2

$4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;そして、 $K_d : 8.13 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

【0186】

(5) ヒトRELTと抗RELT抗体の交差反応性

ヒトRELTを特異的に認識するH11抗RELT抗体の能力を評価した。HEK293細胞に、コントロールベクター又はヒトRELT cDNAを形質移入した。48時間のインキュベーションの後、形質移入した細胞を回収し、ビオチン化した抗RELT抗体H11にて氷上で30分かけて染色した。細胞をPBSにて洗浄して、アビジン-PEと示したFITC-又はAPC-標識抗体にて染色した。細胞の蛍光強度はFACS分析にて評価した(FACSCalibur (BD Science)の後にCellQuest分析(BD Science))。図10A及び10Bに示すように、抗体H11はヒトRELTを特異的に認識した(図10Aを図10Bと比較する)。

10

【0187】

実施例2：免疫細胞上のRELTの発現

抗RELT抗体H11は、T細胞、B細胞及び脾細胞を含むマウスの異なる野生型免疫細胞上のRELTの発現の程度を同定するためのツールとして使いた。T細胞は磁気ビーズ(Miltenyi)によってC57/BL6マウス脾臓から精製し、抗CD3及び抗CD28( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、IFN- $\gamma$  ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )、IFN- $\alpha$  ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )、IL-2 ( $100 \text{ U}/\text{mL}$ )、IL-4 ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )、IL-6 ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )、又はIL-12及びIL-18 ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )とともに48時間培養して、異なるT細胞サブタイプへの分化を誘導した(図11を参照)。その後、細胞をビオチン化した抗RELT抗体H11とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞をPBSにて洗浄し、アビジン-PEとともにインキュベートした。細胞の蛍光強度は、FACSCalibur (BD Science)の後にCellQuest分析(BD Science)を行って評価した。抗体H11が天然のT細胞と各々の処置したT細胞群に特異的に結合したことから、T細胞及び分化したT細胞がRELTを発現することが示唆された。

20

B細胞は磁気ビーズ(Miltenyi)によってC57/BL6マウス脾臓から精製し、抗IgM ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、抗CD40 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、LPS ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、又はIL-4 ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )とともに48時間培養して、異なるB細胞群への分化を誘導した(図12を参照)。その後、細胞をビオチン化した抗RELT抗体H11とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞をPBSにて洗浄し、アビジン-PEとともにインキュベートした。細胞の蛍光強度は、FACSCalibur (BD Science)の後にCellQuest分析(BD Science)を行って評価した。抗体H11が天然のB細胞及びいずれの処置したB細胞群にも特異的に結合しなかったことから、B細胞も分化したB細胞もRELTを発現しないことが示唆された。

30

脾細胞は、C57/BL6マウスから単離して、ビオチン化した抗RELT抗体H11にて氷上で30分かけて染色した。細胞をPBSにて染色して、アビジン-PEと示したFITC-又はAPC-標識抗体(抗CD3、抗B220、抗CD11b、及び/又は抗Gr-1)にて染色した。細胞の蛍光強度はFACSCalibur (BD Science)の後にCellQuest分析(BD Science)を行って標識した。結果を図13に示す。抗体H11がT細胞及びマクロファージに結合したことから、これらの細胞群がRELTを発現することが示唆される。B細胞、NK細胞又は好中球へのH11の強い結合が観察されなかったことから、これらの細胞群はRELTを発現しないことが示唆される。

40

【0188】

実施例3：マウスにおけるRELTの標的破壊と免疫細胞発達に対するRELT破壊の作用

(a) RELTが破壊されたマウスの作製

RELT欠損マウスは、RELTのアミノ酸17~210をコードするエキソンII~Vを取り除くように設定したターゲティングベクターによって作製された(図14Aを参照)。ターゲティングベクターは、129/SvJライブラリ(Incyte Genomics)から単離したゲノムreltクローンをを用いて構築し、129 R1胎仔幹(ES)細胞に電気穿

50

孔した。ヘテロ接合のES細胞クローン18B7は、サザンブロッティングによって同定し、C57BL/6N胚盤胞に微量注入した。キメラの同腹仔をC57BL/6Nマウスに戻し交配した。マウスはPGK-neo選別カセットを保持した。生殖系列のrelt破壊はPCR、サザンブロッティング(図14B)及びTリンパ球のフローサイトメトリー分析(図11C)によって確認した。製造業者の指示に従って、Expand Long Template PCRシステムキット(Roche)、5'プライマー AGTAGAAGGTGGCGCAAGG(配列番号:69)及び3'プライマー CTGCCACAGACAAGATGGTAATCTC(配列番号:70)を用いてPCRを行った。ターゲティングコンストラクトの5'配列を結合する図14Aに示すプローブに、SspI消化DNA及びNotI消化DNAをハイブリダイズさせることによってサザンブロットを行った。図14Bに観察される12.9及び7.1kbのDNA断片はそれぞれ野生型及び変異体relt対立遺伝子に対応する。フローサイトメトリー分析は上記の実施例1(b)(1)に記載のように行った。

reltを破壊されたマウスは、予想されるメンデル頻度で生存可能であり、繁殖し、出生した。その後のすべての実験は、Genentech施設内審査委員会によって承認されたプロトコルを用いて、6~14週齢のrelt-/-マウス及びrelt+/+マウスにより行った。

#### 【0189】

##### (b) RELTが破壊されたマウスにおけるT、B及びNK細胞発達の分析

天然のTリンパ球はRELTを発現することが知られている(図11、図15Bを参照)。したがってrelt-/-のTリンパ球の割合を調べた。relt-/-マウス及びrelt+/+マウスの脾臓を細かく切り刻み、既に報告されているように(Nakano等, J. Exp. Med. 194: 1171-1178 (2001))、1mg/mLのコラゲナーゼA(Roche)にて消化した。表面RELT発現のフローサイトメトリー分析のために、20mMのEDTA-PBSとともに30分間インキュベートして、抗RELT mAbエピトープのタンパク質分解を避けることによって脾細胞を調製した。細胞を抗CD16/32(2.4G2)にてブロックし、その後以下の抗体の様々な組合せにて二重又は三重に染色した。CD3(145-2C11)、CD4(RM4-5)、CD8(53-6.7)、CD11b(M1/70)、CD11c(HL3)、CD45RB(16A)、CD80(IG10)、CD86(GL1)、I-Ab(AF6-120.1)、B220(RA3-6B2)、及びDX5(すべてBD Pharmingenより入手)。ストレプトアビジン-PE(BD Pharmingen)の添加によって、ビオチン化した抗体結合を明らかにした。ヨウ化プロピジウムを用いて死細胞を排除した。細胞は、FACS Caliberシステム(BD Science)を用いて分析した。

概してrelt-/-マウスとrelt+/+マウスとの間のT細胞数又は脾臓免疫細胞間のT細胞の比例的発現量に顕著な違いは観察されなかった。胸腺、リンパ節及び脾臓のT細胞数はrelt-/-マウスとrelt+/+マウスとの間で比較できるものであった(図15A)。CD4、CD8、CD25及びCD44への抗体にて染色した細胞のフローサイトメトリー分析により、様々なT細胞サブセットの発現量に違いが見られなかった(図15Cを参照)。

#### 【0190】

抗CD3に応答した場合のrelt-/-細胞とrelt+/+細胞のTリンパ球の増殖は、トリチウムで標識したチミジン取込みアッセイによって評価した。野生型マウスとrelt-/-マウスから精製したT細胞は、示した量の抗CD3抗体単独(図15D、左パネル)、又は示した量の抗CD3抗体と10µg/コーティング溶液mLの濃度でプレートにアプライした抗CD28抗体(図15D、右パネル)とともに培養した。抗体(一又は複数)に応答した場合の細胞の増殖は、<sup>3</sup>H-チミジン取込みによって測定した(Coligen等, eds., Current Protocols in Immunology, New York: Wiley, 1991を参照)。結果から、relt-/-T細胞は野生型T細胞と同様に増殖したことが示された。また、relt-/-Tリンパ球とrelt+/+Tリンパ球ではIL-2及びIFN- $\gamma$ の産生に差異は表れなかった。まとめると、前述のアッセイのすべての結果から、RELTが正常なT細胞発達及び増殖のために必要でないことが示唆された。

Bリンパ球とナチュラルキラー(NK)細胞は細胞表面にRELTをほとんど発現せず、あったとしても極僅かである(図15B、真ん中及び右のパネル、図12及び図13)。フローサイトメトリー分析によって測定されるように(図15A)、Bリンパ球とNK細胞の数は、relt<sup>-/-</sup>マウスとrelt<sup>+/+</sup>マウスの脾臓において類似していた。CD25、CD44、B220、IgM、CD5、CD11b、CD21、CD23及びCD43に対する抗体による染色の後の、骨髄、脾臓、リンパ節及び腹腔腔の細胞の広範囲フローサイトメトリー分析では、relt<sup>-/-</sup>マウスとrelt<sup>+/+</sup>マウスとの間に差異は見られなかった。結果から、RELTが体液性免疫において重要な役割を果たさないことが示唆された。

#### 【0191】

##### (c) RELTが破壊されたマウスにおける抗体産生の分析

マウスを評価して、一又は複数の抗体サブタイプの産生がreltの破壊によって損なわれたか否かを決定した。relt<sup>-/-</sup>マウスとrelt<sup>+/+</sup>マウスは、T依存性抗原2,4-ジニトロフェノール-コンジュゲート卵白アルブミン(DNP-OVA)にて免疫化した。2mlの0.1%水酸化アルミニウム吸着性ゲルを含む注入用溶液(#8000-01, Intergen Company)と、0.09975mg/mlのDNP-OVAを含むPBS溶液を作製し、溶液を30分間混合して、確実にアルミニウムに抗原を吸着させた。野生型及びrelt<sup>-/-</sup>ノックアウトのマウス(各々およそ20gの重さ)は、0日目に100µlの注入用溶液を腹腔内投与して免疫化し、10日目に2回目の100µl注入を行って追加免疫した。注入したマウスから0日目と14週目に血清試料を採取し、DNP-BSAコートマルチウェルプレートにて特定の抗体力価についてELISA分析した。等量の抗原特異的IgG1、IgG2a、IgG3、IgM及びIgE抗体が両マウス集団から産生されたことから(図16A-16Eを参照)、RELTが体液性免疫の発達において重要な役割を果たさないことが示唆された。

#### 【0192】

##### (d) RELTが破壊されたマウスにおける樹状細胞発達の分析

RELTの非存在下ではT、B及びNK細胞の発達において顕著な異常は観察されなかった。したがって、更なる免疫細胞集団、特に樹状細胞において試験した。relt<sup>-/-</sup>マウス及びrelt<sup>+/+</sup>マウスの脾臓を細かく切り刻み、前記のように1mg/mlのコラゲナーゼA(Roche)にて消化した。ビオチン化した抗CD11cと抗ビオチンMACSビーズ(Miltenyi)を用いて、樹状細胞を同定した。樹状細胞の表面マーカーであるCD11cに対する抗体にてコラゲナーゼ処理した脾細胞を染色すると、relt<sup>+/+</sup>同腹仔コントロールと比較してrelt<sup>-/-</sup>マウスの樹状細胞は有意に多いことが明らかとなった(図17A)。relt<sup>-/-</sup>マウスの増加した樹状細胞数は統計解析によっても明らかであった(図17B)。

CD11c<sup>+</sup>DCは、CD11bとB220の細胞表面発現によって2つのサブ集団、cDC(CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>)とpDC(CD11b<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>)に分類することができる(Hochrein等, Hum. Immunol. 63: 1103-10 (2002); Nakano等, J. Exp. Med. 194: 1171-8 (2001); Asselin-Paturel等, Nat. Immunol. 2: 1144-50 (2001))。上記のように調製した脾細胞をビオチン化した抗CD11bと抗B220にて染色し、MACSビーズ(Miltenyi)にて枯渇させてpDC及びcDCについて濃縮した。さらに、FACS Van tag e(BD Science)分類を用いて、pDC(CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>)とcDC(CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>)集団を精製した。フローサイトメトリー分析と細胞計数により、relt<sup>-/-</sup>マウスはrelt<sup>+/+</sup>マウスのおよそ2倍の脾臓pDC数であったことが示された(図3A及び3B)。relt<sup>+/+</sup>マウスとrelt<sup>-/-</sup>マウスの脾臓cDCの数には統計学的に有意な差異はなかったが(図3A及び3B)、フローサイトメトリー分析によるとpDCとcDC上でのRELTの発現は検出可能な程度であった(図3C)。relt<sup>+/+</sup>マウスに対してrelt<sup>-/-</sup>マウスの胸腺ではおよそ1.8倍のpDCが観察された。

relt<sup>-/-</sup>脾細胞において増えたCD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>細胞群が「

10

20

30

40

50

典型的な「pDC」を表すことを確認するために、*relt*<sup>-/-</sup>と*relt*<sup>+/+</sup>のCD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>脾細胞を、MHCクラスII、pDCマーカーであるCD45RB (Hochrein等, Hum. Immunol. 63:1103-10 (2002); Asselin-Paturel等, Nat. Immunol. 2: 1144-50 (2001))又はCD80やCD86などの同時刺激因子分子のいずれかに対する抗体にて染色した後のフローサイトメトリーによって分析した(図17D)。*relt*<sup>-/-</sup>マウスと*relt*<sup>+/+</sup>マウスのCD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞は同程度の量の表面マーカーを発現したことから、*relt*<sup>-/-</sup>マウスはpDC数を増加させたことが示唆される。

#### 【0193】

(e) RELTを破壊したマウスにおけるCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞の分析

末梢血CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞はpDCに分化する可能性があることが示されている(del Hoyo等, Nature 415: 1043-7 (2002))。したがって、*relt*<sup>-/-</sup>マウスのpDC前駆細胞群を調べた。図18Aに示すように、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>サブセットは*relt*<sup>+/+</sup>マウスよりも*relt*<sup>-/-</sup>マウスではおよそ3倍の量であった。この結果から、*relt*<sup>-/-</sup>マウスでのpDC分化は末梢血pDC前駆体段階の時又はその前の時期に影響を受けることが示された。フローサイトメトリー分析により、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞上でのRELTの発現はわずかであるが、有意なレベルであることが明らかとなった(図18B)。

#### 【0194】

実施例4： RELTが破壊されたマウスにおけるIFN- $\gamma$ の発現

抗原提示細胞としての役割において、非メチル化ウイルス又は細菌性DNAに遭遇するpDCは多くの量のIFN- $\gamma$ を産生する。同様に、マウスに感染する過程において、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)はpDC上のToll様レセプター9に選択的に結合し、IFN- $\gamma$ を産生する(Dalod等, J. Exp. Med. 195: 517-528 (2002); Asselin-Paturel等, Nat. Immunol. 2: 1144-1150 (2001); Krug等, Immunity 21: 107-119 (2004))。RELTが正常なpDC機能に影響を与えるか否かを決定するために、*relt*<sup>-/-</sup>マウス又は*relt*<sup>+/+</sup>マウスの脾細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を測定した。*relt*<sup>-/-</sup>マウス又は*relt*<sup>+/+</sup>マウスの脾細胞を非メチル化ホスホロチオエート骨格DタイプCpG-ODN(D19、GGTGCATCGATGCAGGGGGG (配列番号: 71))とともに培養し、既に記載のあるように測定した(Hemmi等, J. Immunol. 170: 3059-64 (2003); Krug等, Eur. J. Immunol. 31: 2154-63 (2001))。*relt*<sup>-/-</sup>由来の脾細胞は*relt*<sup>+/+</sup>由来の脾細胞のおよそ4倍のIFN- $\gamma$ を分泌した(図19、左パネル)。このIFN- $\gamma$ 分泌の増加は、*relt*<sup>+/+</sup>培養物と比較すると*relt*<sup>-/-</sup>培養物中のpDCの数の増加と一致していた(図17Bを参照)。刺激前の脾細胞でCD11c<sup>+</sup>樹状細胞が減少しているとIFN- $\gamma$ は検出されなかったため、これら脾細胞培養物におけるIFN- $\gamma$ 分泌は、樹状細胞によって起こったものである。等しい数のpDCを比較すると、IFN- $\gamma$ 産生に関して言えば*relt*<sup>-/-</sup>由来の脾細胞と*relt*<sup>+/+</sup>由来の脾細胞とで違いがない(図19、右パネル)。以前の報告(Hemmi等, J. Immunol. 170, 3059-64 (2003))にもあるように、CpG-ODNを有する精製したCD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>cDCを刺激すると非常にわずかなIFN- $\gamma$ が生じ(図19、右パネル)、これはpDCがサイトカインの主な供給源であることに矛盾しない。したがって、RELTはpDCによる正常なIFN- $\gamma$ 産生に重要でないようであり、増大したCD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>細胞群はIFN- $\gamma$ 産生pDCを含む*relt*<sup>-/-</sup>マウスにおいて観察された。

#### 【0195】

実施例5： RELTが破壊された骨髄細胞の分析

骨髄細胞に対するRELT欠損の効果を調べた。野生型マウス及び*relt*<sup>-/-</sup>マウスを、単一の10Gy用量の総体放射線に曝した。その後、照射を受けたマウスの静脈内に、未処理の*relt*<sup>+/+</sup>マウス及び*relt*<sup>-/-</sup>マウスの4×10<sup>6</sup>の骨髄細胞を、静脈内に注射された。8週間後にキメラマウスの樹状細胞群を分析した。再構成したレシピエント動物の脾臓pDC及び末梢血CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞を計数した。*relt*<sup>-/-</sup>ドナー骨髄細胞は常に、レシピエントの遺伝子型(*relt*<sup>-/-</sup>又は*relt*<sup>+/+</sup>)

10

20

30

40

50

t + / +)に関係なく、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞とpDCをrelt<sup>+</sup>/+ドナー骨髄細胞よりも多く産出した(図20)。それに対して、野生型ドナー細胞を用いてrelt<sup>-</sup>/-又はrelt<sup>+</sup>/+のレシピエントに播いた場合、pDCとCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞は等しい数で産生された。この結果から、relt<sup>-</sup>/-マウスにおいて増大したpDCとCD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>細胞群は、relt<sup>-</sup>/-骨髄由来細胞における細胞自立性の欠如を反映したものであることが示唆された。

以前の細胞転移研究から、pDCは骨髄内の骨髄系前駆細胞とリンパ球から分化しうることが示唆された(Shigematsu等, Immunity 21:43-53 (2004))。したがって、pDC及び/又はこれらの前駆細胞群上に発現するREL Tは樹状細胞個体発生を直接調節しう。T細胞はREL Tリガンドを発現し、pDC発達を抑制する候補物質である。ヒト末梢血T細胞を様々な刺激因子の存在下で24時間培養し、その後、ヒトIgG1Fc領域に融合させたヒトREL Tの細胞外ドメイン(アミノ酸1-128、MKPSLLCRPLSCFLMLLPWPLATLTSTTLWQCPPGEEPDLDPGQGTLCRCPGPTFSAAWGSSPCQPHARCSLWRRLEAQVGMATRDTLCGDCWPGWFGPWGVRVPCQPCSWAPLGTGHCDEWGRRA(配列番号:72))を含む標識タンパク質(可溶性REL T-Fc)によるFACS分析を行った。PMA及びイオノマイシンにて刺激したヒトT細胞は、ヒトREL T融合タンパク質を(たとえ弱くても)特異的に結合した、このことは以前の報告(Sica等, Blood 97: 2702-2707 (2001))と一致している。

【図面の簡単な説明】

【0196】

【図1A-B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を表す。可変重鎖(VH)コンセンサスフレームワーク(図1A及び1B)。ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワークマイナスカバットCDR(配列番号:3、73、74、75)。ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号:4~6、76~78、79~81及び82~84)。ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットCDR(配列番号:7、85、86、87)。ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号:8~10、88~90、91~93、94~96)。ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナスカバットCDR(配列番号:11、97、98、99)。ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号:12~14、100~102、103~105、106~108)。ヒトVHアクセプターフレームワークマイナスカバットCDR(配列番号:15、109、110、111)。ヒトVHアクセプターフレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号:16~17、112~114、115~117)。ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナスカバットCDR(配列番号:18、118、119、120)。ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナス伸展した高頻度可変領域(配列番号:19~21、121~123、124~126、127~129)。

【図2】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を表す。可変軽鎖(VL)コンセンサスフレームワーク(図2)。ヒトVL サブグループIコンセンサスフレームワーク(配列番号:22、130、131、132)。ヒトVL サブグループIIコンセンサスフレームワーク(配列番号:23、133、134、135)。ヒトVL サブグループIIIコンセンサスフレームワーク(配列番号:24、136、137、138)。ヒトVL サブグループIVコンセンサスフレームワーク(配列番号:25、139、140、141)。

【図3】huMAb4D5-8軽鎖及び重鎖のフレームワーク領域配列を表す。上付/太字の番号はカバットに従ったアミノ酸位を示す。

【図4】huMAb4D5-8軽鎖及び重鎖の修飾/変異フレームワーク領域配列を表す。上付/太字の番号はカバットに従ったアミノ酸位を示す。

【図5A-B】実施例1(A)に記載の、抗REL T抗体分子の重鎖HVRループ配列を示す。図は重鎖HVR配列であるH1、H2及びH3を示す。アミノ酸位は以下に示すカバ

10

20

30

40

50

ット番号付けシステムに従って番号付けする。

【図6】実施例1(b)(1)に記載のように、細胞表面にマウスRELTを発現していない(「BHK」)又は発現している(「mRELT/BHK」)仔ハムスター腎臓(BHK)細胞に対する抗RELT抗体の結合についてのFACS分析の結果を示す。

【図7】実施例1(b)(1)に記載のように、細胞表面にマウスRELTを発現していない(「-/-」)又は発現している(「+/+」)脾細胞に対する抗RELT抗体の結合についてのFACS分析の結果を示す。

【図8】実施例1(b)(2)に記載のように、relt-xedarを形質移入した細胞及び様々な抗RELT抗体にて処理した細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の活性化の程度を示す。

【図9】実施例1(b)(4)に記載のように、高解像度BIAcore(登録商標)分析の間に観察される様々な濃度の抗RELT抗体H11とマウスRELTとの間の結合相互作用を示す。

【図10】実施例1(b)(5)に記載のように、抗RELT抗体H11が293細胞の表面に発現されたヒトRELTに特異的に結合することを示すFACS分析を表す。

【図11】実施例2に記載のように、異なるT細胞群への抗RELT抗体H11の結合についてのFACS分析の結果を表す。これから、各々のT細胞群が細胞表面にRELTを発現したことが示される。

【図12】実施例2に記載のように、異なるB細胞群への抗RELT抗体H11の結合についてのFACS分析の結果を表す。これから、いずれのB細胞群にもH11抗体が結合しなかったことが示される。

【図13】実施例2に記載のように、脾細胞への抗RELT抗体H11の結合についてのFACS分析の結果を表す。これから、T細胞とマクロファージが細胞表面にRELTを発現したことが示される。

【図14】実施例3(a)に記載のように、RELT欠損マウスの生成を表す。図14Aは、マウスRELTエクソンIIからV(アミノ酸17~209をコードする)を置き換えるために用いたLoxP部位に隣接したPGK-neo選別カセットを示す。図14Bは、実施例3(a)に記載のように、relt+/+、relt+/-及びrelt-/-のゲノムDNAのザンプロット分析を示す。図14Cは、relt+/(「WT」)及びrelt-/-マウスからのT細胞上の表面RELT発現についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。両グラフの最も左の曲線(太線)はコントロール抗体による染色を表し、最も右の曲線はRELT特異的mAb H11による染色を表す。

【図15A-B】実施例3(b)に記載のように、RELTが正常T細胞、B細胞及びNK細胞の発達に必要なか否かを決定するために設定した実験の結果を示す。図15Aは、10週齢の野生型マウス及びrelt-/-マウスの脾臓細胞についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。値は10匹の各遺伝子型の平均 $\pm$ 標準偏差を表す。T細胞は、CD3<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup>である細胞として同定された。B細胞は、CD3<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>DX5<sup>-</sup>である細胞として同定された。NK細胞は、CD3<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup>である細胞として同定された。図15Bは、図15Aで同定されたT細胞、B細胞及びNK細胞上でのRELTの発現を示す。各グラフの最も左(太線)の曲線はコントロールmAbによる染色を表し、最も右の曲線はRELT特異的mAb H11による染色を表す。

【図15C-D】実施例3(b)に記載のように、RELTが正常T細胞、B細胞及びNK細胞の発達に必要なか否かを決定するために設定した実験の結果を示す。図15Cは、野生型マウス(「WT」)及びrelt-/-マウスの胸腺細胞についてのフローサイトメトリー分析を示す。各象限内のポジティブ細胞の割合を示し、5匹のマウスの各遺伝子型の典型である。図15Dは、抗CD3抗体単独(左パネル)又は抗CD3抗体と抗CD28抗体のいずれかに曝した野生型マウス及びrelt-/-マウスの精製したT細胞における、<sup>3</sup>H]-チミジン取り込みアッセイの結果を示すグラフである。これから、RELTがT細胞増殖に必須でないことが示される。

【図16A-G】実施例3(c)に記載のように、免疫原にて抗原刺激した際のマウスによ

10

20

30

40

50

る抗体サブタイプの産生に対する、マウスにおける *relt* 破壊の効果を決定するための実験の結果を示す。

【図17A】実施例3(d)に記載のように、マウスにおける樹状細胞群に対する *REL T* 抑制の効果を決定するための実験の結果を示す。10週齢の野生型マウス及び *relt* - / - マウスの脾臓樹状細胞サブセットについてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。プロットは、全脾臓細胞の *CD 11 c* 染色(左のパネル)又は、*CD 11 c* <sup>+</sup> 細胞を選別するために電子工学的にゲーティングした後の *CD 11 b* 及び *B 2 2 0* 染色を表す。結果は10匹のマウスの各遺伝子型の代表である。

【図17B】実施例3(d)に記載のように、マウスにおける樹状細胞群に対する *REL T* 抑制の効果を決定するための実験の結果を示す。10匹のマウスの各群における *pDC* (*CD 11 c* <sup>+</sup> *B 2 2 0* <sup>+</sup> *CD 11 b* <sup>-</sup>) と *cDC* (*CD 11 c* <sup>+</sup> *B 2 2 0* <sup>-</sup> *CD 11 b* <sup>+</sup>) についての平均 ± 標準偏差を示す。ともに総細胞数と割合で表す。

【図17C】実施例3(d)に記載のように、マウスにおける樹状細胞群に対する *REL T* 抑制の効果を決定するための実験の結果を示す。*pDC* と *cDC* 上での *REL T* の発現についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。各グラフの最も左(太線)の曲線はコントロール *mAb* による結合を表し、最も右の曲線は抗 *REL T* 抗体 *H 1 1* による結合を表す。

【図17D】実施例3(d)に記載のように、マウスにおける樹状細胞群に対する *REL T* 抑制の効果を決定するための実験の結果を示す。野生型マウス(最も左の曲線)又は *relt* - / - マウス(最も右の太い曲線)の *CD 11 c* <sup>+</sup> *B 2 2 0* <sup>+</sup> 細胞に対する抗 *CD 4 5 R B*、*I - A*、*CD 8 0* 又は *CD 8 6* 抗体の結合についてのフローサイトメトリー分析の結果を表す。実線の棒グラフはコントロール抗体への結合を表す。

【図18A - B】実施例3(e)に記載のように、*CD 11 c* <sup>+</sup> *MHC II* <sup>-</sup> *pDC* 前駆細胞群に対する *REL T* 破壊の効果を評価するための実験の結果を示す。図18Aは、10週齢の野生型マウス及び *relt* - / - マウスの末梢血についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。10匹の各遺伝子型の *CD 11 c* <sup>+</sup> *I - A* <sup>-</sup> 細胞の平均割合 ± 標準偏差を示す。図18Bは、*MHC II* <sup>-</sup> *DC* 前駆細胞上の細胞表面 *REL T* 発現についてのフローサイトメトリー分析の結果を示す。最も左(太線)の曲線はコントロール抗体の結合を表し、最も右の曲線は抗 *REL T* 抗体 *H 1 1* による結合を表す。

【図19】野生型細胞群及び *relt* - / - 細胞群による *IFN* - 産生を評価する実験の結果を示す。示した用量の *CpG-ODN* とともに24時間培養した、10週齢の野生型マウスと *relt* - / - マウスから得た脾細胞(左のパネル)又は精製した *pDC* 及び *cDC* (右のパネル)からの *IFN* - 産生を示す。値は7匹のマウスの各遺伝子型の平均 ± 標準偏差を表す。

【図20】実施例5に記載のように、骨髄由来細胞に対する *REL T* 欠損の影響を評価する実験の結果を示す。致死的な放射線を浴びた野生型マウス及び *relt* - / - マウスに無処置の野生型骨髄及び *relt* - / - 骨髄を静脈内注射した。8週後、キメラマウスの脾臓及び血液細胞をフローサイトメトリーにて分析した。データは、7匹のマウスの各遺伝子型からの脾臓 *pDC* (*CD 11 c* <sup>+</sup> *B 2 2 0* <sup>+</sup> *CD 11 b* <sup>-</sup>) と末梢血 *MHC II* <sup>-</sup> *DC* 前駆細胞 (*CD 11 c* <sup>+</sup> *I - A* <sup>-</sup>) の平均割合 ± 標準偏差を示す。

10

20

30

40

【 図 1 A 】

I	A	OVQLVSGAEVKKKGSVKSASGCTFFI	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIT
	B	OVQLVSGAEVKKKGSVKSASGCTFFI	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIT
	C	OVQLVSGAEVKKKGSVKSASGCTFFI	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIT
	D	OVQLVSGAEVKKKGSVKSASGCTFFI	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIT
II	A	QVQLQESGFLVKRSQSLSLTCTVSGGSV	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIS
	B	QVQLQESGFLVKRSQSLSLTCTVSGGSV	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIS
	C	QVQLQESGFLVKRSQSLSLTCTVSGGSV	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIS
	D	QVQLQESGFLVKRSQSLSLTCTVSGGSV	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RVTIS
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS	-H1-	WVROAGKGLKLEWV	-H2-	RFTIS

アクセプター  
 A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS

第2-アクセプター  
 A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS  
 D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSFTFS

【 図 1 B 】

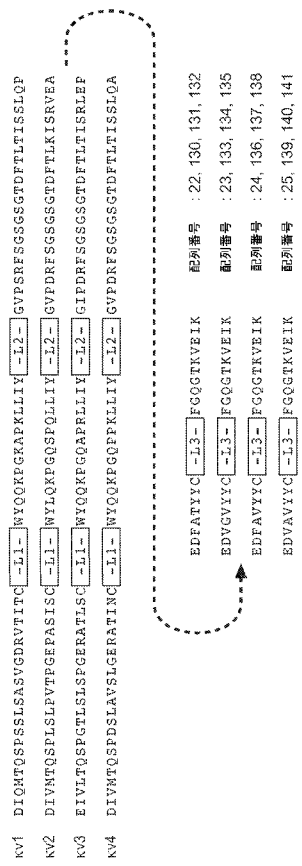
I	A	ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 3, 73, 74, 75
	B	ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 4, 76, 77, 78
	C	ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 5, 79, 80, 81
	D	ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 6, 82, 83, 84
II	A	VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 7, 85, 86, 87
	B	VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 8, 88, 89, 90
	C	VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 9, 91, 92, 93
	D	VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 10, 94, 95, 96
III	A	RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 11, 97, 98, 99
	B	RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 12, 100, 101, 102
	C	RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 13, 103, 104, 105
	D	RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR	-H3-	WGQSTLTVVSS	配列番号 : 14, 106, 107, 108

アクセプター  
 A ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR  
 B ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR  
 C ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR  
 D ADASTAYMELSLRSEDTAVYICAR

第2-アクセプター  
 A VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR  
 B VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR  
 C VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR  
 D VDRSKKQPSLKLSSVTTAAPTAVYICAR

第3-アクセプター  
 A RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR  
 B RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR  
 C RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR  
 D RDNSKNTLYLQNNSLRAEDTAVYICAR

【 図 2 】



【 図 3 】

huMab4D5-8軽鎖のフレームワーク配列

LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> ( 配列番号 : 26)  
 LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> ( 配列番号 : 27)  
 LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Met Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>85</sup> ( 配列番号 : 28)  
 LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> ( 配列番号 : 29)

huMab4D5-8重鎖のフレームワーク配列

HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> ( 配列番号 : 30)  
 HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> ( 配列番号 : 31)  
 HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> ( 配列番号 : 32)  
 HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> ( 配列番号 : 33)

【 図 4 】

位置66および99(下線部)で修飾したhuMab4D5-8軽鎖のフレームワーク配列

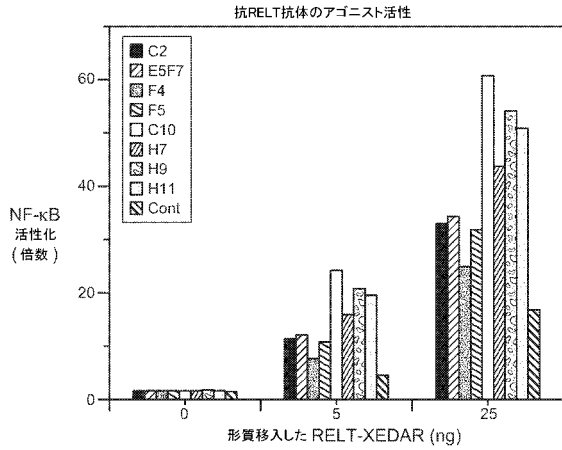
LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> ( 配列番号 : 34)  
 LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> ( 配列番号 : 35)  
 LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Met Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> ( 配列番号 : 36)  
 LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> ( 配列番号 : 37)

位置71,73および78(下線部)で修飾したhuMab4D5-8重鎖のフレームワーク配列

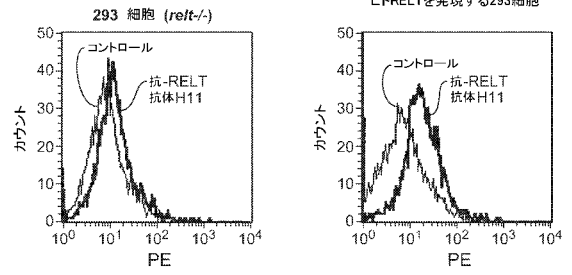
HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> ( 配列番号 : 38)  
 HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> ( 配列番号 : 39)  
 HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> ( 配列番号 : 40)  
 HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> ( 配列番号 : 41)



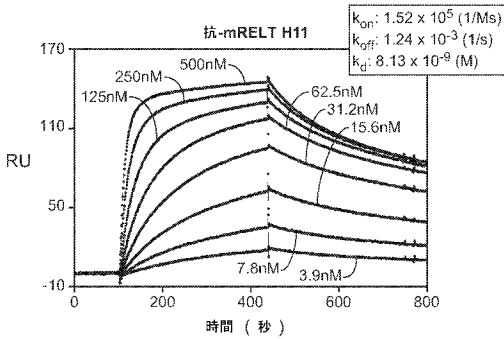
【 図 8 】



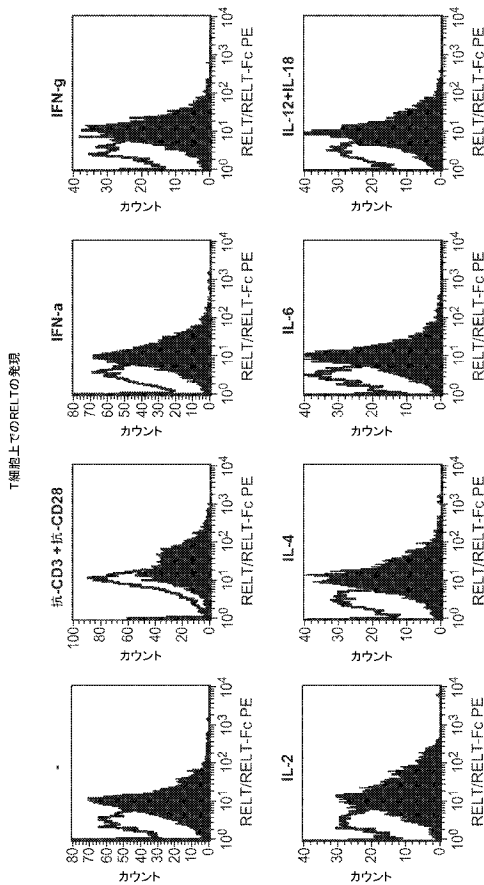
【 図 1 0 】



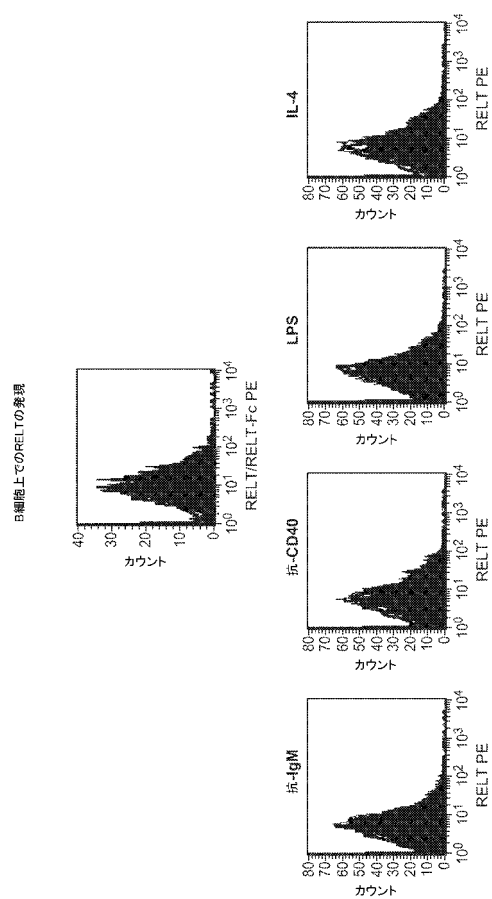
【 図 9 】



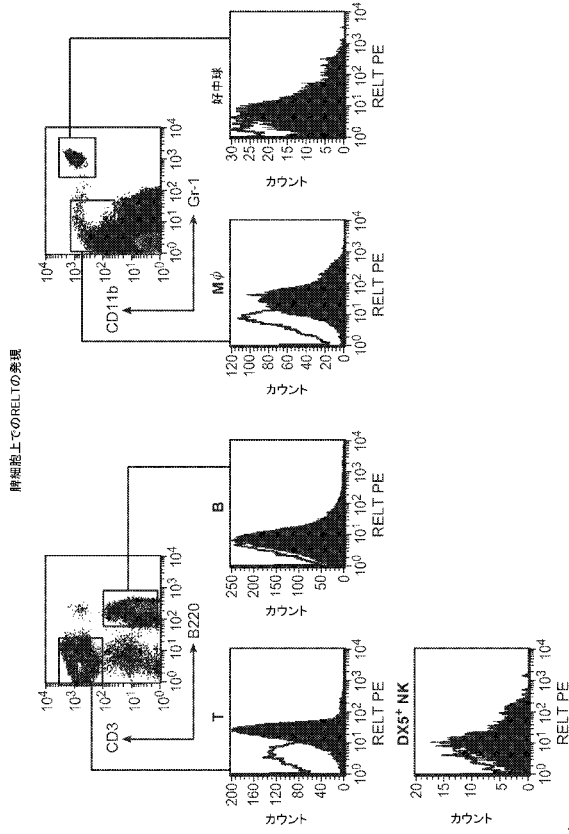
【 図 1 1 】



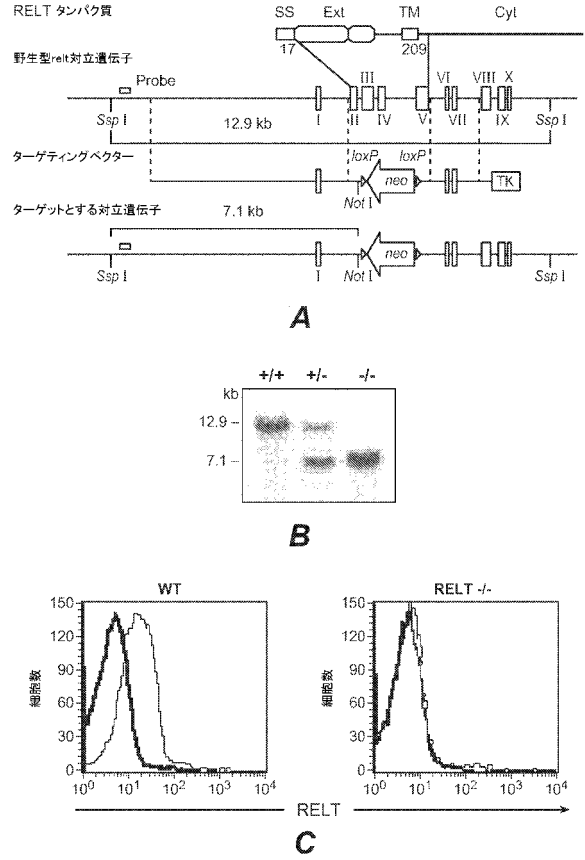
【 図 1 2 】



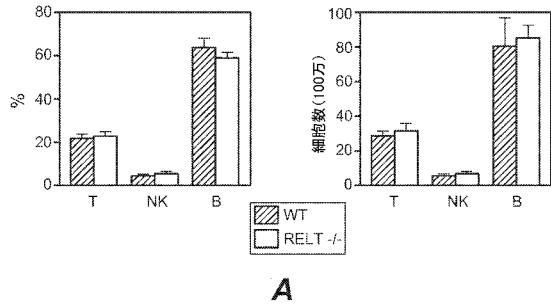
【 図 1 3 】



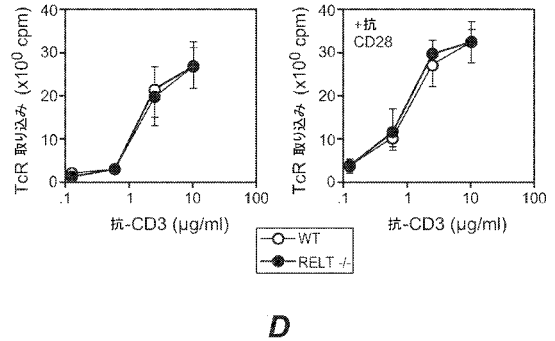
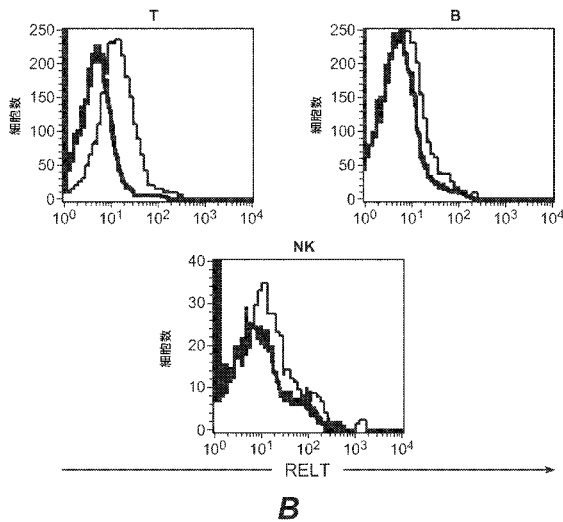
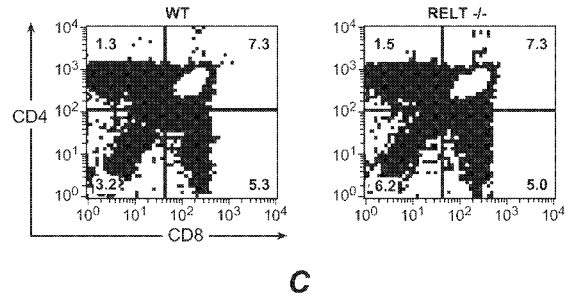
【 図 1 4 】



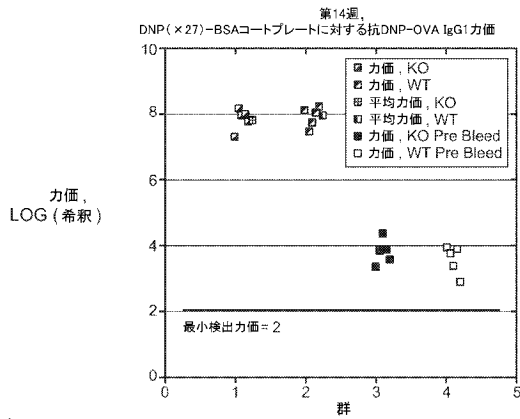
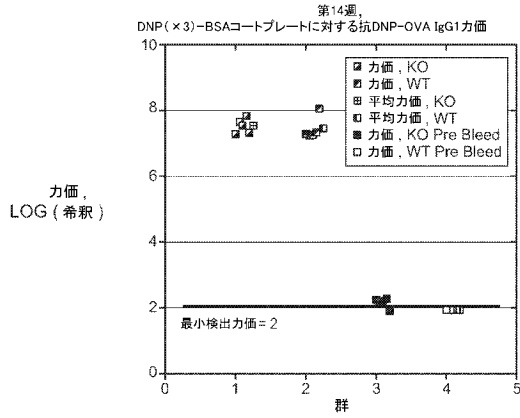
【 図 1 5 A 】



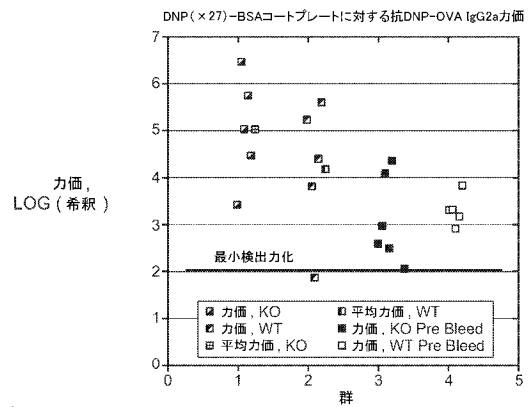
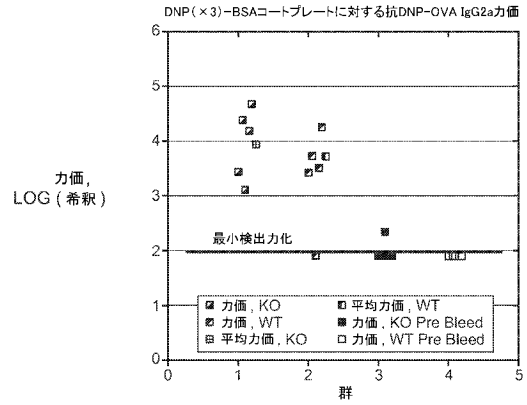
【 図 1 5 B 】



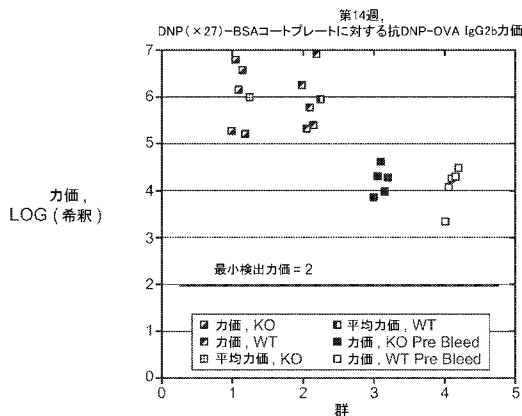
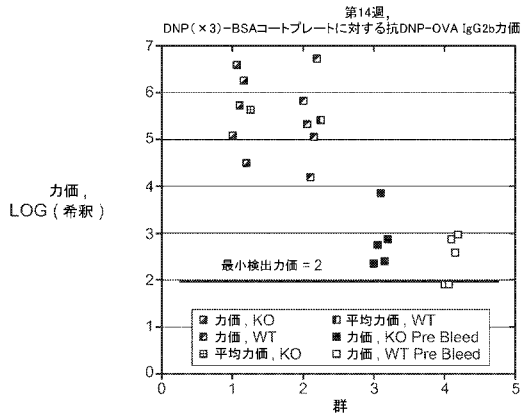
【図 16 A】



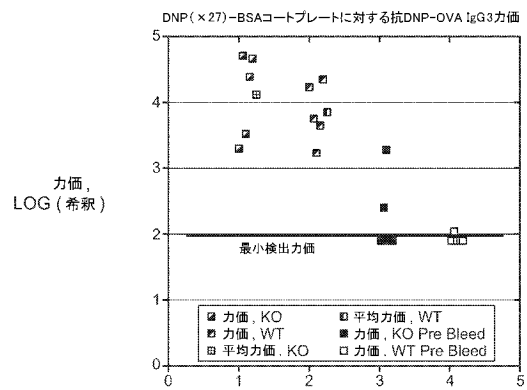
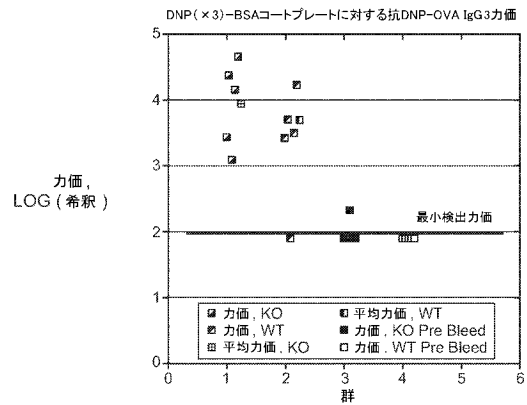
【図 16 B】



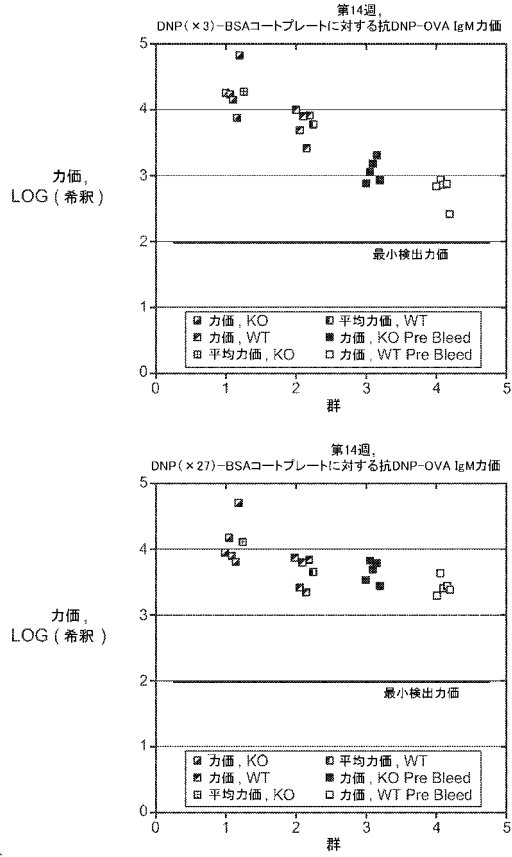
【図 16 C】



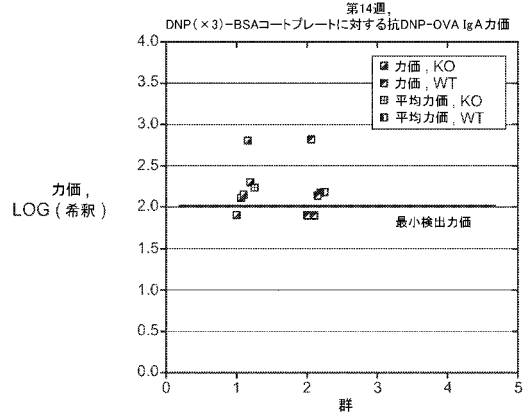
【図 16 D】



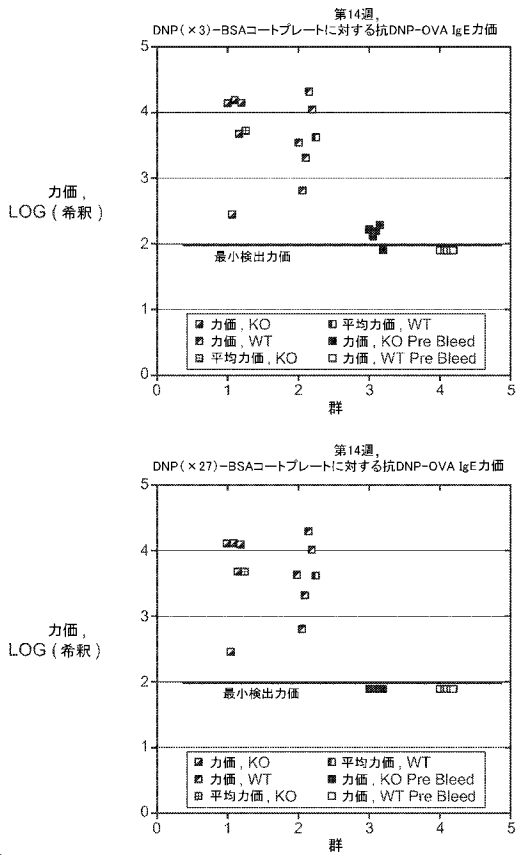
【 図 1 6 E 】



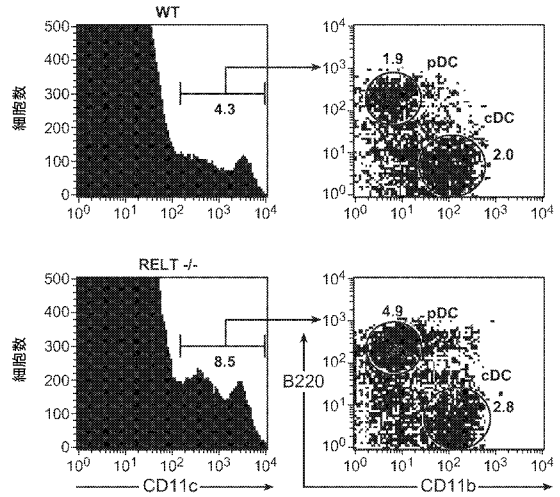
【 図 1 6 F 】



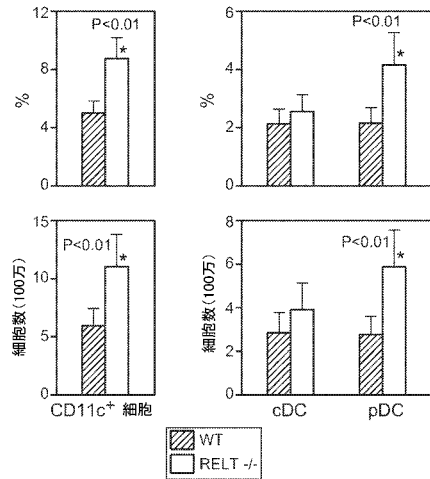
【 図 1 6 G 】



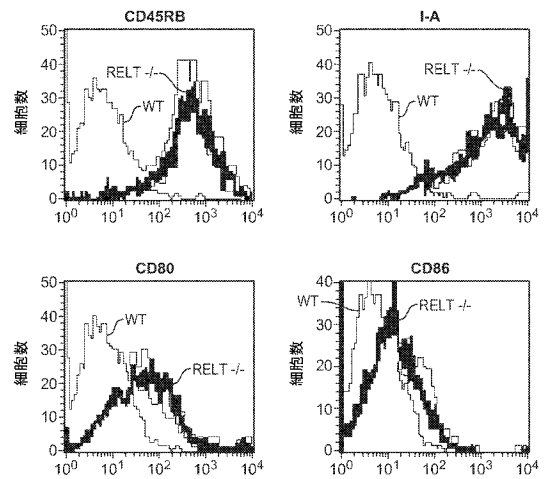
【 図 1 7 A 】



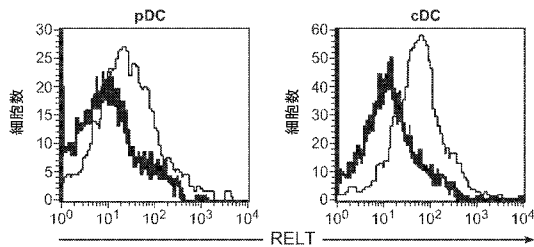
【 図 1 7 B 】



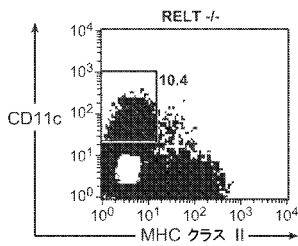
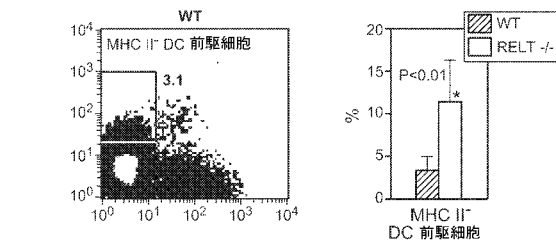
【 図 1 7 D 】



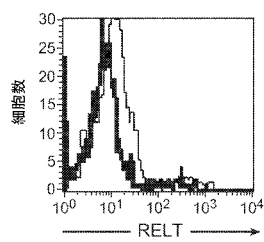
【 図 1 7 C 】



【 図 1 8 】

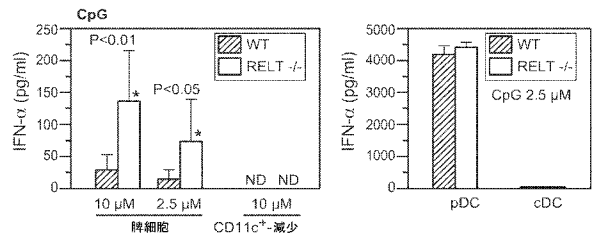


A

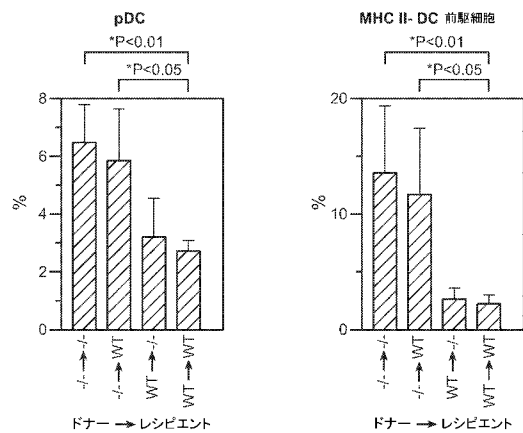


B

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【配列表】

2009526552000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/061988

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/28	G01N33/564	G01N33/569 G01N33/574 G01N33/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, Sequence Search, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "R&D SYSTEMS New products" INTERNET ARTICLE, [Online] 2005, pages 1-12, XP002463527 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.rndsistemas.com/DAM_public/5317.pdf">http://www.rndsistemas.com/DAM_public/5317.pdf</a> [retrieved on 2008-01-02] the whole document	1-22
X	ANONYMOUS: "Anti-Human RELT / TNFRSF19L Monoclonal Antibody" INTERNET ARTICLE, [Online] 2005, pages 1-1, XP002463528 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.rndsistemas.com/pdf/MAB1385.pdf">http://www.rndsistemas.com/pdf/MAB1385.pdf</a> [retrieved on 2008-01-02] the whole document	1-22
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 <b>4 January 2008</b>		Date of mailing of the international search report <b>04/02/2008</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Gruber, Andreas</b>

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/061988
---

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/010044 A (GENENTECH INC [US]; ARNOTT DAVID [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HASS PHILIP) 3 February 2005 (2005-02-03) page 106, line 7; claims 35-39; figure 6; sequence 11 -----	1-15
A	CUSICK ET AL: "Identification of RELT homologues that associate with RELT and are phosphorylated by OSR1" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 340, no. 2, 10 February 2006 (2006-02-10), pages 535-543, XP005226718 ISSN: 0006-291X Available online 19 December 2005 page 536, left-hand column, paragraph 1 -----	1-48
A	DATABASE WPI Week 200349 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2003-516655 XP002463529 -& JP 2003 052374 A (KIRIN BREWERY KK) 25 February 2003 (2003-02-25) abstract -----	1-48

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/061988**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 23-48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International application No

PCT/US2007/061988

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005010044 A	03-02-2005	AU 2004259638 A1	03-02-2005
		CA 2530284 A1	03-02-2005
		EP 1641822 A2	05-04-2006
		KR 20060035732 A	26-04-2006
		KR 20070092319 A	12-09-2007
		MX PA06000347 A	28-03-2006
JP 2003052374 A	25-02-2003	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 7
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 31/7088	
	G 0 1 N 33/53	D

(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, GT, 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, ME, 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 榎垣 伸彦

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリングゲーム , カプチャーノ 1 2 2 9 5 号

(72)発明者 ウー , ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4 , フォスター シティ , プライス ストリート 1 1 6 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA61 BA80 CA02 CA04 DA02 DA06 EA03  
EA04 GA11 HA20  
4B064 AG26 CA01 CA10 CA19 CC01 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA30  
CA25 CA43 CA44 CA46  
4C084 AA13 NA14 ZA02 ZA59 ZB03 ZB07 ZB08 ZB09 ZB11 ZB21  
ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02  
4C085 AA13 AA14 BB17 BB18 CC21 DD62 EE01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA59 ZB03 ZB07  
ZB08 ZB09 ZB11 ZB21 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009526552A5</a>	公开(公告)日	2010-03-11
申请号	JP2008555446	申请日	2007-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	デイクスイットヴィッシュユヴァ 榎垣伸彦 ウーヤン		
发明人	デイクスイット, ヴィッシュユヴァ 榎垣 伸彦 ウー, ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12N5/07 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12P21/02 C07K16/18 C07K19/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P31/00 A61P29/00 A61P11/06 A61P11/02 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P25/00 A61K48/00 A61K31/7088 G01N33/53		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/03 A61P11/02 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/70575 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317/54 C07K2317/565 C07K2317/75 C07K2317/92 C12N15/8509 G01N33/564 G01N33/56972 G01N33/57492 G01N33/6893 G01N2800/104 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B C12N5/00.E C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12P21/02. C C07K16/18 C07K19/00 A61K39/395.D A61K39/395.U A61P43/00.105 A61P31/00 A61P29/00 A61P43/00.117 A61P11/06 A61P11/02 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P25/00 A61K48/00 A61K31/7088 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA20 4B064/AG26 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA59 4C084/ZB03 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB32 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA59 4C086/ZB03 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/772911 2006-02-13 US		
其他公开文献	JP2009526552A		

#### 摘要(译)

提供了抗RELT单克隆抗体和使用该抗体的方法。还提供了使用RELT多肽和核酸调节免疫细胞发育和调节细胞因子产生的方法。

